



CURSO DE ODONTOLOGIA

BRENDA FELIX BITTENCOURT

**CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA E BIOQUÍMICA DE
FRAÇÕES OBTIDAS DE *Porphyromonas gingivalis***

**ANTIGENIC AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION
OF FRACTIONS OBTAINED FROM *Porphyromonas
gingivalis***

SALVADOR
2018.1

BRENDA FELIX BITTENCOURT

**CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA E BIOQUÍMICA DE
FRAÇÕES OBTIDAS DE *Porphyromonas gingivalis***

**ANTIGENIC AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION
OF FRACTIONS OBTAINED FROM *Porphyromonas*
*gingivalis***

Artigo apresentado ao Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública como requisito parcial para obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dra. Márcia Tosta Xavier

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Cirino de Carvalho Filho

SALVADOR

2018.1

A Deus que iluminou essa minha
caminhada, sem Ele não chegaria
tão longe.

Aos meus pais por serem meus
maiores exemplos de força,
perseverança e coragem para seguir
em frente.

A todos familiares e amigos que me
deram apoio e alegria de tê-los
sempre por perto.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as graças recebidas e por ter colocado todos os envolvidos no meu caminho. A presença de cada um foi de extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Márcia Tosta Xavier, primeiramente, por ter sido como uma mãe para esta minha graduação, sempre atenciosa, dedicada e disponível, acolhendo-me desde o início desta caminhada, durante a estada no Rio de Janeiro, nos momentos de ansiedade para conclusão, assim como em todos os momentos. Além de tudo, por ter sido uma brilhante orientadora, ensinando-me não somente conhecimentos científicos, mas como lidar com as barreiras da vida, ajudando-me a enxergar melhor o alcance de cada objetivo.

Ao Prof. Dr. Paulo Cirino de Carvalho Filho, por toda a sabedoria compartilhada e calma para bem desempenhar seu papel no trabalho, mostrando-se um excelente co-orientador. Grande exemplo de profissional!

À Ellen Karla Nobre dos Santos Lima, por seu acompanhamento até aqui, de forma amiga, compreensiva, gentil, inteligente e alegre. Sua ajuda foi de extrema importância durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Soraya Castro Trindade, pelo conhecimento e contribuição de cunho científico que serviram de suporte ao trabalho, demonstrando sempre seu envolvimento com o grupo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Mário Júlio Ávila, que forneceu a cepa *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 do Laboratório de Microbiologia da Universidade de São Paulo (USP) para obtenção do extrato total, colaborando para o estudo.

À Prof^a. Dr^a. Lucia Mendonça Previato, pelo suporte para realização da cromatografia no Instituto de Biofísica da Universidade Federal Rio de Janeiro (UFRJ) permitindo obter as frações de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB, pelo financiamento da pesquisa (Projeto Rede, Edital 011/2014, Termo de outorga: Dra. Márcia Tosta Xavier (EBMSP) 0014/2014) possibilitando desenvolver e concluir o trabalho.

A todo o grupo de pesquisa, pela colaboração e diligência propiciando as condições para o avanço deste trabalho. Em especial, a Patrícia, por toda cautela e prontidão ajudando no que fosse preciso.

A toda a equipe envolvida do LABIMUNO, pela contribuição e suporte ao desenvolvimento deste trabalho. Em especial a Adriano e Ramon por toda a prática na bancada do laboratório.

Aos meus pais Ruy e Rose e meu irmão Rodrigo, dos quais em todos os momentos sempre recebi incentivo, apoio, carinho e ajuda em todas as etapas do trabalho, especialmente nas mais árduas. Sempre muito orgulhosos por meu crescimento profissional.

Ao meu noivo, Leonardo, pela paciência e compreensão nos meus momentos de estresse e minhas ausências, esteve sempre presente, encorajando-me e ajudando-me a vencer cada obstáculo.

Finalmente a tantos amigos e familiares que durante toda esta minha trajetória torceram e vibraram pelo meu sucesso.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1 SELEÇÕES DE PARTICIPANTES	12
2.2 ANÁLISES CLÍNICA E LABORATORIAL	13
2.2.1 Coleta de Sangue/Obtenção de Soro	13
2.2.2 Padronização dos <i>pools</i> de soro para estudo	14
2.2.3 Validação dos <i>pools</i> e padronização da concentração de soro	14
2.2.4 Cultivo das células e obtenção do extrato total de <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	15
2.2.5 Fracionamento do extrato total de <i>Pg</i> por HPLC	15
2.2.6 Dosagem de proteínas nas frações obtidas por cromatografia.	16
2.2.7 Perfil eletroforético das frações obtidas de <i>P.gingivalis</i> em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE).	16
2.2.8 Determinação da antigenicidade das frações de <i>Pg</i> por Western Blotting	17

2.2.9 Caracterização bioquímica das frações antigênicas	18
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
3. RESULTADOS	19
4. DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	
ANEXO 1 - Comprovante de aprovação do Comitê de Ética	
ANEXO 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido	
ANEXO 3 – Normas Da Revista Bahiana de Odontologia (Diretrizes para Autores)	

RESUMO

A periodontite crônica resulta do desafio microbiano no biofilme e da resposta imune do hospedeiro, sendo *Porphyromonas gingivalis* (Pg) um patógeno-chave no seu desenvolvimento. Este trabalho objetivou obter e caracterizar bioquimicamente frações antigênicas de Pg para estudos da resposta imune na periodontite crônica. Os 41 participantes foram classificados segundo os descritores periodontais e divididos em dois grupos: controle (SP) e com a doença (PC). Após a coleta de sangue, o soro foi separado e congelado. Foram obtidos dois *pools* de soro: positivo e negativo. Pg ATCC 33277 foi cultivada e o extrato submetido à cromatografia de troca iônica em HPLC. Cinco frações foram obtidas usando gradiente de NaCl (0 a 500mM) e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, coradas por Coomassie Blue e testadas por Western Blotting. Na análise pela espectrometria de massas (MS) observou-se nas cinco frações, 13 proteínas de Pg. As frações 3 e 4 foram reconhecidas pelo soro de pacientes com periodontite crônica. Esta última, com maior antigenicidade, é composta por 5 proteínas de Pg com peso molecular aparente (PM) de 36, 59, 95, 114 e 208 kDa que poderão ser estudadas individualmente sobre seu papel na resposta imune na periodontite crônica.

PALAVRAS-CHAVE: Periodontite crônica, *Porphyromonas gingivalis*, Antígenos.

ABSTRACT

Chronic periodontitis (CP) results from the microbial challenge and the host immune response. *Porphyromonas gingivalis* (Pg) is a keystone pathogen in its development. This work aimed to obtain and biochemically characterize antigenic fractions of Pg to studies of the immune response in chronic periodontitis. The 41 participants were classified according to the periodontal descriptors and divided into two groups: control (WP) and with the disease (CP). After blood collection, the serum was separated and frozen. Two serum pools were obtained: positive and negative. Pg ATCC 33277 was cultivated and its extract was submitted to ion exchange chromatography in HPLC. Five fractions were obtained using gradient of NaCl (0 to 500 mM) and they were submitted to polyacrylamide gel electrophoresis (12%), stained by Coomassie Blue and tested by Western Blotting. In the analysis by mass spectrometry (MS) 13 *P.gingivalis* fractions were observed. The fractions 3 and 4 were recognized by the serum of patients with chronic periodontitis. The latter, with higher antigenicity, is composed of 5 Pg proteins with apparent molecular weight (MW) of 36, 59, 95, 114 and 208 kDa which can be studied individually about your role in the immune response in chronic periodontitis.

KEY WORDS: Chronic periodontitis, *Phorphyromonas gingivalis*, Antigens.

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal é altamente prevalente no mundo e, portanto, representa um problema de saúde global. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a doença periodontal afeta 10-15% dos adultos em diversos países (1). Existem diversas manifestações clínicas da doença periodontal, causadas por um processo inflamatório agudo ou crônico. Desde gengivite, uma inflamação local reversível até periodontite, uma forma inflamatória mais avançada (1, 2).

A periodontite crônica pode influenciar condições sistêmicas como, doenças cardiovasculares, doenças respiratórias, diabetes mellitus, desfechos indesejáveis em gestações (3-7). Sendo esta doença decorrente de um processo infeccioso (4), existem diversos microrganismos presentes no biofilme supra e sub-gengival que estão relacionados à instalação e progressão da doença, colonizando a superfície do esmalte dentário e induzindo resposta inflamatória no hospedeiro (3,7-12). Entre eles destacam-se bactérias gram negativas como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forshytiae*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* que estão envolvidas com a progressão e gravidade da doença (8-10). Estes organismos processam uma variedade de fatores de virulência, incluindo adesinas, endotoxinas, citotoxinas e proteases que degradam imunoglobulinas, estimulando o desenvolvimento da doença (7-16). A resposta imune tem propósito inicial de proteção, porém, de maneira exacerbada pode levar à destruição dos tecidos periodontais de suporte e

sustentação do dente, levando à perda de inserção clínica, e uma possível perda da unidade dentária (3,9,11,12,15).

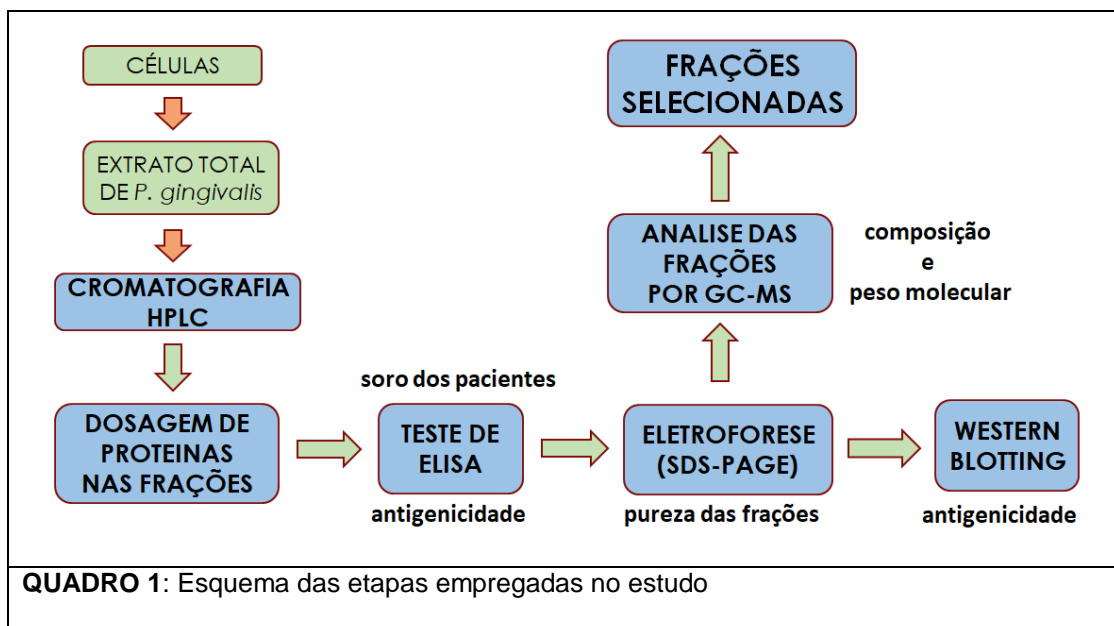
Estudos anteriores demonstraram que *Porphyromonas gingivalis* é um patógeno-chave no desenvolvimento da periodontite crônica e que seu extrato total, bem como suas frações, induzem resposta humoral do hospedeiro (17, 18). As gingipaínas, importante fator de virulência de *P. gingivalis*, ao se acumularem em lesões inflamatórias, podem reduzir a expressão da resposta imune inata do hospedeiro e, assim, alterar a capacidade de defesa contra a bactéria (10,13-16), gerando persistência bacteriana e maior patogenicidade. A lipoproteína de membrana HmuY, específica em *P. gingivalis*, tem se mostrado também como um importante componente de mecanismos tais como a indução de intermediários pró-inflamatórios e morte celular em indivíduos com periodontite crônica (11,12,15,16).

Desse modo, ampliar o conhecimento sobre os fatores de virulência de *P. gingivalis* e seu papel no desenvolvimento da doença é importante para compreensão dos seus mecanismos de progressão e para propor estratégias de prevenção e controle.

O objetivo deste estudo foi identificar frações antigênicas de *P. gingivalis* e caracterizá-las bioquimicamente para que possam ser utilizadas em estudos da resposta imune de indivíduos com periodontite crônica, buscando o entendimento sobre a evolução e gravidade da doença.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado a partir do cultivo e obtenção de frações de *P. gingivalis* que foram testadas quanto à antigenicidade frente ao soro de pacientes com periodontite crônica e sem a doença. As frações reagentes foram selecionadas para os estudos da resposta imune contra o periodontopatógeno.



2.1 SELEÇÕES DOS PARTICIPANTES

Para a determinação da antigenicidade das frações de *P. gingivalis* foram obtidas amostras de soro de pacientes com periodontite crônica (CP) e sem periodontite (SP). Foram entrevistados cerca de 350 indivíduos e selecionados 41 participantes, maiores de 18 anos, no ambulatório do curso de

Odontologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Os critérios de não inclusão avaliados pela anamnese e considerados para este estudo foram: história de doenças sistêmicas; gestação atual; tratamento periodontal anterior; fumo atual ou anterior; etilismo; uso de antibióticos nos seis meses anteriores à coleta; anti-inflamatórios dois meses anteriores da coleta. A participação de todos os envolvidos foi espontânea e voluntária em todas as etapas, com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, obedecendo aos critérios estabelecidos e com base na Resolução CNS 466(12-12-2012), do Ministério da Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da EBMSF através da Plataforma Brasil (CAAE: 33105914.2.3001.0053, parecer: 892074). Todos os indivíduos, com periodontite crônica e sem a doença, tiveram o seu periodonto examinado de acordo com a classificação proposta por Gomes-Filho *et al.* (7). Foram considerados com periodontite crônica aqueles participantes que apresentaram, pelo menos, quatro dentes com, no mínimo, um sítio com profundidade de sondagem maior ou igual a 4mm; perda de inserção maior ou igual a 3mm; e sangramento à sondagem no mesmo sítio. O caráter crônico da doença foi determinado de acordo com a Academia Americana de Periodontia (1999) (2) e, desse modo, os participantes foram divididos em dois grupos de acordo com a condição periodontal: grupo com periodontite crônica (PC) e grupo sem periodontite (SP).

2.2 ANÁLISES CLÍNICA E LABORATORIAL

2.2.1 Coleta de Sangue/Obtenção de Soro

Após anamnese e exame periodontal foi feita a coleta de 5 mL sangue por punção venosa na fossa ante-cubital com tubo tipo Vacutainer estéril (BD-SP) sem adição de anticoagulante. Depois de coagulado o sangue, o tubo foi centrifugado a 3800 rpm (1800xg) por 15 minutos. O sobrenadante foi armazenado em alíquotas em tubos tipo eppendorf a -20°C.

2.2.2 Obtenção dos *pools* de soro para estudo

Foi realizada uma padronização para obtenção das concentrações ideais de antígeno (extrato sonicado de *P. gingivalis*), soro e conjugado; utilizando o método de ELISA. Essa padronização foi empregada para avaliar a antigenicidade das frações de *P.gingivalis* após o fracionamento do extrato total das células por HPLC (High Performance Liquid Chromatography, PHARMACIA, Suécia).

Dois *pools* de soro foram obtidos para utilização nos testes de antigenicidade das frações de Pg ATCC 33277. Para tanto, o método ELISA indireto foi realizado para detecção de IgG anti-Pg no soro dos indivíduos selecionados considerando os critérios de não inclusão no estudo. O antígeno utilizado foi o extrato total sonicado de Pg ATCC 33277 (5 µg/mL). Os *pools* foram obtidos como segue: *Pool* PC: amostras de indivíduos com diagnóstico

de periodontite crônica e maiores níveis de IgG anti-Pg. *Pool* SP: amostras de indivíduos sem periodontite e menores níveis de IgG anti-Pg. 200 µL de cada amostra foram unidos, homogeneizados, aliquotados e armazenados a -20°C.

2.2.3 Validação dos *pools* e padronização da concentração de soro

Após a obtenção dos *pools* de soro PC e SP, o método de ELISA indireto foi utilizado para padronização da concentração que foi utilizada nos testes subsequentes. O antígeno utilizado foi o extrato total sonicado de *Pg* ATCC 33277 (5 µg/mL) para observar a presença de IgG específica (IgG anti-*Pg*) nos *pools* de soro. Foi obtido um coeficiente entre os *pools* PC e SP utilizando a média dos valores da densidade óptica (D.O.) e foi considerada a condição com maior coeficiente para a realização dos testes posteriores.

2.2.4 Cultivo das células e obtenção do extrato total de *P. gingivalis* ATCC 33277

A cepa ativada de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia, ICB, da Universidade de São Paulo (São Paulo - Brasil) em abril de 2016. O cultivo foi realizado em anaerobiose no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. A obtenção do extrato total de *P. gingivalis* ATCC 33277 foi feita no

mesmo laboratório seguindo metodologia descrita por Trindade et al. (2008) (18)

2.2.5 Fracionamento do extrato total de *P. gingivalis* por HPLC

A obtenção das frações do extrato total de *P.gingivalis* foi realizada no Laboratório de Glicobiologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho na Universidade Federal do Rio de Janeiro. O extrato sonicado de *P. gingivalis* foi aplicado em coluna monoQ HR5/5 HPLC, com radical sulfidril e eluída com um gradiente cloreto de sódio (0-500 milimolar). O acompanhamento da eluição das frações foi feito por absorção a 220, 260 e 280nm. As frações obtidas foram liofilizadas, ressuspendidas e dialisadas por imersão em água destilada dentro de bolsas com limite de exclusão de 12 000 a 16 000 kDa e porosidade de 25 Angstroms (INLAB, Brasil) por uma hora a 4°C, sob agitação, numa primeira etapa. A segunda etapa de diálise com tampão fosfato salina (STF) foi realizada por duas horas, nas mesmas condições anteriores e repetida uma terceira vez. O material foi armazenado a -70°C em alíquotas em tubos tipo eppendorf.

2.2.6 Dosagem de proteínas nas frações obtidas por cromatografia.

Foi feita utilizando o kit comercial Pierce BCA Protein Assay usando BSA como padrão nas concentrações de 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 µg/ml em triplicata, seguindo as instruções do fabricante.

2.2.7 Perfil eletroforético das frações obtidas de *P.gingivalis* em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)

As frações foram submetidas à eletroforese em condições desnaturantes em gel de poliacrilamida a 12% a 90V; 20mA; 2W em gel de 30% de Mix Acrilamida, 10% de SDS, 10% de persulfato de amônio (PSA), 0,05% TEMED em 1,5M Tris-Cl, pH 8.8 (19). A migração foi monitorada pelo azul de bromofenol presente no tampão de amostra. As amostras foram distribuídas em diferentes poços para posterior coloração e/ou eletro-transferência para o estudo subsequente de antigenicidade por Western Blotting. As proteínas foram coradas por Comassie Blue e comparadas com o padrão de peso molecular de proteínas submetido às mesmas condições.

2.2.8 Determinação da antigenicidade das frações de *P.gingivalis* por Western Blotting

Depois da verificação da presença das frações antigênicas na membrana de nitrocelulose após a eletro-transferência, a mesma foi bloqueada com uma solução salina tamponada com fosfato contendo 0,05% de detergente Tween-20 (STF-T) e 5% de albumina sérica bovina (BSA), fração V (SIGMA-EUA), durante 16 horas (20). Após cinco lavagens com STF-T, a membrana foi incubada durante 2 horas a 37°C com o pool de soros de indivíduos com periodontite crônica e sem periodontite diluídos a 1:100 em STF-T contendo 0,5% de BSA. A membrana foi lavada seis vezes com STF-T e

incubada por uma hora a 37°C com imunoglobulina anti-IgG humana produzida em coelho, conjugada com peroxidase (SIGMA A-8792), diluída em STF-T contendo 0,5% de BSA a 1:500. Novamente a membrana foi lavada com STF-T para posterior revelação da reação com uma solução de 0,3% de 4-cloro-1-naftol, diluída a 1:5 em STF, com 0,33 µL de peróxido de hidrogênio por mL de solução. A interrupção da reação foi feita com água destilada.

2.2.9 Caracterização bioquímica das frações de *P.gingivalis*

As frações foram submetidas à análise da composição de aminoácidos e determinação do peso molecular empregando a técnica de espectrometria de massas (GC-MS). Após a caracterização das frações, com a obtenção das sequências das proteínas presentes, as mesmas foram comparadas com aquelas já depositadas no banco de dados público do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para identificação e seleção das que serão utilizadas em estudos futuros sobre a resposta imune na periodontite crônica, buscando o entendimento da evolução da doença.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

No exame odontológico, os examinadores foram calibrados para a medição dos descritores clínicos periodontais. A calibração foi verificada através de teste estatístico Kappa interexaminadores, obtendo-se o valor de concordância de 0,83, para a medida de profundidade de sondagem, com o

objetivo de evitar possíveis variações de medida. A análise descritiva foi obtida para a caracterização dos grupos. Os dados relacionados às variáveis dicotômicas foram testados com o teste de Qui-quadrado de Pearson. Foram utilizados os testes T de student ou Mann-Whitney U, a depender da distribuição avaliada por Kolmogorov-Smirnov. Todos os procedimentos estatísticos consideraram um nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS

Foram entrevistados cerca de 350 pacientes encaminhados para atendimento no ambulatório da clínica odontológica da UEFS, porém só foram incluídos no estudo 41 participantes, aqueles que atendiam aos critérios de inclusão na pesquisa (QUADROS 2 e 3). Sempre após o exame clínico periodontal e consentimento do paciente à pesquisa, era feita a coleta de sangue. Após o exame clínico os participantes foram divididos em dois grupos de acordo com a condição periodontal: grupo com periodontite crônica (PC= 20) e grupo sem periodontite (SP= 21). (QUADRO 2)

Para obtenção do *pool* PC, foram considerados aqueles soros com os seis maiores valores de D.O. (0,53 – 1,10) para IgG dosada pelo teste de ELISA feito com o extrato total de Pg, enquanto que para o *pool* SP foram considerados aqueles com os cinco menores valores de D.O. (0,22 – 0,38) (QUADRO 3).

	GRUPO SP (N=21)	GRUPO PC (N=20)	p*
Idade (anos) (média± DP)	31,38 ± 9,82	35 ± 10,91	0,672
Sexo (feminino/masculino)	14/3	13/4	0,683
% sítios com SS (média± DP)	8,45 ±10,7	37,97 ±16,9	2,3
% sítios com PS≥4mm (média± DP)	1,14 ±1,97	18,7 ±12,3	0,000
% sítios com NIC≥3mm (média± DP)	10,34 ±16,84	31,48 ±22,96	0,004
% sítios com NIC≥5mm (média± DP)	1,92 ±7,95	17,98 ±15,81	0,000

QUADRO 2: Dados clínicos dos 41 indivíduos selecionados (PC= 20, SP= 21).
SS: Índice de Sangramento à Sondagem; PS: Profundidade de Sondagem; NIC:
Nível de Inserção Clínica DP: desvio padrão. *Terceiros molares são excluídos.

Indivíduo	Idade (anos)	Nº de Dentes*	ISG (%)	PS ≥4 (%)	NIC ≥5 (%)	NIC ≥3 (%)	DP	Sexo	D.O.
A1	20	27	13,0	4,3	0	3,1	0	1	0,53
A2	29	28	17,9	0	0	0	0	0	0,98
A3	20	28	45,5	3,6	0	3,0	1	0	0,53
A4	-	28	25	0	0	0	0	0	0,34
A5	42	26	31,7	1,9	1,3	6,4	0	0	0,52
A6	31	26	43,5	17,3	9,0	17,3	1	0	0,67
A7	35	28	8,3	0	0	0	0	0	0,66
A8	30	25	50	8	3,3	7,3	1	1	0,68
A9	47	26	24,4	22,4	21,8	29,5	1	1	0,58
A10	33	25	14	13,3	6,7	13,3	1	1	0,35
A12	46	27	53,1	24,1	15,4	24,1	1	0	0,32
A13	42	19	27,2	12,3	14,0	19,3	1	0	0,54
A14	34	25	8	0	0	0	0	0	0,54
A15	18	27	36,1	0	0	0	0	0	0,38
A16	43	21	11,9	0	0	1,6	0	0	0,53
A17	28	25	4,7	0,7	0	0,7	0	0	0,37
A18	23	28	7,7	0	0	1,2	0	0	0,59
A19	33	16	31,3	30,2	26,0	36,5	1	0	0,43
A20	24	28	27,4	13,1	4,2	13,1	1	0	0,26
A21	26	24	4,9	0	0	0	0	0	0,62
A22	29	20	9,2	0	0	0	0	0	0,59

A23	27	17	100	42,2	39,2	48,0	1	0	0,42
A28	30	27	37,0	3,7	1,2	4,3	1	0	0,37
A29	33	28	72,6	38,1	34,5	38,1	1	0	0,28
A30	38	26	88,5	36,5	30,1	36,5	1	0	0,57
A31	61	12	33,3	10,4	0	2,1	0	0	0,85
A32	23	28	33,3	21,8	0	1,3	1	1	0,38
A33	23	28	22,5	5,1	0	0,6	1	0	1,10
A34	70	19	4,4	3,5	0	0,9	0	0	0,77
A35	39	26	20,7	0	0	0	0	0	0,53
19R	54	11	52,3	25,8	39,4	78,8	1	1	0,35
22R	36	25	11	0,7	1,3	38,7	0	1	0,22
23R	56	5	20	6,7	30	50	0	0	0,48
24R	24	25	1	1,3	0	22,7	0	0	0,25
25R	35	13	26,9	3,8	0	41	0	0	0,43
26R	56	13	61,5	9	50	78,2	1	0	0,33
27R	33	24	43,8	7,6	4,2	36,1	1	0	0,33
28R	37	26	4,8	0,6	0	19,2	0	0	1,00
29R	54	27	71,3	27,8	16,7	85,8	1	1	0,36
30R	18	28	51,8	10,7	6,5	51,8	1	0	0,45
31R	24	24	1	0	0	10,4	0	1	0,68

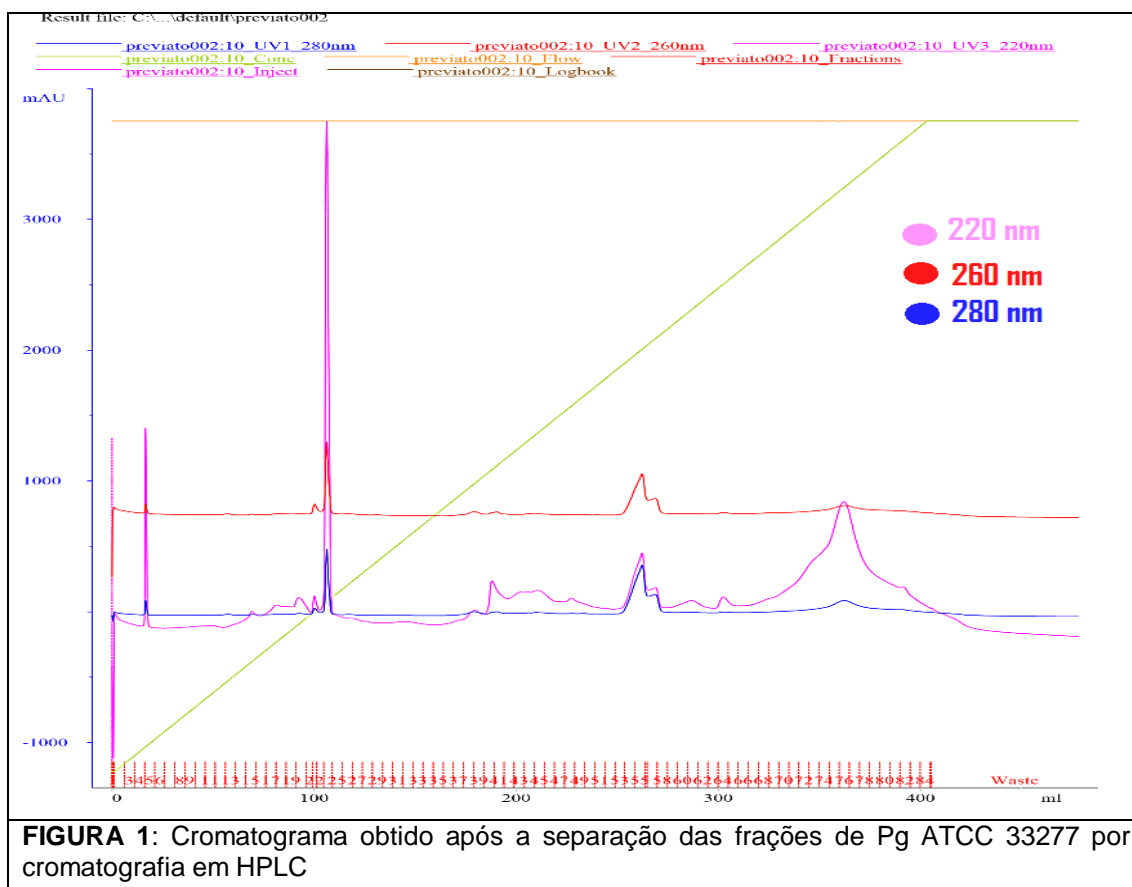
QUADRO 3: Dados clínicos dos 41 indivíduos selecionados (PC= 20, SP= 21), incluindo os participantes dos *pools* PC e SP (PC= 6 , SP= 5). *Pool* PC (verde) e *pool* SP (cinza). ISG: Índice de Sangramento Gengival; PS: Profundidade de Sondagem; NIC: Nível de Inserção Clínica; DP: Diagnóstico Periodontal, DP 0: sem periodontite, DP 1: periodontite crônica; Sexo 0: feminino, Sexo 1: masculino; D.O.: Densidade Ótica (IgG anti-Pg). *Terceiros molares são excluídos. Os pacientes foram codificados segundo números dos prontuários estabelecidos na UEFS.

Após a obtenção dos *pools* de soro PC e SP, o método ELISA indireto foi utilizado para padronização da concentração dos mesmos a serem utilizados nos testes subsequentes. Foram testadas as concentrações de soro 1:1000, 1:250 e 1:100. Foi obtido um coeficiente entre os *pools* PC e SP utilizando a média da D.O. (amostras em triplicata) e a concentração 1:1000 apresentou melhor resultado (QUADRO 4).

Pool	Concentração do Soro		
	1:100	1:250	1:1000
Branco	0,05	0,04	0,04
PC	1,50	1,28	0,77
SP	1,13	0,68	0,26
Coeficiente	1,3	1,9	3,0

QUADRO 4: Nível de IgG específica detectada em cada *pool* de soro diante do extrato de Pg (5µg/mL). A concentração de soro 1:1000 apresentou maior diferença entre os *pools* PC e SP.

O extrato sonicado de *Pg* ATCC 33277 foi aplicado em coluna de troca iônica para separação em HPLC. Foram obtidas cinco frações (1-5) por eluição em presença de um gradiente de cloreto de sódio (0-500 milimolar), que foram liofilizadas e reservadas para a avaliação da antigenicidade (FIGURA 1).



As frações foram, então, submetidas à dosagem de proteínas e verificou-se uma grande variação entre elas (QUADRO 5).

Frações de Pg ATCC 33277	Proteínas (µg/ml)
F1	242
F2	134
F3	355
F4	229
F5	492
NL	829

QUADRO 5: Concentração de proteínas nas frações obtidas de células de Pg ATCC33277 (NL: fração não ligada à coluna)

No teste de ELISA a fração F4 apresentou o maior coeficiente de Densidade Óptica (D.O.) entre os pools de soro de indivíduos do grupo com periodontite crônica e sem periodontite (QUADRO 6).

FRAÇÕES	Pool PC	Pool SP	Coeficiente entre as D.O
F1	281	150	1,87
F2	184,5	128	1,44
F3	338	147	2,3
F4	716	227,5	3,15
F5	1087	526,5	2,06
NL	225,5	103	2,19

QUADRO 6: Avaliação da antigenicidade das frações pelo teste de ELISA.

As frações de *P. gingivalis* foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e as proteínas foram reveladas por Coomassie Blue (FIGURA 2).

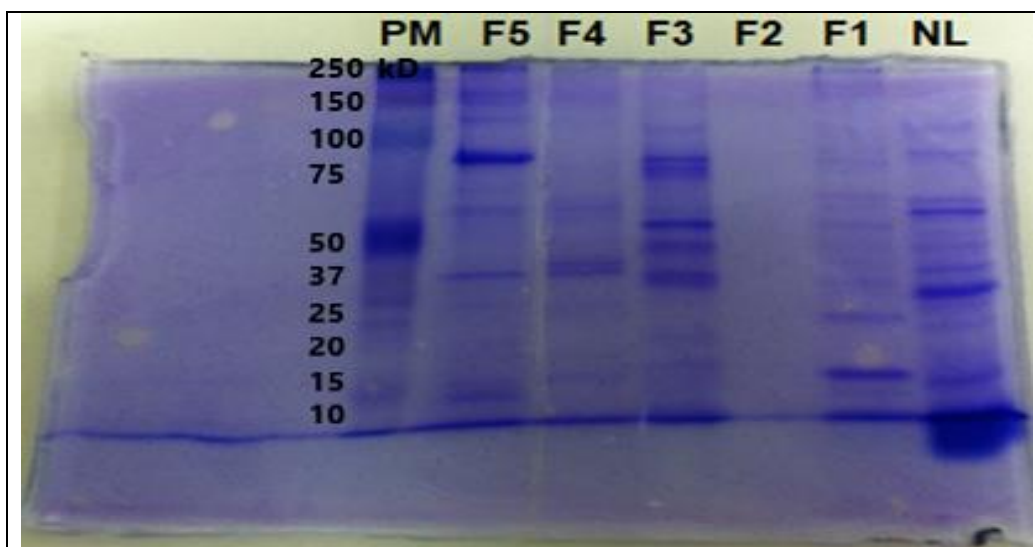


FIGURA 2: Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações obtidas do extrato total de Pg por cromatografia em HPLC (PM: padrão de peso molecular; F5: fração 5; F4: fração 4; F3: fração 3; F2: fração 2; F1: fração 1; NL: proteínas não ligadas à coluna cromatográfica)

Após a eletro-transferência para a membrana de nitrocelulose, a antigenicidade das frações foi testada frente aos pools de soro de pacientes sem periodontite crônica e com a doença, empregando o western blotting (FIGURA 3).

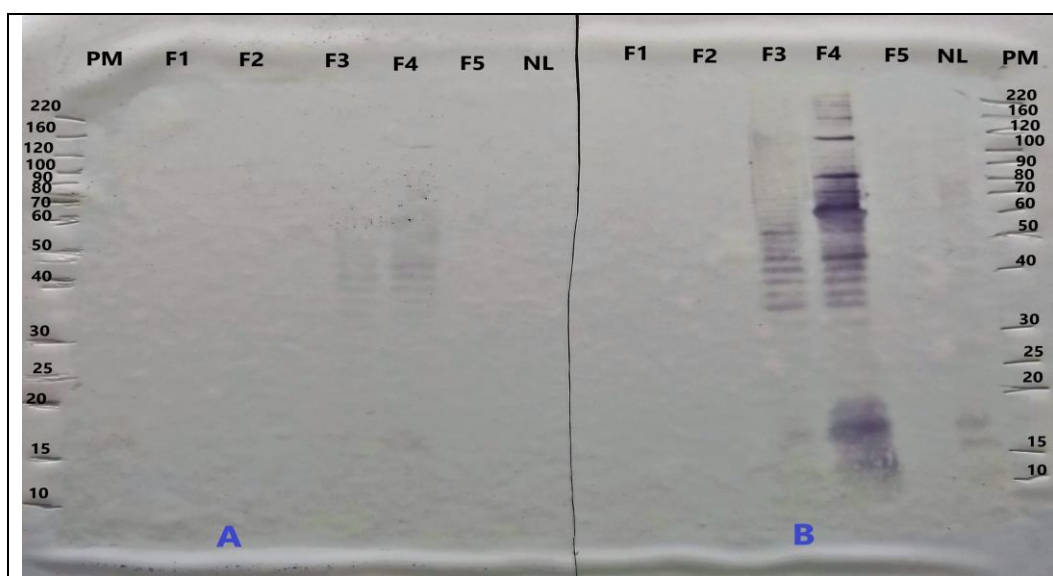


FIGURA 3: Western blotting das frações de Pg utilizando pools de soros de indivíduos sem periodontite crônica (A) e com a doença (B).

Os resultados observados no western blotting mostram o forte reconhecimento pelo pool de soros de pacientes com periodontite crônica frente a fração 4.

Em seguida, as frações foram analisadas por Cromatografia Gasosa seguida de Espectrometria de Massas. Foram observados, 13 tipos de proteínas de *P. gingivalis* presentes nas frações com peso molecular aparente (PM) variando de 27 a 208 kDa (QUADRO 7).

Proteínas identificadas de <i>P. gingivalis</i> ATCC33277	Número de acesso no NCBI	Peso Molecular	F1	F2	F3	F4	F5	NL
Minor fimbrium subunit Mfa1	sp B2RHG1 MFA1_PORG3	61 kDa	X					
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	sp B2RHV8 PCKA_PORG3	59 kDa			X	X		
Chaperone protein DnaK	sp B2RJ90 DNAK_PORG3	69 kDa			X			X
60 kDa chaperonin	sp B2RKS6 CH60_PORG3	58 kDa			X		X	X
Elongation factor Tu	sp B2RL52 EFTU_PORG3	44 kDa		X				
ATP-dependent Clp protease	tr B2RGN2 B2RGN2_PORG3	95 kDa			X	X		
DNA methylase	tr B2RGW0 B2RGW0_PORG3	208 kDa				X		
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	tr B2RH47 B2RH47_PORG3	36 kDa	X		X	X	X	
Probable delta-aminolevulinic acid dehydratase	tr B2RHA5 B2RHA5_PORG3	46 kDa					X	
Uncharacterized protein	tr B2RJE2 B2RJE2_PORG3	31 kDa					X	
AHH nuclease (Toxin module)	tr B2RK38 B2RK38_PORG3	27 kDa					X	
Tetratricopeptide repeat-containing protein	tr B2RKG4 B2RKG4_PORG3	114 kDa			X	X		
Zinc metalloprotease	tr B2RL56 B2RL56_PORG3	49 kDa			X			

QUADRO 7: Proteínas de *P. gingivalis* identificadas por comparação das sequências obtidas por GC-MS e aquelas depositadas no NCBI com seus respectivos pesos moleculares e sua distribuição nas frações.

4. DISCUSSÃO

O extrato total e frações obtidas de *P. gingivalis* ATCC33277 foram estudados por Franca et al. (2007) (17) e Trindade et al. (2008) (18), respectivamente, mostrando que o seu reconhecimento por soros de indivíduos sem periodontite crônica e com a doença era diferenciado. IgG total e subclasses foram avaliadas e uma fração obtida após cromatografia de troca iônica (fração 4) apresentou a maior capacidade de diferenciar entre indivíduos saudáveis e aqueles com diferentes tipos de periodontite (18).

A contribuição deste trabalho foi identificar, de forma pioneira, as proteínas presentes nessas frações de *P. gingivalis*, quanto à sua antigenicidade, e caracterizá-las bioquimicamente para serem utilizadas em estudos da resposta imune à periodontite crônica. A metodologia descrita por Trindade et al. (2008) (18) foi utilizada para a obtenção das frações de *P. gingivalis* a serem estudadas.

Os resultados obtidos confirmaram a Fração 4 como a que propiciou uma maior diferenciação entre os grupos com periodontite crônica e sem a doença, possibilitando separar os grupos quanto a imunogenicidade, como relatado por Trindade et al. 2008 (18). É possível observar a presença de bandas positivas de baixo e alto peso molecular, algumas também observadas na fração 3 e com fraca reação diante do pool de soros dos indivíduos sem doença. Pelo menos quatro destas bandas positivas podem ser observadas apenas na fração 4. Porém, quando se compara esses resultados com os da

espectrometria de massas, observa-se que apenas a DNA metilase de Pg é exclusiva dessa fração.

Com os avanços na metodologia, empregando as técnicas de cromatografia gasosa seguida de espectrometria de massa, foi possível analisar a composição de aminoácidos das proteínas presentes na F4, bem como determinar seu peso molecular e a sequência da cadeia protéica para compará-las com as sequências de proteínas de *P.gingivalis* registradas no banco de dados do NCBI. Foram identificadas cinco proteínas de *P. gingivalis* ATCC33277, com variação de Peso Molecular de 36 a 208 kDa. Estudo anterior mostrou bandas de proteínas de *P.gingivalis* com potencial antigênico entre 35 e 57 kDa (Watanabe et al.) (21). Liu et al. 2004 (22) descreveram uma Arg-gingipaína como uma banda de 55kDa. As gingipaínas se caracterizam como importantes fatores de virulência de *P. gingivalis* com capacidade de alterar a resposta inata do hospedeiro, diminuindo sua defesa contra a bactéria (8,9,10,13,14,15),

Neste trabalho foi possível identificar na fração 4 as seguintes proteínas de *P. gingivalis*; uma gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (36 kDa), uma fosfoenolpiruvato-carboxiquinase (59 kDa), uma protease-ATP dependente (95 kDa), uma proteína contendo um tetratricopeptídeo repetido (114 kDa) e uma DNA metilase (208 kDa). Esta última foi observada apenas na fração 4. Entre elas podemos registrar o reconhecimento pelo pool de soros de pacientes com periodontite crônica nas bandas de 36, 59 e 114 kDa. Foi possível observar bandas positivas com PM entre 35 e 60 kDa, repetindo o perfil descrito por

Trindade et al. 2008 (18) para o reconhecimento pelo soro de pacientes com periodontite crônica.

Diante da variação de peso molecular observada nas proteínas antigênicas presentes na fração 4, as mesmas poderão ser submetidas a uma nova etapa de purificação, agora por cromatografia de exclusão molecular, permitindo que sejam estudadas individualmente para entender seu papel na progressão e desenvolvimento da doença.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho identificou e caracterizou, de forma pioneira, as proteínas presentes nas frações de *Porphyromonas gingivalis*. A Fração 4 foi confirmada como a que apresenta maior capacidade de diferenciar indivíduos sem periodontite crônica daqueles com a doença. As proteínas de *P. gingivalis* presentes na fração 4 poderão ser estudadas de forma individualizada para avaliar seu papel na resposta imune à periodontite crônica.

REFERÊNCIAS

1. Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol 2000*. 2012; 60:15–39.
2. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999; 4(1):1-6.
3. Olsen I, Progulsk-Fox A. Invasion of *Porphyromonas gingivalis* strains into vascular cells and tissue. *J Oral Microbiol*. 2015; 7: 28788 -92.
4. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2015; 15(1): 30–44.
5. Ilievski V, Kinchen JM, Prabhu R, Rim F, Leoni L, Unterman TG, et al. Experimental Periodontitis Results in Prediabetes and Metabolic Alterations in Brain, Liver and Heart: Global Untargeted Metabolomic Analyses. *J Oral Biol (Northborough)*. 2016; 3(1): 1-27.
6. Mesia R, Gholami F, Huang H, Clare-Salzler M, Aukhil I, Wallet SM, et al. Systemic inflammatory responses in patients with type 2 diabetes with chronic periodontitis. *BMJ Open Diabetes Research and Care*. 2016; 4: 1-7.
7. Gomes Filho IS, Cruz SS, Rezende EJC, Santos CAST, Soledade KR, Magalhães MD et al. Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight. *J Clin Periodontol*. 2007; 34:957-963.
8. Krauss JL, Potempa J, Lambris JD, Hajishengallis G. Complementary Tolls in the periodontium: How periodontal bacteria modify complement and Toll-like receptor responses to prevail in the host. *Periodontol 2000*. 2010; 52: 141–62.
9. Zhu Y, Dashper SG, Chen YY, Crawford S, Slakeski N, Reynolds EC. *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* synergistic polymicrobial biofilm development. *Plos One*. 2013; 8(8):1-8.
10. Leon VHR, Lima EKNS, Pimentel ACM, Miranda PM, Carvalho Filho PC, Trindade SC, et al. *Porphyromonas gingivalis* e periodontite crônica - avanços recentes. *Rev Bah Odontol*. 2016; 7(2):147-154.
11. Schmidt A, Jentsch H, Stingu CS, Sack U. General immune status and oral microbiology in patients with different forms of periodontitis and healthy control subjects. *Plos One*. 2014; 9(10):1-12.

12. Carvalho PC, Gomes IS, Meyer R, Olczak T, Xavier MT, Trindade SC. Role of *Porphyromonas gingivalis* HmuY in immunopathogenesis of chronic periodontitis. *Mediators Inflamm.* 2016; 2016:1-9.
13. Trindade SC, Olczak T, Gomes-Filho IS, Moura-Costa LF, Cerqueira EMM, Galdino-Neto M, Alves H, Carvalho-Filho PC, Xavier MT, Meyer R. Induction of interleukin (IL)-1b, IL-10, IL-8 and immunoglobulin G by *Porphyromonas gingivalis* HmuY in humans. *J Periodont Res.* 2012; 47: 27–32.
14. Guyodo H, Meuric V, Pottier LL, Martin B, Faili A, Pers JO, et al. Colocalization of *Porphyromonas gingivalis* with CD4+ T cells in periodontal disease. *Fems Immunol Med Microb.* 2012; 64:175–83.
15. Wilensky A, Nahman RT, Potempa J, Shapira L, Nussbaum G. *Porphyromonas gingivalis* Gingipains selectively reduce cd14 expression, leading to macrophage hyporesponsiveness to bacterial infection. *J Innate Immun.* 2015; 7(2):127–35.
16. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, et al. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res.* 2014; 1-8.
17. Franca M, Moura-Costa L, Meyer RJ, Trindade SC, Tunes UR, Freire SM. Humoral immune response to antigens of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 in chronic periodontitis. *J Appl Oral Sci.* 2007;15(3):213-9
18. Trindade SC, Gomes IS, Meyer RJ, Vale VC, Pugliese L, Freire SM. Serum antibody levels against *Porphyromonas gingivalis* extract and its chromatographic fraction in chronic and aggressive periodontitis. *J Int Acad Periodontol.* 2008; 10(2):50-8.
19. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-5.
20. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci.* 1979; 76(9); 4350-4.
21. Watanabe, H., Marsh, P.D., and Ivanyi, L. Detection of immunodominant antigens of periodontopathic bacteria in human periodontal disease. *Oral Microbiol and Immunol.* 1989; 4:159-164.
22. Liu X, Sroka A, Potempa J, Genco CA. Coordinate expression. Of the *Porphyromonas gingivalis* lysine-specific gingipain protein-ase Kgp, arginine-specific gingipain proteinase, RgpA, and the hemoglobin receptor, HmuR. *Biol. Chem.* 2004; 385:1049-57.

ANEXO 1 – Comprovante de aprovação do Comitê de Ética

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição
Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FRAÇÕES IMUNOGÊNICAS DE *Porphyromonas gingivalis* PARA ESTUDOS DA RESPOSTA IMUNE EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE CRÔNICA

Pesquisador: Márcia Tosta Xavier

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 33105914.2.3001.0053

Instituição Proponente: Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências - FUNDECI

Patrocinador Financiamento Próprio

Principal:

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 892.074

Data da Relatoria: 30/10/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa que tem como instituição proponente a Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências – FUNDECI (ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA), curso de Odontologia, que será desenvolvido tendo a Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e o Instituto de Ciências da Saúde - UFBA como instituições coparticipantes. A pesquisadora responsável é MARCIA TOSTA XAVIER, tendo como equipe de pesquisa: Profº Dr. ISAAC SUZART GOMES FILHO (UEFS); Ms. PAULO CIRINO DE CARVALHO FILHO (doutorando UFBA); Ms. ELLEN KARLA NOBRE DOS SANTOS LIMA (doutoranda UFBA); Profª Drª SORAYA CASTRO TRINDADE (coordenadora do estudo na UEFS); Profº Drº URBINO DA ROCHA TUNES (professor titular Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública). O projeto aborda que: "A doença periodontal é multifatorial, caracterizada como um processo infeccioso, gerando desde uma inflamação gengival reversível (gengivite) até à destruição dos tecidos de sustentação dos dentes (periodontite). É uma doença com elevada prevalência na população mundial e sua relação com as condições sistêmicas do paciente tem sido estudada e as observações relatadas mostram a plausibilidade biológica da associação entre periodontite e condições tais como; diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, doenças respiratórias, artrite reumatóide, partos

prematuros e bebês com baixo peso ao nascer. A etiologia bacteriana na doença periodontal é caracterizada por microrganismos gram-negativos,

tais como Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia e Aggregatibacter actinomycetemcomitans. Estes microrganismos possuem vários fatores de virulência que aumentam a infecção e a sua persistência no periodonto. A patogenicidade da doença é mediada pela resposta do hospedeiro à presença destes microrganismos ... Para dar continuidade aos estudos que buscam o entendimento da patogenicidade na periodontite e sua relação com cronicidade e/ou agravamento da doença, este projeto de pesquisa objetiva a obtenção de frações imunogênicas de porphyromonas gingivalis ATCC33277, buscando analisar diversos fatores de virulência desse patógeno como indutor da resposta imune do hospedeiro." (Resumo Formulário Plataforma)

Metodologia Proposta:

"Pacientes com doença periodontal, classificada segundo os diretores clínicos avaliados, serão recrutados na Universidade Estadual de Feira de Santana e, atendendo aos critérios de inclusão no estudo serão divididos em grupos controle e com periodontite. A coleta de sangue será feita após o exame periodontal e o soro será separado e mantido sob congelamento para ser usado nos testes de resposta humoral utilizando as frações obtidas a partir do extrato total de P. gingivalis. A obtenção do extrato será realizada na Universidade Federal da Bahia, a partir do cultivo da bactéria em condições de anaerobiose e a massa de células obtida será submetida à centrifugação e rompimento celular por ultrassom. As frações serão separadas por cromatografia de troca iônica em FPLC usando coluna Mono Q com radicais sulfidríla e o fracionamento será acompanhado por medida da absorção em 280 nm. A análise sorológica será feita no laboratório de pesquisa do curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, empregando o teste de ELISA e o Western blotting será feito após eletroforese das frações em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes." (Resumo Formulário Plataforma)

Critério de Inclusão: "Todos os indivíduos com periodontite crônica e sem a doença terão o seu periodonto examinado de acordo com os descritores clínicos periodontais segundo GOMES-FILHO (2007), aqueles que forem diagnosticados com periodontite crônica comporão o grupo teste (20 pacientes) e aqueles sem periodontite formarão o grupo controle" - (20 pacientes). **Critério de Exclusão:** "Os critérios de exclusão avaliados pela anamnese e considerados para este estudo serão: história de doenças sistêmicas, gestação atual, tratamento periodontal anterior, fumo atual ou anterior, etilismo e uso de antibióticos e antiinflamatórios nos seis meses anteriores à coleta." (Formulário Plataforma). Apresenta Cronograma detalhado no Formulário Simplificado da Plataforma Brasil, assim como Orçamento, estimado no valor de R\$ 67.272,60.

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS

Bairro: Módulo I, MA 17

CEP: 44.031-460

UF: BA

Município: FEIRA DE SANTANA

Telefone: (75)3161-8067

E-mail: cep@uefs.br

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

"Obtenção e caracterização de frações imunogênicas de Porphyromonas gingivalis para estudos de resposta imune na periodontite crônica."

Objetivos Secundários:

- "Obtenção do extrato total de Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 para obtenção de frações antigênicas deste patógeno para estudos de resposta imune na periodontite crônica.
- Fracionamento do extrato total de Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 para obtenção de frações antigênicas deste patógeno para estudos de resposta imune na periodontite crônica.
- Avaliação das frações de Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 quanto à antigenicidade frente ao soro de pacientes com periodontite crônica.
- Caracterização bioquímica das frações imunogênicas de Porphyromonas gingivalis ATCC 33277.
- Comparação da sequência de aminoácidos das frações imunogênicas de Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 com sequências de epítomos existentes em bancos de dados na internet.
- Seleção das frações imunogênicas de Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 a serem utilizadas em estudos sobre a resposta imune na periodontite crônica."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

"Durante os exames ou durante a coleta dos fluidos o participante pode sentir um desconforto momentâneo. Os exames periodontais que serão realizados são exames rotineiramente efetuados por dentistas em consultórios ou serviços odontológicos e consistem em observar quantos dentes o participante tem, como está sua gengiva, se ela sangra quando é tocada com um instrumento próprio para fazer esse exame, se tem pus na gengiva. Após a coleta de sangue do braço, que é feita da mesma forma de um exame de sangue normal executado em laboratório de análise, pode formar-se um hematoma (ficar um pouco roxo), mas os profissionais dispõem de meios para contornar estes efeitos indesejáveis, seja auxiliando para conter o pequeno sangramento da gengiva com um bochecho com água gelada ou com um líquido próprio para bochechos (enxaguatório bucal) e/ou com uma pomada própria para dissolver o hematoma (a rouidão no braço), caso aconteça." (TCLE)

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS

Bairro: Módulo I, MA 17

CEP: 44.031-460

UF: BA

Município: FEIRA DE SANTANA

Telefone: (75)3161-8067

E-mail: cep@uefs.br

Benefícios:

"Participando desta pesquisa o participante não receberá nenhum tipo de benefício direto como dinheiro, mas estará contribuindo para a elaboração de um trabalho científico que poderá proporcionar benefícios futuros à sociedade. Os periodontistas (dentistas especializados no estudo e tratamento das estruturas que sustentam os dentes na boca) envolvidos na pesquisa, juntamente com os estudantes de Odontologia que ajudarão no projeto, realizarão gratuitamente o tratamento periodontal, que pode ser de raspagem no local afetado com instrumentos próprios para isso e/ou prescrição do uso de antibióticos para combater infecções." (TCLE)

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é viável do ponto de vista ético, tem relevância social e científica. Embora a Pesquisadora Responsável tenha referido como projeto multicêntrico, na verdade trata-se de projeto com instituições co- participantes conforme Res. 466/12.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Protocolo completo, com anuência das Instituições Co-participantes, no caso específico a UEFS.

Recomendações:

Recomendamos que a Pesquisadora Responsável observe se há real necessidade de disponibilizar o número do telefone celular (pessoal), no TCLE, no sentido de ter sua privacidade resguardada, desde quando há um contato institucional caso os participantes necessitem.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Acatamos o Parecer emitido pela Instituição Proponente da Pesquisa.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Tenho muita satisfação em informar-lhe que o seu Projeto de Pesquisa satisfaz às exigências da Res. 466/12. Assim, seu projeto foi Aprovado, podendo ser iniciada a coleta de dados com os participantes da pesquisa conforme orienta o Cap. IX.3, alínea 5a - Res. 466/12. Relembro que conforme institui a Res. 466/12, Vossa Senhoria deverá enviar a este CEP relatórios anuais de atividades pertinentes ao referido projeto e um relatório final tão logo a pesquisa seja concluída. O não cumprimento poderá implicar no impedimento de apreciação de novos projetos do pesquisador.

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS

Bairro: Módulo I, MA 17

CEP: 44.031-460

UF: BA

Município: FEIRA DE SANTANA

Telefone: (75)3161-8067

E-mail: cep@uefs.br

Continuação do Parecer: 892.074

Em nome dos membros CEP/UEFS, desejo-lhe pleno sucesso no desenvolvimento dos trabalhos e, em tempo oportuno, um ano, este CEP aguardará o recebimento dos referidos relatórios.

FEIRA DE SANTANA, 07 de Dezembro de 2014

**Assinado por: Zannety Conceição Silva do Nascimento Souza
(Coordenador)**

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS

Bairro: Módulo I, MA 17

CEP: 44.031-460

UF: BA

Município: FEIRA DE SANTANA

Telefone: (75)3161-8067

E-mail: cep@uefs.br

ANEXO 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido



BAHIANA
ESCOLA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

CURSO DE ODONTOLOGIA

PROJETO: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FRAÇÕES IMUNOGÊNICAS DE *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* PARA ESTUDOS DA RESPOSTA IMUNE EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE CRÔNICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Para ser lido para ou por todos os participantes do estudo.

Documento apresentado em duas vias de igual teor em que uma será entregue ao participante e a outra será mantida com o pesquisador responsável pela pesquisa.

As informações a seguir descrevem o estudo e os seus direitos como participante. Além do que for aqui esclarecido, o entrevistador poderá responder qualquer questão que você tenha referente ao estudo. Por favor, leia ou ouça com atenção e sempre que achar necessário interrompa para perguntar.

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa. Antes de decidir, é importante que você entenda o porquê da realização desta pesquisa e o que ela envolve. Por favor, dedique um tempo para ler cuidadosamente as informações seguintes e se preferir, discutir com seus familiares, amigos ou com seu médico. Se você desejar, pode levar este material para casa para pensar melhor. Nos pergunte se houver qualquer coisa que não esteja clara ou se precisar de mais informações.

Justificativa e Objetivos do estudo: A Periodontite (doença que causa inflamação do periodonto que corresponde às estruturas que sustentam os dentes na boca; a gengiva, o osso e outras), é uma doença que se caracteriza por uma inflamação e perda do osso que envolve os dentes, levando ao amolecimento dos dentes, mau hálito e até mesmo a comprometimentos da saúde geral da pessoa. O estudo das células e moléculas, componentes envolvidos no processo inflamatório, será importante para compreender melhor a atividade desta doença, os fatores que aumentam o risco para contraí-la e tentar encontrar formas para prevenir, controlá-la e tratá-la. Os resultados nos ajudarão a ter uma melhor compreensão desta doença e poderão possibilitar um crescimento científico relacionado a este tema. **Os objetivos deste estudo são:** Crescer e obter massa celular de um agente causador da doença, a bactéria *Porphyromonas gingivalis*, obter um extrato dessas células, fracioná-lo e testar se soros de participantes do estudo, com e sem a doença, vão reconhecer essas frações e, então, aquelas que forem reconhecidas vão ser estudadas para entender melhor o desenvolvimento da doença em seres humanos.

Procedimentos: Serão realizados: preenchimentos de questionários com perguntas sobre sua saúde e seus hábitos de higiene da boca e exames para diagnóstico da doença periodontal realizado por dentistas (utilizando-se instrumentos apropriados para avaliar a gengiva). Será coletada uma amostra de sangue do braço (exame de sangue) por uma pessoa treinada para isso. Todo o material coletado será, depois de feitos os exames necessários para este projeto, jogado fora.

Os desconfortos ou riscos esperados: Durante os exames ou durante a coleta dos fluidos você pode sentir um desconforto momentâneo. Os exames periodontais que serão realizados são exames rotineiramente efetuados por dentistas em consultórios ou serviços odontológicos e consistem em observar quantos dentes você tem, como está sua gengiva, se ela sangra quando é tocada com um instrumento próprio para fazer esse exame, se tem pus na gengiva. Após a coleta de sangue do seu braço, que é feita da mesma forma de um exame de sangue normal executado em laboratório de análise, pode formar-se um hematoma (ficar um pouco roxo), mas os profissionais dispõem de meios para contornar estes efeitos indesejáveis, seja lhe auxiliando para conter o pequeno sangramento da gengiva com um bochecho com água gelada ou com um líquido próprio para bochechos (enxaguatório bucal) e/ou com uma pomada própria para dissolver o hematoma (a rouidão no braço), caso aconteça.

Os benefícios que se pode ter: Participando desta pesquisa você **não** receberá nenhum tipo de benefício direto como dinheiro, mas estará contribuindo para a elaboração de um trabalho científico que poderá proporcionar benefícios futuros à sociedade. Os periodontistas (dentistas especializados no estudo e tratamento das estruturas que sustentam os dentes na boca) envolvidos na pesquisa, juntamente com os estudantes de Odontologia que ajudarão no projeto, realizarão gratuitamente o seu tratamento periodontal, que pode ser de raspagem no local afetado com instrumentos próprios para isso e/ou prescrição do uso de antibióticos para combater infecções.

Garantia de resposta a qualquer pergunta: A qualquer momento, você poderá fazer perguntas sobre esta pesquisa com a garantia de que estas serão respondidas.

Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si: A qualquer momento você poderá entrar em contato com os pesquisadores desta pesquisa e pedir que os seus dados sejam retirados da mesma, sem qualquer prejuízo para o seu atendimento em qualquer das atividades de extensão do curso de Odontologia da Universidade Estadual de Feira de Santana e/ou do curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Garantia de privacidade: Os dados obtidos neste estudo, bem como fotografias que possam ser tiradas, serão apresentados em congressos e encontros da comunidade científica e poderão ser publicados em revistas especializadas. No entanto, **a sua identidade nunca será revelada.** E seu rosto nunca será mostrado totalmente nas fotografias (seus olhos serão cobertos com uma tarja preta).

Disponibilidade de tratamento médico e indenização em caso de danos; garantia de que custos adicionais serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Caso ocorram danos à sua saúde, causados diretamente pela pesquisa, você terá direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Nenhum custo adicional será cobrado a você, pois estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Para o esclarecimento de dúvidas sobre o projeto, você participante pode entrar em contato com a pesquisadora Dra. Márcia Tosta Xavier nos telefones (71) 99830878. Em caso do não cumprimento do que foi acordado, as denúncias podem ser feitas ao Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Então, estando de acordo, assinam:

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura do pesquisador

Assinatura da testemunha

Local e Data: _____

Dra. Márcia Tosta Xavier; Prof. Adjunta do Curso de Odontologia
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública - Campus Cabula.
Avenida Silveira Martins 3386; Salvador/Bahia; Tel.: (71) 32578200

ANEXO 3 – Normas Da Revista (Diretrizes para Autores)

Diretrizes para Autores

INSTRUÇÕES GERAIS

1. O manuscrito deverá ser escrito em idioma português, de forma clara, concisa e objetiva.
2. O texto deverá ter composição eletrônica no programa Word for Windows (extensão doc.), usando-se fonte Arial, tamanho 12, folha tamanho A4, espaço duplo e margens de 3 cm, perfazendo um máximo de 15 páginas, excluindo referências, tabelas e figuras.
3. O número de tabelas e figuras não deve exceder o total de seis (exemplo: duas tabelas e quatro figuras).
4. As unidades de medida devem seguir o Sistema Internacional de Medidas.
5. Todas as abreviaturas devem ser escritas por extenso na primeira citação.
6. Na primeira citação de marcas comerciais deve-se escrever o nome do fabricante e o local de fabricação entre parênteses (cidade, estado, país).

ESTRUTURA DO MANUSCRITO

1. Página de rosto
 - 1.1 Título: escrito no idioma português e inglês.
 - 1.2 Autor(es): Nome completo, titulação, atividade principal (professor assistente, adjunto, titular; estudante de graduação, pós-graduação, especialização), afiliação (instituição de origem ou clínica particular, departamento, cidade, estado e país) e e-mail. O limite do número de autores é seis, exceto em casos de estudo multicêntrico ou similar.
 - 1.3 Autor para correspondência: nome, endereço postal e eletrônico (e-mail) e telefone.
 - 1.4 Conflito de interesses: Caso exista alguma relação entre os autores e qualquer entidade pública ou privada que possa gerar conflito de interesses, esta possibilidade deve ser informada.

Observação: A página de rosto será removida do arquivo enviado aos avaliadores.
 2. Resumo estruturado e palavras-chave (nos idiomas português e inglês)
 - 2.1 Resumo: máximo de 200 palavras, em idioma português e inglês (Abstract).

O resumo deve ser estruturado nas seguintes divisões:

 - Artigo original: Objetivo, Metodologia, Resultados e Conclusão (No Abstract: Purpose, Methods, Results, Conclusions).
 - Relato de caso: Objetivo, Descrição do caso, Conclusão (No Abstract: Purpose, Case description, Conclusions).
 - Revisão de literatura: a forma estruturada do artigo original pode ser seguida, mas não é obrigatória.
 - 2.2 Palavras-chave (em inglês: Key words): máximo de seis palavras-chave, preferentemente da lista de Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) ou do Index Medicus.

3. Texto

3.1 Artigo original de pesquisa: deve apresentar as seguintes divisões: Introdução, Metodologia (ou Casuística), Resultados, Discussão e Conclusão.

- Introdução: deve ser objetiva e apresentar o problema, justificar o trabalho e fornecer dados da literatura pertinentes ao estudo. Ao final deve apresentar o(s) objetivo(s) e/ou hipótese(s) do trabalho.

- Metodologia (ou Casuística): deve descrever em seqüência lógica a população/amostra ou espécimes, as variáveis e os procedimentos do estudo com detalhamento suficiente para sua replicação. Métodos já publicados e consagrados na literatura devem ser brevemente descritos e a referência original deve ser citada. Caso o estudo tenha análise estatística, esta deve ser descrita ao final da seção.

Todo trabalho de pesquisa que envolva estudo com seres humanos deverá citar no início desta seção que o protocolo de pesquisa foi aprovado pela comissão de ética da instituição de acordo com os requisitos nacionais e internacionais, como a Declaração de Helsinki.

O número de registro do projeto de pesquisa no SISNEP/Ministério da Saúde ou o documento de aprovação de Comissão de Ética equivalente internacionalmente deve ser enviado como arquivo suplementar na submissão on-line (obrigatório). Trabalhos com animais devem ter sido conduzidos de acordo com recomendações éticas para experimentação em animais com aprovação de uma comissão de pesquisa apropriada e o documento pertinente deve ser enviado como arquivo suplementar.

- Resultados: devem ser escritos no texto de forma direta, sem interpretação subjetiva. Os resultados apresentados em tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto.

- Discussão: deve apresentar a interpretação dos resultados e o contraste com a literatura, o relato de inconsistências e limitações e sugestões para futuros estudos, bem como a aplicação prática e/ou relevância dos resultados. As inferências, deduções e conclusões devem ser limitadas aos achados do estudo (generalização conservadora).

- Conclusões: devem ser apoiadas pelos objetivos e resultados.

3.2 Relatos de caso: Devem ser divididos em: Introdução, Descrição do(s) Caso(s) e Discussão.

4. Agradecimentos: Devem ser breves e objetivos, a pessoas ou instituições que contribuíram significativamente para o estudo, mas que não tenham preenchido os critérios de autoria. O apoio financeiro de organização de apoio de fomento e o número do processo devem ser mencionados nesta seção. Pode ser mencionada a apresentação do trabalho em eventos científicos.

5. Referências: Deverão respeitar as normas do International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver Group), disponível no seguinte endereço eletrônico: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

a. As referências devem ser numeradas por ordem de aparecimento no texto e citadas entre parênteses: (1), (3,5,8), (10-15).

b. Em citações diretas no texto, para artigos com dois autores citam-se os dois nomes. Ex: "De acordo com Santos e Silva (1)...". Para artigos com três ou mais autores, cita-se o primeiro autor seguido de "et al.". Ex: "Silva et al. (2) observaram...".

c. Citar, no máximo, 25 referências para artigos de pesquisa, 15 para relato de caso e 50 para revisão de literatura.

d. A lista de referências deve ser escrita em espaço duplo, em seqüência numérica. A referência deverá ser completa, incluindo o nome de todos os autores (até seis), seguido de "et al."

e. As abreviaturas dos títulos dos periódicos internacionais citados deverão estar de acordo com o Index Medicus/ MEDLINE e para os títulos nacionais com LILACS e BBO.

f. O estilo e pontuação das referências devem seguir o formato indicado abaixo

Artigos em periódicos:

Wenzel A, Fejerskov O. Validity of diagnosis of questionable caries lesions in occlusal surfaces of extracted third molars. *Caries Res* 1992;26:188-93.

Artigo em periódicos em meio eletrônico:

Baljoon M, Natto S, Bergstrom J. Long-term effect of smoking on vertical periodontal bone loss. *J Clin Periodontol* [serial on the Internet]. 2005 Jul [cited 2006 June 12];32:789-97. Available from: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1600-051X.2005.00765.x>

Livro:

Paiva JG, Antoniazzi JH. *Endodontia: bases para a prática clínica*. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas; 1988.

Capítulo de Livro:

Basbaum AI, Jessel TM, The perception of pain. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. *Principles of neural science*. New York: McGraw Hill; 2000. p. 472-91.

Dissertações e Teses:

Polido WD. A avaliação das alterações ósseas ao redor de implantes dentários durante o período de osseointegração através da radiografia digital direta [tese]. Porto Alegre (RS): Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 1997.

Documento eletrônico:

Ueki N, Higashino K, Ortiz-Hidalgo CM. *Histopathology* [monograph online]. Houston: Addison Books; 1998. [Acesso em 2001 jan. 27]. Disponível em <http://www.list.com/dentistry>.

Observações: A exatidão das citações e referências é de responsabilidade dos autores. Não incluir resumos (abstracts), comunicações pessoais e materiais bibliográficos sem data de publicação na lista de referências.

6. Tabelas: As tabelas devem ser construídas com o menu "Tabela" do programa Word for Windows, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na ordem de citação no texto (exemplo: Tabela 1, Tabela 2, etc) e inseridas em folhas separadas após a lista de referências. O título deve explicativo e conciso, digitado em espaço duplo na parte superior da tabela. Todas as explicações devem ser apresentadas em notas de rodapé, identificadas pelos seguintes símbolos, nesta seqüência: *,†, ‡, §, ||,,**,††,‡‡. Não sublinhar ou desenhar linhas dentro das tabelas, nem usar espaços para separar colunas. O desvio-padrão deve ser expresso entre parênteses.

7. Figuras: As ilustrações (fotografias, gráficos, desenhos, quadros, etc) serão consideradas como figuras. Devem ser limitadas ao mínimo indispensáveis e numeradas consecutivamente em algarismos arábicos segundo a ordem em que são citadas no texto (exemplo: Figura 1, Figura 2, etc). As figuras deverão ser inseridas ao final do manuscrito, após a lista das legendas correspondentes digitadas em uma página única. Todas as explicações devem ser apresentadas nas legendas, inclusive as abreviaturas existentes na figura.

a. As fotografias e imagens digitalizadas deverão ser coloridas, em formato tif, gif ou jpg, com resolução mínima de 300dpi e 8 cm de largura.

b. Letras e marcas de identificação devem ser claras e definidas. Áreas críticas de radiografias e microfotografias devem estar isoladas e/ou demarcadas. Microfotografias devem apresentar escalas internas e setas que contrastem com o fundo.

c. Partes separadas de uma mesma figura devem ser legendadas com A, B, C, etc. Figuras simples e grupos de figuras não devem exceder, respectivamente, 8 cm e 16 cm de largura.

d. As fotografias clínicas não devem permitir a identificação do paciente. Caso exista a possibilidade de identificação, é obrigatório o envio de documento escrito fornecendo consentimento livre e esclarecido para a publicação.

e. Figuras reproduzidas de outras fontes já publicadas devem indicar esta condição na legenda, e devem ser acompanhadas por uma carta de permissão do detentor dos direitos.

f. OS CASOS OMISSOS OU ESPECIAIS SERÃO RESOLVIDOS PELO CORPO EDITORIAL