



CURSO DE ODONTOLOGIA

THAINÁ ANDRADE RAMOS

**CORRELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS CLÍNICOS
PERIODONTAIS E A EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA DE
FAS-LIGANTE EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE**

**CORRELATION BETWEEN PERIODONTAL CLINICAL
PARAMETERS AND THE RELATIVE GENE EXPRESSION
OF FAS-LIGAND IN INDIVIDUALS WITH PERIODONTITIS**

SALVADOR
2020

THAINÁ ANDRADE RAMOS

**CORRELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS CLÍNICOS
PERIODONTAIS E A EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA DE
FAS-LIGANTE EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE**

**CORRELATION BETWEEN PERIODONTAL CLINICAL
PARAMETERS AND THE RELATIVE GENE EXPRESSION
OF FAS-LIGAND IN INDIVIDUALS WITH PERIODONTITIS**

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cirino de Carvalho Filho

Coorientadora: Prof.^a MSc. Giselle Rocha Pinto

SALVADOR

2020

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos e por dar-me força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, pelo amor incondicional e por realizarem o meu grande sonho.

À minha irmã, meu exemplo de profissional, pelo incentivo e oportunidade de aprendizado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Cirino de Carvalho Filho, pelos ensinamentos, pela compreensão e brilhante orientação e pela confiança em mim depositada.

À minha coorientadora, Prof.^a MSc Giselle Rocha Pinto, pelo apoio, paciência e orientação na condução do trabalho.

Às professoras Dr. Márcia Tosta e Dr. Soraya Trindade, pelo incentivo, exemplo e ensinamentos compartilhados.

Aos membros do PPGIm, pelo acolhimento e carinho.

Aos meus amigos, pelo convívio, pelas palavras carinhosas de força e incentivo e por estarem sempre presentes.

À Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública e a todos os professores que fizeram parte da minha graduação.

Aos pacientes, pela paciência e contribuição no meu crescimento profissional.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	08
2. MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1. SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES	11
2.2. EXAME CLÍNICO PERIODONTAL	12
2.3. DESCRITORES CLÍNICOS PERIODONTAIS	12
2.3.1. Profundidade de sondagem de sulco/bolsa (PS)	12
2.3.2. Índice de sangramento gengival (ISG)	13
2.3.3. Nível de inserção clínica (NIC)	13
2.4. PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO	14
2.4.1. Obtenção de Hmuy de <i>P. gingivalis</i>	14
2.5. COLETA DE SANGUE	14
2.6. SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (CMSP) E CULTURA CELULAR	14
2.7. EXTRAÇÃO TOTAL DE RNA TOTAL, SÍNTESE DE cDNA e TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL (CUSTOM HUMAN RT2 PROFILER™ PCR ARRAY).....	15
2.8. ANÁLISE DOS DADOS	16
3. RESULTADOS	18
3.1. CORRELAÇÃO ENTRE DESCRITORES CLÍNICOS E A EXPRESSÃO GÊNICA DE FAS-LIGANTE (FAS-L)	19
4. DISCUSSÃO	23

5. CONCLUSÃO	26
---------------------------	-----------

REFERÊNCIAS

APÊNDICES

APÊNDICE A - FICHA DE ANAMNESE

APÊNDICE B - PERIOGRAMA

ANEXOS

ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO NO CEP

ANEXO B - DIRETRIZES PARA AUTORES (REVISTA PERIODONTIA)

ANEXO C - ARTIGOS REFERENCIADOS

RESUMO

A periodontite é uma doença multifatorial provocada pela resposta imuno-inflamatória do hospedeiro frente a estímulos de diferentes bactérias. O estudo objetivou correlacionar os parâmetros clínicos periodontais: profundidade de sondagem (PS), índice de sangramento gengival (ISG), nível de inserção clínica (NIC) com a expressão gênica relativa de Fas-L em cultura de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de indivíduos com e sem periodontite estimuladas *in vitro* com a proteína recombinante HmuY de *Porphyromonas gingivalis* (Pg). As amostras de sangue foram coletadas em indivíduos que procuraram os ambulatórios da FOUFBA e UEFS. Foram incluídos 16 indivíduos nos grupos com periodontite (CP) e sem periodontite (SP). As CMSP foram cultivadas por 48 horas utilizando-se células estimuladas com o HmuY. A correlação entre os descritores clínicos periodontais e a expressão gênica de Fas-L foi analisada com o coeficiente de correlação de Spearman. Houve diferenças estatisticamente significantes nas correlações entre a expressão gênica relativa de Fas-L por CMSP sob estímulo de HmuY: ISG ($r_2 = -0,867$ e $p=0,002$) e $PS \geq 4$ ($r_2 = -0,672$ e $p=0,047$). Não houve diferenças na comparação entre a expressão gênica e o $NIC \geq 3$ ($r_2 = -0,583$ e $p=0,099$) e o $NIC \geq 5$ ($r_2 = -0,393$ e $p=0,295$). Nossos dados sugerem que a expressão gênica relativa de Fas-L por CMSP sob estímulo de HmuY é infrarregulada quando os parâmetros ISG e $PS \geq 4$ aumentam, levando a um estado inflamatório crônico na medida em que o dano tecidual avança.

PALAVRAS-CHAVE: Periodontite; *Porphyromonas gingivalis*; PCR em Tempo Real.

ABSTRACT

Periodontitis is a multifactorial disease caused by the host's immune-inflammatory response to stimuli from different bacteria. The study aimed to correlate the periodontal clinical parameters: probing depth (PD), gingival bleeding index (GBI), clinical attachment loss (CAL) with the relative gene expression of Fas-L in peripheral blood mononuclear cell culture (PBMC) of individuals with periodontitis stimulated *in vitro* with the recombinant protein HmuY from *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*). Blood samples were collected from individuals who came to the FOUFBA and UEFS outpatient clinics. 16 individuals were included in the groups with (WP) and nonperiodontitis (NP). PBMCs were cultured for 48 hours using cells stimulated with the HmuY. The correlation between periodontal clinical descriptors and Fas-L gene expression was analyzed using Spearman's correlation coefficient. There were statistically significant differences in the correlation between the relative gene expression of Fas-L by PBMC under HmuY stimulation: GBI ($r_2 = -0.867$ and $p = 0.002$); and $PD \geq 4$ ($r_2 = -0.672$ and $p = 0.047$). There were no differences in the comparison between gene expression and $CAL \geq 3$ ($r_2 = -0.583$ and $p = 0.099$) and $CAL \geq 5$ ($r_2 = -0.393$ and $p = 0.295$). Our data suggest that the relative gene expression of Fas-L by PBMC under HmuY stimulation is not regulated when the GBI and $PD \geq 4$ parameters increase, leading to a chronic inflammatory state as tissue damage progresses.

KEYWORDS: Periodontitis; *Porphyromonas gingivalis*; Real-time PCR.

1. INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença multifatorial, caracterizada como uma inflamação crônica dos tecidos periodontais, onde o hospedeiro, fatores ambientais e bacterianos possuem importante participação. É causada pela interação entre os biofilmes supragengival, subgengival e a resposta inflamatória do hospedeiro¹⁻³. O correto diagnóstico clínico das doenças periodontais está diretamente relacionado à presença de sinais inflamatórios em resposta ao acúmulo de biofilme⁴.

A inflamação dos tecidos periodontais pode ser avaliada pela presença de sangramento como um sinal claro e de fácil avaliação. Os parâmetros clínicos que compreendem medidas como profundidade de sondagem (PS), índice de sangramento gengival (ISG) e nível de inserção clínica (NIC) são comumente utilizadas para avaliar e acompanhar o estado periodontal, permitindo um diagnóstico preciso das doenças periodontais e auxiliar no planejamento do tratamento^{4,5}.

Estudos sobre a patogênese das doenças periodontais sugerem que o início da periodontite tem como fator desencadeador uma comunidade microbiana sinérgica e disbiótica, e não apenas um grupo específico de bactérias, os “periodontopatógenos”. Bactérias encontradas em baixa quantidade na microbiota têm efeito em toda comunidade e por serem componentes críticos para o desenvolvimento da disbiose, são conhecidas como patógenos “pedra-chave”⁶.

O exemplo mais autêntico, responsável pelo início e progressão da periodontite, é *Porphyromonas gingivalis*, um bacilo Gram-negativo (G-) anaeróbio estrito, da família Bacteroidacea^{3,7,8}. Esta bactéria expressa diversos fatores de virulência como proteínas da cápsula, lipopolissacarídeo (LPS), fímbrias e proteínas

da membrana externa, como as gingipaínas ligadas e secretadas, podendo determinar uma grande imunogenicidade ao estimular mecanismo da imunidade inata e adaptativa, tanto na resposta imune humoral quanto na resposta imune celular do hospedeiro⁹.

Porphyromonas gingivalis possui a capacidade de invadir localmente os tecidos periodontais e evadir os mecanismos de defesa do hospedeiro, captando nutrientes no ambiente, favorecendo assim, sua sobrevivência, proliferação e infecção, sendo o ferro um dos nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento, encontrado em maior quantidade no hospedeiro na forma de heme^{10,11}.

Essa bactéria adquire heme das proteínas do hospedeiro através da proteólise e transporta o heme para a célula bacteriana usando receptores de membrana externa. Através de um sistema de captação de heme, *P. gingivalis* utiliza a proteína HmuY. Esta proteína é um fator virulento, mas também pode ser antigênica e imunogênica¹²⁻¹⁴.

Destarte, os mecanismos responsáveis pela progressão da doença periodontal permanecem incompreensíveis¹⁵. Estudos sugeriram que a apoptose pode ser um mecanismo envolvido com a progressão da periodontite. Conhecida como "morte celular programada", a apoptose desempenha um papel significativo na regulação da resposta imune do hospedeiro, podendo ser modulada por diversos estímulos, incluindo citocinas, infecções bacterianas e virais, células imunes e mudanças nos fatores de crescimento, nutrientes e matriz extracelular¹⁶.

A apoptose pode ser induzida por receptores de superfície celular, tais como Fas e receptores do Fator de Necrose Tumoral-1 (TNFR-1) (via extrínseca) ou por vários agentes genotóxicos, insultos metabólicos ou sequências transcricionais (via intrínseca). A ativação sequencial de caspases, desempenha um papel central na

fase de execução da apoptose. A via extrínseca pode ignorar a etapa mitocondrial e ativar diretamente a caspase-8, que leva à ativação da caspase-3 e destruição celular. Uma das vias apoptóticas mais bem definidas é mediada pelo complexo de receptores de morte Fas e Fas-Ligante (Fas-L)^{17,18}.

Fas-L (CD95-L) é uma proteína de membrana do tipo II dentro da superfamília dos receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNF). Esta molécula envolve e trimeriza o receptor de morte Fas (CD95) nas superfícies celulares para iniciar a via apoptótica extrínseca. Sendo assim, em resposta a muitos patógenos bacterianos, o hospedeiro responde desencadeando a morte celular dependente de Fas-L como uma resposta inflamatória do sistema imune inato¹⁹.

No periodonto, a expressão de genes associados à apoptose é aumentada quando o tecido gengival saudável é exposto a bactérias periodontais patogênicas. Portanto, Fas e Fas-L são associados à periodontite²⁰.

Assim sendo, este trabalho objetiva correlacionar os parâmetros clínicos periodontais: profundidade de sondagem (PS), índice de sangramento gengival (ISG) e nível de inserção clínica (NIC) com a expressão gênica relativa de Fas-Ligante (Fas-L) em cultura de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de indivíduos com periodontite estimuladas *in vitro* com a proteína recombinante HmuY de *Porphyromonas gingivalis* (Pg).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES

O presente estudo foi realizado com 16 voluntários, sendo 08 portadores de periodontite (CP) e 08 sem a doença (SP), para a avaliação da expressão gênica relativa de Fas-Ligante, induzida por HmuY de *Porphyromonas gingivalis*, com idades acima de 18 anos e de ambos os sexos, que procuraram os ambulatórios da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA) e da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) para tratamento. Foram examinados de acordo com os descritores clínicos periodontais: profundidade de sondagem (PS), índice de sangramento gengival (ISG) e nível de inserção clínica (NIC) e aqueles que apresentaram 4 ou mais dentes com um ou mais sítios com profundidade de sondagem maior ou igual a 4 mm, perda de inserção clínica maior ou igual a 3 mm no mesmo sítio em pelo menos 2 dentes e presença de sangramento ao estímulo compuseram o grupo teste²¹.

Os critérios de não inclusão avaliados pela anamnese (APÊNDICE A) e considerados para este estudo foram: diabetes, hipertensão, doenças autoimunes, doenças reumáticas, gestação atual, tratamento periodontal anterior, tabagismo atual ou anterior, uso de antibióticos e anti-inflamatórios, respectivamente, nos três meses anteriores à coleta.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Estadual de Feira de Santana (CAAE n.º 0203.0.059.000-11) (ANEXO A). Os participantes receberam as devidas informações sobre a pesquisa, e posteriormente,

foram preenchidos os formulários para obtenção e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, permanecendo uma cópia com os mesmos.

2.2. EXAME CLÍNICO PERIODONTAL

A avaliação da condição periodontal foi realizada por um único examinador devidamente calibrado (P.C.C.F.) (Coeficiente Kappa para concordância intra-examinador = 0,932) utilizando como referência os descritores clínicos periodontais²¹. O registro foi realizado na ficha de periograma formulada para o presente estudo (APÊNDICE B). O examinador estava cego para a condição dos participantes no momento da avaliação clínica periodontal.

2.3. DESCRITORES CLÍNICOS PERIODONTAIS

2.3.1. Profundidade de sondagem de sulco/bolsa (PS)

A profundidade de sondagem foi registrada em 6 locais para cada dente²², e consiste em quatro medidas proximais (ângulos mésio-vestibular, mésio-lingual, disto-vestibular e disto-lingual), uma medida na região médio-vestibular e uma medida na região médio-lingual.

As medidas foram feitas com sonda milimetrada do tipo Williams da marca Trinity® (Trinity Indústria e Comércio Ltda., Jaraguá, São Paulo, Brasil). A profundidade de sondagem foi registrada em cada local significando a distância da margem gengival à extensão mais apical de penetração da sonda.

2.3.2. Índice de sangramento gengival (ISG)

Para avaliar a condição gengival foi utilizado como parâmetro o Índice de Sangramento²⁴, usando o critério da presença de sangramento após a sondagem.

Aproveitando a oportunidade da obtenção dos registros de profundidade de sondagem de sulco/bolsa e após a secagem das superfícies dentárias e medição da profundidade de sondagem de sulco/bolsa, observou-se depois de passados 10 segundos a presença ou não de sangramento após a remoção da sonda milimetrada da bolsa ou sulco. Quando foi observado sangramento subsequente à sondagem em determinada face, o registro foi feito no periograma. A proporção de faces sangrantes em relação ao total de faces examinadas foi calculada, determinando assim o índice de sangramento para cada indivíduo.

2.3.3. Nível de inserção clínica (NIC)

A medida de inserção clínica foi obtida através da somatória dos valores da profundidade de sondagem de sulco/bolsa e medidas de recessão ou hiperplasia gengivais²³. No caso de uma recessão, o nível de inserção clínica foi a soma dos valores de profundidade de bolsa e da medida de recessão. No caso de uma hiperplasia gengival, a somatória do valor positivo da profundidade de bolsa com o valor negativo dado à hiperplasia, ou seja, na prática representou a subtração do valor da hiperplasia daquele atribuído à profundidade de sondagem de bolsa. Finalmente, seis medidas de nível de inserção clínica foram obtidas: méso-vestibular, médio-vestibular, disto-vestibular, disto-lingual, médio-lingual e méso-lingual.

2.4. PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO

2.4.1. Obtenção de Hmuy de *P. gingivalis*

O polipeptídeo HmuY de *P. gingivalis* sem os primeiros 25 resíduos de aminoácidos (NCBI accession no. CAM 31898) foi sobre-expresso usando o plasmídeo pHmuY11 em células de *Escherichia coli* ER2566 (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, EUA), posteriormente purificado a partir de uma fração solúvel de *E. coli* lisada como anteriormente descrito¹³. Endotoxinas contaminantes foram removidas das amostras de HmuY utilizando colunas de remoção de endotoxina Detoxi-Gel (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, EUA). O peptídeo foi cedido pelo Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Biotecnologia da Universidade de Wroclaw, Polônia. HmuY foi preparado para utilização na concentração final de 2,5 µg/mL.

2.5. COLETA DE SANGUE

O sangue dos indivíduos foi coletado em um volume de 20 mL, por punção venosa na fossa ante-cubital com tubo à vácuo estéril (BD-SP) com Heparina.

2.6. SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMSP) E CULTURA CELULAR

As células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram obtidas de amostras de sangue periférico e purificadas por centrifugação em gradiente de

densidade utilizando ficoll-hipaque de acordo com instrução do fabricante (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA). Todas as células foram lavadas duas vezes em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil) e as CMSP foram cultivadas em placas de 24 poços (10^6 células/poço) em RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (proteínas do complemento inativadas por calor) e 1% de solução com antibiótico/antimicótico (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA). Todas as culturas cresceram por 48 horas à 37°C sob 5% de CO₂ em condições de umidade. As células foram incubadas com 5 pg/mL do mitógeno pokeweed (PWM) como controle positivo, 2,5 pg/mL de HmuY, ou na ausência de antígenos (células). Após a cultura, as células e os sobrenadantes foram criopreservados em freezer -70°C para uso posterior.

2.7. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL, SÍNTESE DE CDNA E TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL (CUSTOM HUMAN RT2 PROFILER™ PCR ARRAY)

O RNA total foi extraído de todas as amostras da cultura de CMSP, utilizando o RNeasy Mini Kit da QIAGEN (número de catálogo: 74104). O RNA obtido foi imediatamente convertido em DNA complementar (cDNA).

A partir de 1 µg de RNA total foi confeccionada a fita de cDNA por transcrição reversa (RT2 First Strand Kit - SABioscience (cod. C03)). Inicialmente foram adicionados à amostra de RNA, 2 µl do GE (5X gDNA Elimination Buffer) e o volume final da reação foi ajustado para 10 µl com água livre de RNase. A amostra foi submetida ao termociclador (QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System 384-well block (Applied Biosystems)) a 42°C durante 15 minutos e imediatamente após esse período foi adicionado a essa amostra um coquetel, previamente preparado,

contendo 4 µl do tampão BC3 (5X RT Buffer 3), 1 µl do P2 (Primer and External Control Mix), 2 µl do RE3 (RT Enzyme Mix 3) e 3 µl de água livre de RNase, que foi aquecida a 95°C por 5 minutos. Ao final desta reação o cDNA foi diluído com 91 µl de água e estocado a -20°C até o momento do uso.

Após a amplificação das amostras, os cálculos da expressão diferencial foram realizados por um programa específico de análise de dados online (RT² Profiler PCR Array data analysis SuperArray - SABiosciences). Os genes que apresentaram valores de ciclo threshold (Ct) acima de 35 foram considerados não expressos. A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de 2- $\Delta\Delta$ Ct. Desta forma os dados foram representados como diferença (fold regulation) na expressão gênica. O software identificou o gene referência mais estavelmente expresso para normalização dos dados. Dos 42 genes analisados em trabalho anterior²⁵, foi selecionado o gene Fas-Ligante para as análises de correlação com os parâmetros clínicos periodontais por apresentar infrarregulação no grupo com periodontite e diferença estatisticamente significativa (p<0,01).

2.8. ANÁLISE DOS DADOS

Para a expressão gênica, as análises estatísticas foram realizadas utilizando um software online de análise de dados (RT² Profiler PCR Array data analysis - SABiosciences). O programa realizou todos os cálculos de diferença de expressão baseado no $\Delta\Delta$ Ct.

A comparação dos níveis de expressão gênica de Fas-L entre os indivíduos com e sem periodontite foi realizada com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para correlacionar a expressão gênica com os descritores clínicos periodontais foi

empregado o Coeficiente de Correlação de Spearman. Os dados foram analisados no programa estatístico SPSS 22.0 (Statistical Package for Social Science, USA) e foi considerado como estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Participaram do presente estudo 16 indivíduos, de acordo com os critérios de inclusão, retirando os que se recusaram e os que não atenderam os critérios de não inclusão. O grupo com periodontite (CP) foi composto por 08 participantes, e o grupo sem periodontite (SP) foi composto, também, por 08 participantes. A média de idade dos participantes do grupo CP foi de 43,88 anos \pm 13,9 anos, enquanto que a do grupo SP foi de 36,63 anos \pm 10,8 anos, com limite mínimo de 18 anos e máximo de 57 anos em ambos os grupos. Com relação ao sexo dos voluntários, 6 (75%) eram do sexo feminino e 2 (25%) eram do sexo masculino, entre os participantes de ambos os grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa na média da idade ($p=0,223$) e na proporção de indivíduos dos sexos masculino ou feminino ($p=1,000$) entre os dois grupos, demonstrando que ambos foram homogêneos no que diz respeito a estas duas covariáveis (Tabela 1).

Em relação aos aspectos relacionados à condição periodontal, houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos em todos os descritores clínicos avaliados.

Tabela 1. Achados clínicos de indivíduos sem periodontite (SP) e com diagnóstico de periodontite (CP).

	GRUPO SP	GRUPO CP	p*
	n=8	n=8	
Número de			
Homens/Mulheres	2/6	2/6	1,000

Idade (anos) (Média ± DP)	36,63 ± 10,8	43,38 ± 13,9	0,223
Número de Dentes (Média ± DP)	20,13 ± 6,2	20,31 ± 6,5	0,983
% ISG (Média ± DP)	11,49 ± 8,78	46,23 ± 14,43	0,001
% PS ≥ 4 (Média ± DP)	1,01 ± 1,55	16,33 ± 11,44	0,000
% NIC ≥ 3 (Média ± DP)	20,40 ± 14,03	61,87 ± 17,34	0,001
% NIC ≥ 5 (Média ± DP)	0,45 ± 1,27	23,26 ± 16,72	0,000

DP - Desvio Padrão, ISG - Índice de Sangramento Gengival, PS - Profundidade de Sondagem, NIC - Nível de Inserção Clínica.

3.1. CORRELAÇÃO ENTRE DESCRITORES CLÍNICOS PERIODONTAIS E A EXPRESSÃO GÊNICA DE FAS-LIGANTE (FAS-L)

Na correlação entre o descritor clínico periodontal índice de sangramento gengival e a expressão de Fas-L é possível observar infrarregulação e diferença estatisticamente significativa ($r_2 = -0,867$ e $p = 0,002$) (Figura 1), assim como na correlação entre o descrito clínico profundidade de sondagem maior ou igual a 4 mm e a expressão de Fas-L ($r_2 = -0,672$ e $p = 0,047$) (Figura 2). Entretanto, na correlação entre o descritor clínico NIC maior ou igual a 3 mm e a expressão de Fas-L observa-se uma infrarregulação, porém sem diferença estatisticamente significativa ($r_2 = -0,583$ e $p = 0,099$) (Figura 3), resultado também observado na correlação entre o descritor

clínico NIC maior ou igual a 5 mm e a expressão gênica de Fas-Ligante ($r_2 = -0,393$ e $p=0,295$) (Figura 4).

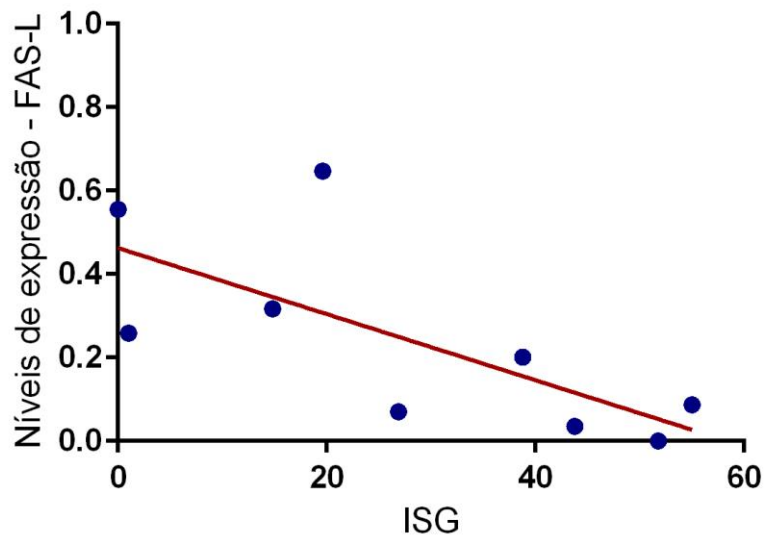


Figura 1. Correlação entre o descritor clínico periodontal ISG e a expressão gênica de Fas-Ligante.

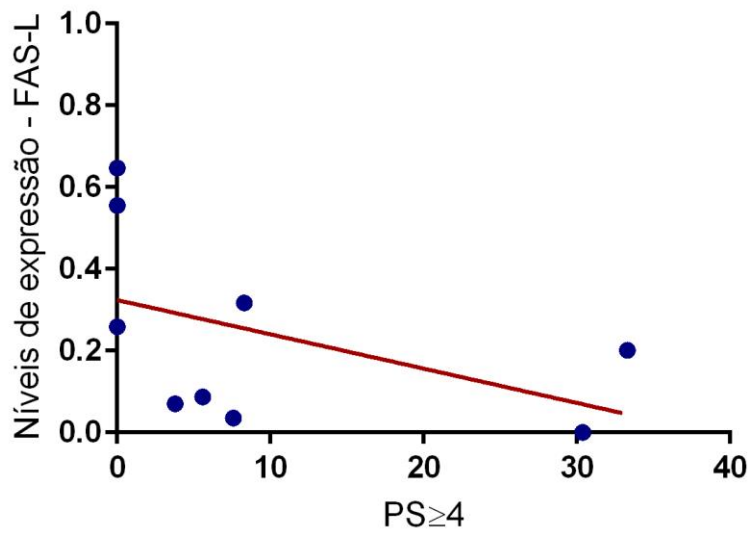


Figura 2. Correlação entre o descritor clínico periodontal PS \geq 4 e a expressão gênica de Fas-Ligante.

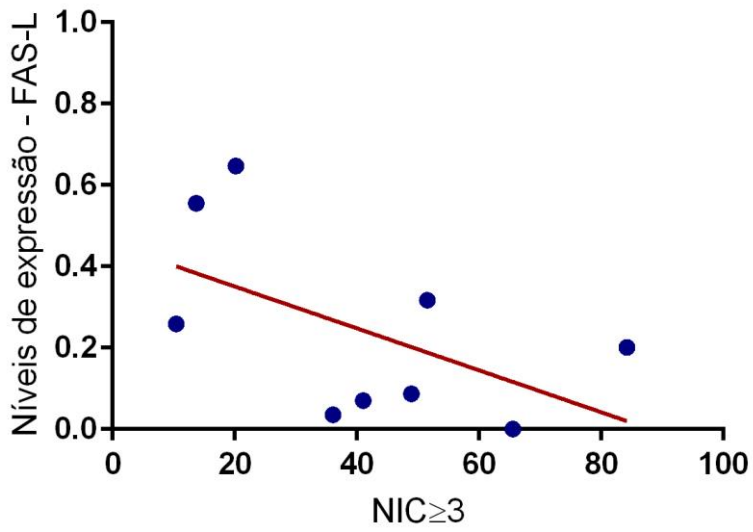


Figura 3. Correlação entre o descritor clínico periodontal NIC≥3 e a expressão gênica de Fas-Ligante.

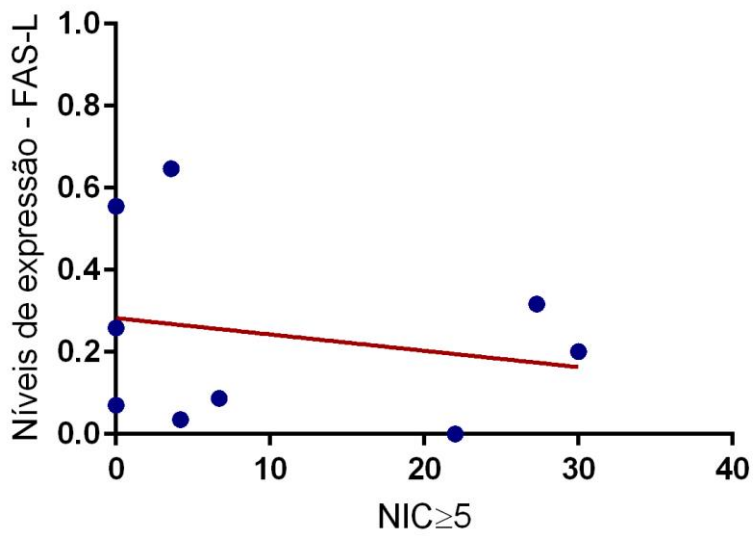


Figura 4. Correlação entre o descritor clínico periodontal NIC≥5 e a expressão gênica de Fas-Ligante.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo encontrou correlação entre o mediador de apoptose (Fas-L) e descritores clínicos periodontais, reafirmando que a apoptose realmente desempenha um papel na periodontite, sendo um importante evento biológico nesse contexto patogênico^{15,26}. A via extrínseca (Fas/Fas-L) é mais relevante para apoptose celular associada ao periodonto, causada pela exposição a patógenos periodontais^{16,27}.

Nossos resultados demonstram infrarregulação na expressão de Fas-L, sob estímulo de HmuY, em indivíduos com maior ISG e maior PS. Estes parâmetros clínicos periodontais indicam inflamação, logo menos apoptose de CMSP mediada por Fas-L está associada a maior inflamação tecidual. Esse resultado corrobora com estudo anterior que identificou que o mRNA do Fas-L foi pouco expresso nos linfócitos das lesões e nos tecidos periodontais, e que as lesões periodontais crônicas são caracterizadas pela persistência de células inflamatórias nos tecidos conjuntivos gengival e periodontal²⁸.

Em oposição, análises da expressão de Fas-L no fluido crevicular gengival correlacionam positivamente esse biomarcador apoptótico e destruição periodontal na periodontite^{29,30,16}, onde observou-se significância estatística para correlação positiva de Fas-L com NIC, com ISG, e tendência de significância com PS^{30,16}. No entanto, no soro, embora presente, nenhuma diferença significativa para Fas-L foi observada entre grupos com e sem periodontite^{16,31}.

Sugere-se que as diferenças encontradas sejam em função do estímulo com HmuY de *Porphyromonas gingivalis*. HmuY desempenha um papel na patogênese da periodontite, possivelmente reduzindo ou retardando a apoptose, permitindo que

células inflamatórias perdurem no tecido periodontal, com consequente progressão da destruição tecidual local^{20,32}.

Estudos anteriores^{32,33} mostram que a proteína HmuY de *P. gingivalis* pode atuar no processo de morte celular. As CMSP cultivadas com essa proteína parecem ser incapazes de concluir o processo de apoptose, resultando em morte pela liberação de material celular inflamatório no microambiente, como a necrose, podendo prolongar o processo de destruição no tecido.

Além disso, a supressão da via da morte pode facilitar a proliferação de patógenos intracelulares²⁷, como a *P. gingivalis*, que é capaz de invadir células e tecidos³⁴, evitando a vigilância imunológica.

Entretanto, é necessário ressaltar que estes achados refletem uma resposta a uma proteína individual, a partir de uma análise *in vitro*, representando apenas um aspecto dos mecanismos desencadeados quando da interação patógeno-hospedeiro. Além da proteína HmuY, a bactéria libera diversas outras moléculas no microambiente, que podem desencadear mecanismos diversos, inclusive antagônicos, como o LPS, que parece levar à suprarregulação na expressão de Fas-L em camundongos com periodontite³⁵. O contato de células epiteliais humanas com o extrato de *P. gingivalis*, contendo diversas moléculas somáticas e secretadas, também levou a uma suprarregulação na expressão de Fas-L³⁶.

Outro achado interessante do presente estudo foi a infrarregulação na expressão gênica relativa de Fas-L sob estímulo de HmuY em indivíduos com maior NIC, embora o estudo de correlação não tenha apresentado significância estatística. Isto pode ser devido ao fato deste parâmetro clínico periodontal representar uma seqüela de destruição tecidual provocada pela doença e não a presença de

inflamação, indicando que os mecanismos relacionados a apoptose poderiam não necessariamente estar ocorrendo em todos os sítios com perda de inserção.

Salienta-se que, embora tenha sido executado com um delineamento rigoroso, garantindo validade interna, o método proposto demanda um custo bastante elevado, o que repercute na diminuição do tamanho da amostra. Sendo assim, estudos com maior número de participantes para avaliar o papel da proteína HmuY de *P. gingivalis* são requeridos para possibilitar outras percepções sobre a imunopatogênese da periodontite. Ademais, as células mononucleares de sangue periférico utilizadas no trabalho não compreendem o ambiente da periodontite, onde as células locais nos tecidos periodontais exercem um papel importante.

Sugere-se que a proteína HmuY de *P. gingivalis* afeta ou retarda o processo de morte celular por apoptose por infrarregulação do mRNA para Fas-L que inicia a via de sinalização extrínseca na periodontite. Por conseguinte, esta infrarregulação mediante a inibição da morte celular por apoptose pode propiciar a infecção de células hospedeiras por *P. gingivalis*, o que produz um mecanismo de escape do sistema imunológico do hospedeiro²⁰.

5. CONCLUSÃO

Sob estímulo de HmuY, observa-se infrarregulação entre a expressão gênica relativa de Fas-L e os parâmetros clínicos periodontais estudados, com significância estatística para o índice de sangramento gengival e profundidade de sondagem, mas não para nível de inserção clínica. Sugere-se a partir desses dados, que a proteína HmuY de *Porphyromonas gingivalis* pode favorecer a sobrevivência das células mononucleares do sangue periférico, através da ausência ou retardo no processo de morte celular por apoptose via Fas/Fas-L, o que pode contribuir para o estado crônico da doença periodontal.

REFERÊNCIAS

1. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Periodontol* 2018; 89(1):173-182.
2. Nagpal R, Yamashiro Y, Izumi Y. The Two-Way Association of Periodontal Infection with Systemic Disorders: An Overview. *Hindawi Publ Corp* 2015; 2015:1-9.
3. Huang N, Gibson FC. Immuno-Pathogenesis of Periodontal Disease: Current and Emerging Paradigms. *Curr Oral Heal Reports* 2014; 1(2):124-132.
4. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 2004; 34(1):9-21.
5. Lorentz TCM. Estudo coorte prospectivo em terapia de manutenção periodontal: análise de parâmetros clínicos periodontais, progressão de periodontite, perda dentária e de modelo multifuncional para avaliação do risco periodontal [Tese de doutorado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia, 2007. 172p.
6. Hajishengallis G, Lamont RJ. Breaking bad: Manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *Eur J Int* 2014; 44(2):328-338.
7. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol* 2015; 15(1):30-44.
8. 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; 2014:1-8.
9. Zenobia C, Hajishengallis G. *Porphyromonas gingivalis* virulence factors involved in subversion of leukocytes and microbial dysbiosis. *Virulence* 2015; 6(3):236-243.
10. Bostanci N, Belibasakis GN. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol Lett* 2012; 333(1):1-9.
11. Smalley JW, Olczak T. Heme acquisition mechanisms of *Porphyromonas*

gingivalis – strategies used in a polymicrobial community in a heme-limited host environment. Mol Oral Microbiol 2017; 32(1):1-23.

12. Trindade SC, Olczak T, Gomes-Filho IS, Moura-Costa LF, Cerqueira EMM, Galdino-Neto M et al. Induction of interleukin (IL)-1 β , IL-10, IL-8 and immunoglobulin G by *Porphyromonas gingivalis* HmuY in humans. J Periodontal Res 2012; 47(1):27-32.

13. Olczak T, Wójtowicz H, Ciuraszkiewicz J, Olczak M. Species specificity, surface exposure, protein expression, immunogenicity, and participation in biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis* HmuY. BMC Microbiol 2010; 10:134-144.

14. Byrne DP, Potempa J, Olczak T, Smalley JW. Evidence of mutualism between two periodontal pathogens: co-operative haem acquisition by the HmuY haemophore of *Porphyromonas gingivalis* and the cysteine protease interpain A (InpA) of *Prevotella intermedia*. Mol Oral Microbiol 2013; 28(3):219-229.

15. Song B, Zhou T, Yang WL, Liu J, Shao LQ. Programmed cell death in periodontitis: recent advances and future perspectives. Oral Dis 2016; 23(5):609-619.

16. Abuhussein H, Bashutski JD, Dabiri D, Halubai S, Layher M, Klausner C et al. The Role of Factors Associated With Apoptosis in Assessing Periodontal Disease Status. J Periodontol 2014; 85(8):1086-1095.

17. Lundmark A, Davanian H, Båge T, Johannsen G, Koro C, Lundeberg J et al. Transcriptome analysis reveals mucin 4 to be highly associated with periodontitis and identifies pleckstrin as a link to systemic diseases. Sci Rep 2015; 5:1-13.

18. Liu YZ, Maney P, Puri J, Zhou Y, Baddoo M, Strong M et al. RNA-sequencing study of peripheral blood monocytes in chronic periodontitis. Gene 2016; 581(2):152-160.

19. Labbé K, Saleh M. Cell death in the host response to infection. Cell Death Differ 2008; 15(9):1339-1349.

20. Carvalho-Filho PC, Trindade SC, Olczak T, Sampaio GP, Oliveira-Neto MG, Santos HA et al. *Porphyromonas gingivalis* HmuY stimulates expression of Bcl-2 and Fas by human CD3+T cells. BMC Microbiol 2013; 13(1):206-212.

21. Gomes-Filho IS, Cruz SS, Rezende EJ, Dos Santos CA, Soledade KR, Magalhães MA et al. Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight. *J Clin Periodontol* 2007; 34(11):957-963.
22. Pihlstrom BL, Ortiz-Campos C, McHugh RB. A randomized four-year study of periodontal therapy. *J Periodontol* 1981; 52(5):227-242.
23. Ramfjord, SP. Indices for prevalence and indice of periodontal disease. *J. Periodontol* 1959; 30(1): 51-59.
24. Newbrun E. Indices to Measure Gingival Bleeding. *J Periodontol* 1996; 67(6):555-561.
25. Carvalho-Filho PC, Moura-Costa LF, Pimentel ACM, Lopes MPP, Freitas SA, Miranda PM et al. Apoptosis Transcriptional Profile Induced by *Porphyromonas gingivalis* HmuY. *Mediators of Inflammation* 2019; 2019:1-8.
26. Zeidán-Chuliá F, Gursoy M, Oliveira BHN, Gelain DP, Könönen E, Gursoy UK et al. Focussed microarray analysis of apoptosis in periodontitis and its potential pharmacological targeting by carvacrol. *Arch Oral Biol* 2014; 59(5):461-469.
27. Weinrauch Y, Zychlinsky A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* 1999; 53:155-187.
28. Sawa T, Nishimura F, Ohyama H, Takahash K, Takashiba S, Murayama Y. In vitro induction of activation-induced cell death in lymphocytes from chronic periodontal lesions by exogenous Fas ligand. *Infect Immun* 1999; 67(3):1450-1454.
29. Makhoul H, Bashutski J, Halubai S, Dabiri D, Benavides E, Kapila YL. Apoptotic activity of gingival crevicular fluid from localized aggressive periodontitis. *J Int Acad Periodontol* 2012; 15(1):2-7.
30. Dabiri D, Halubai S, Layher M, Klausner C, Makhoul H, Lin GH et al. The Role of Apoptotic Factors in Assessing Progression of Periodontal Disease. *Int J Dent Oral Sci* 2016; 3(9):318-325.
31. Queiroz AC, Taba Jr. M, O'connell PA, Nóbrega PB, Costa PP, Kawata VKS. Inflammation markers in healthy and periodontitis patients. A preliminary data screening. *Braz Dent J* 2008; 19(1):3-8.

32. Trindade SC, Olczak T, Gomes-Filho IS, Moura-Costa LF, Vale VL, Galdino-Neto M et al. *Porphyromonas gingivalis* antigens differently participate in the proliferation and cell death of human PBMC. Arch Oral Biol 2012; 57(3):314-320.
33. Carvalho-Filho PC, Trindade SC, Olczak T, Sampaio GP, Oliveira-Neto MG, Santos HA et al. *Porphyromonas gingivalis* HmuY stimulates expression of Bcl-2 and Fas by human CD3+T cells. BMC Microbiol 2013; 13(1):206-212.
34. Yilmaz Ö, Yao L, Maeda K, Rose TM, Emma L, Lewis EL, Duman M. ATP scavenging by the intracellular pathogen *Porphyromonas gingivalis* inhibits P2X₇-mediated host-cell apoptosis. Cell Microbiol 2008; 10(4):863-875.
35. Firth JD, Ekuni D, Irie K, Tomofuji T, Morita M, Putnins EE. Lipopolysaccharide induces a stromal–epithelial signalling axis in a rat model of chronic periodontitis. J Clin Periodontol 2013; 40:8-17.
36. Brozovic S, Sahoo R, Barve S, Shiba H, Uriarte S, Blumberg RS et al. *Porphyromonas gingivalis* enhances FasL expression via up-regulation of NFκB-mediated gene transcription and induces apoptotic cell death in human gingival epithelial cells. Microbiology 2006; 152:797-806.

APÊNDICES

APÊNDICE A - FICHA DE ANAMNESE

INFORMAÇÕES GERAIS

Nome do Paciente	
Endereço	
Telefone	

Data de Nascimento		Idade		Sexo	
Ocupação atual				Local de Trabalho	
Ocupação anterior				Tempo de atividade	

HABITOS DE VIDA

Fumo	Sim	Não	Tipo		N. cig/dia	Meses	
Alcool	Sim	Não	Tipo			anos	
Drogas	Sim	Não	Tipo				

ANTECEDENTES MEDICOS

Alergias	Sim	Não	Tipo		anos
Anemia	Sim	Não	Tipo		anos
Hipertensão Arterial	Sim	Não	Compensada	Sim	Não
Hipotensão Arterial	Sim	Não	Compensada	Sim	Não
Valvulas Artificiais	Sim	Não	Tipo		
Problemas Válvares	Sim	Não	Tipo		
Endocardite Bact	Sim	Não			
Ponte Safena	Sim	Não			
Infarto do Miocárdio	Sim	Não			
Marcapasso	Sim	Não			anos
Angina	Sim	Não	Compensada	Sim	Não
Diabete Tipo I	Sim	Não	Compensada	Sim	Não
Diabete Tipo II	Sim	Não	Compensada	Sim	Não
Hepatite	Sim	Não	Compensada	Sim	Não
Epilepsia	Sim	Não	Compensada	Sim	Não
Dist. Coagulação	Sim	Não	Compensada	Sim	Não
Leucemia	Sim	Não	Compensada	Sim	Não
Tuberculose	Sim	Não	Compensada	Sim	Não
Arteriosclerose	Sim	Não	Compensada	Sim	Não
Osteoporose	Sim	Não	Compensada	Sim	Não
Portador HIV	Sim	Não	Em Tratamento	Sim	Não
Portador HTLV	Sim	Não	Em Tratamento	Sim	Não
Neoplasias	Sim	Não	Em Tratamento	Sim	Não
Radioterapia	Sim	Não	Em Tratamento	Sim	Não
Transplantado	Sim	Não	Em Tratamento	Sim	Não
Leishmaniose	Sim	Não	Em Tratamento	Sim	Não
Esquistossomose	Sim	Não	Em Tratamento	Sim	Não
Hipertireoidismo	Sim	Não	Em Tratamento	Sim	Não
Hipotireoidismo	Sim	Não	Em Tratamento	Sim	Não
Lupus eritematoso	Sim	Não	Em Tratamento	Sim	Não
Artrite Reumatoide	Sim	Não	Em Tratamento	Sim	Não
Febre Reumática	Sim	Não	Em Tratamento	Sim	Não
Doença de Chon	Sim	Não	Em Tratamento	Sim	Não

Colite Ulcerativa	Sim	Não	Em Tratamento	Sim	Não
Malaria	Sim	Não	Em Tratamento	Sim	Não
Herpes	Sim	Não	Em Tratamento	Sim	Não

Já se submeteu a alguma destas cirurgias?

Amigdalectomia	Sim	Não	anos
Adenoidectomia	Sim	Não	anos
Apendicectomia	Sim	Não	anos
Esplenectomia	Sim	Não	anos

Já fez uso destes medicamentos pelo menos um mês/ano. Se sim qual a idade de início e qual a duração do uso?

Fenilbutazona	Sim	Não	Idade-anos	Duração-anos
Corticoide	Sim	Não	Idade-anos	Duração-anos
Indometacina	Sim	Não	Idade-anos	Duração-anos
Cloranfenicol	Sim	Não	Idade-anos	Duração-anos
Imunossupressor	Sim	Não	Idade-anos	Duração-anos
Amoxicilina	Sim	Não	Idade-anos	Duração-anos
Metronidazol	Sim	Não	Idade-anos	Duração-anos
Hormônios	Sim	Não	Idade-anos	Duração-anos

Última vez que foi ao Dentista		O que realizou?		
Já fez Tratamento Periodontal?	Sim	Não	Em Trat.	Sim
Já fez Tratamento Ortodôntico?	Sim	Não	Em Trat.	Sim
Família com Doença Periodontal	Sim	Não		

HABITOS DE HIGIENE ORAL

Quantas vezes escova seus dentes ao dia?

1 vez
2 vezes
3 vezes ou +

Além da escova uso outro tipo de instrumento para limpar os dentes?

Fio	
palito	
escova interdental	
escova bitufo	
bochechos	Qual?

O que você acha da sua condição bucal?

Otima
Boa
Ruim
Não está preocupado com ela

Assinatura do Paciente

Assinatura do entrevistador:

ANEXOS

ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA / CEP-UEFS

Av. Universitária, S/N - Módulo I - 44.031-460 - Feira de Santana-BA
Fone: (75) 3161-8067 Fax: (75) 224-8019 E-mail: cep.uefs@yahoo.com.br

Feira de Santana, 28 de junho de 2012
Of. CEP-UEFS nº 145/2012

Senhor (a) Pesquisador (a): Prof. Soraya Castro Trindade

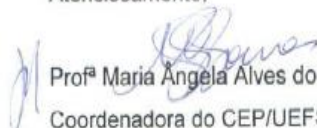
Tenho satisfação em informar-lhe que o seu Projeto de Pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO DE CÉLULAS T E ASSINATURA MOLECULAR NA PERIODONTITE CRÔNICA", registrado neste CEP sob **protocolo nº 04/2012**, foi apreciado pelos membros do CEP-UEFS e satisfaz às exigências da *Res. 196/96*. Assim, seu projeto foi **Aprovado**, podendo ser iniciada a coleta de dados com os Sujeitos da pesquisa conforme orienta o *Cap. IX.2, alínea a* – *Res. 196/96*.

Na oportunidade informo que qualquer modificação feita no projeto, após aprovação pelo CEP, deverá ser imediatamente comunicada ao Comitê, conforme orienta a *Res. 196/96, Cap. IX.2, alínea b*.

Relembro que conforme instrui a *Res. 196/96, Cap. IX.2, alínea c*, 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.

Em nome dos membros do CEP-UEFS, desejo-lhe pleno sucesso no desenvolvimento dos trabalhos e, em tempo oportuno, um ano **(29/06/2013)** este CEP aguardará o recebimento do seu relatório.

Atenciosamente,


Profª Maria Ângela Alves do Nascimento
Coordenadora do CEP/UEFS

ANEXO B – DIRETRIZES PARA AUTORES (REVISTA PERIODONTIA)

Sociedade Brasileira de Periodontia

Normas para Preparação de Artigos

Os artigos para a publicação na **REVISTA PERIODONTIA** da SOBRAPE deverão ser inéditos e redigidos em português, inglês ou espanhol. Artigos originais de pesquisa terão prioridade para apreciação mas, artigos de revisão e relatos de casos ou técnicas, de interesse na Periodontia, também poderão ser incluídos. A REVISTA PERIODONTIA reserva todos os direitos autorais do trabalho publicado. As informações contidas nos originais e publicadas na revista são de inteira responsabilidade do(s) autor(es), não refletindo necessariamente, a opinião do Corpo Editorial da revista ou a posição da SOBRAPE.

Envio do Material

Os seguintes arquivos deverão ser enviados **exclusivamente** por e-mail (**revistaperiodontia@gmail.com**) no momento da **submissão** do artigo a Revista Periodontia.

- Artigo (Seguir o item "**Apresentação do material**")
- Declaração de conflito de interesses (Disponível no site – Formulários)
- Lista de conferência pré-submissão (Disponível no site – Formulários)

Apresentação do material

Os artigos deverão ser digitados em Word para Windows, com fonte Arial, tamanho 12, justificado, em folhas de papel A4 numeradas consecutivamente. Deve ser usado espaço duplo com margem de 2,5 centímetros de todos os lados. As laudas deverão ter em média 1.600 toques (26 linhas de toques), perfazendo no máximo 20 páginas (excluindo gráficos, figuras e tabelas).

Seleção de artigos

A seleção dos artigos enviados à REVISTA PERIODONTIA será realizada pelo Conselho Editorial, que dispõe de autoridade para decidir sobre sua aceitação. No processo de revisão e aprovação, que será realizado em pares, serão avaliados: originalidade, relevância metodologia e adequação às normas de publicação.

Considerações Éticas

Estudos que envolvam seres humanos deverão estar de acordo com a RESOLUÇÃO 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, e terem sido aprovados pela Comissão de Ética da Unidade /Instituição em que foram realizados. As mesmas considerações são feitas para estudos em animais. **O número de aprovação do comitê deverá estar presente no artigo.**

Estrutura do artigo

O trabalho deverá ser numerado (canto inferior direito) e dividido conforme os itens abaixo:

Primeira página (página 1):

- **Página de título** (Português e Inglês ou Espanhol e Inglês): deverá conter o título do artigo em negrito, o nome dos autores numerados de acordo com a filiação (instituição de origem, cidade, país), a principal titulação dos autores de forma resumida (sem nota de rodapé) e endereço do autor correspondente (**contendo o endereço eletrônico – e-mail**). As demais páginas devem ser na forma de texto contínuo.

Exemplo:

Associação do PDGF e IGF na Regeneração Periodontal – Revisão de Literatura

Fernando Hayashi¹, Fernando Peixoto¹, Chistiane Watanabe Yorioka¹, Francisco Emílio Pustiglioni²

¹Mestrandos em Periodontia da FOU SP

²Professor titular de Periodontia da FOU SP

Segunda página (página 2):

- **Resumo:** deve fornecer uma visão concisa e objetiva do trabalho, incluindo objetivos, material e métodos, resultados e as conclusões. Deve conter no máximo 250 palavras (incluindo pontos, vírgulas etc).

- **Palavras-chave:** são palavras ou expressões que identificam o conteúdo do texto. Para sua escolha, deverá ser consultada a lista "Descritores em Ciências de Saúde – DECS", da BIREME. Número de palavras-chave:

máximo 6.

Terceira página (página 3):

- **Abstract e Keywords:** cópia precisa e adequada do resumo e palavras-chave em Inglês. Deverá ser consultada a lista "Medical subject headings". Disponível em www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html. Número de Keywords: máximo 6.

Quarta e demais páginas (página 4 e demais):

- **Introdução:** é o sumário dos objetivos do estudo, de forma concisa, citando as referências mais pertinentes. Também deve apresentar as hipóteses em estudo e a justificativa do trabalho.

- **Material e Métodos:** devem ser apresentados com suficientes detalhes que permitam confirmação das observações encontradas, indicando os testes estatísticos utilizados, quando existirem.

- **Resultados:** as informações importantes do trabalho devem ser enfatizadas e apresentadas em seqüência lógica no texto, nas figuras e tabelas, citando os testes estatísticos. As tabelas e figuras devem ser numeradas (algarismo arábico) e citadas durante a descrição do texto. Cada tabela deve conter sua respectiva legenda, citada acima, em espaço duplo, em página separada, no final do artigo depois das referências. As figuras também devem estar localizadas em páginas separadas, no final do texto, porém, as legendas devem estar localizadas a baixo.

- **Discussão:** os resultados devem ser comparados com outros trabalhos descritos na literatura, onde também podem ser feitas as considerações finais do trabalho.

- **Conclusão:** deve responder: objetivamente aos questionamentos propostos.

- **Agradecimentos (quando houver):** apoio financeiro de agências governamentais, assistências técnicas, laboratórios, empresas e colegas participantes.

- **Referências Bibliográficas:**Essa seção será elaborada de acordo com as Normas Vancouver (disponíveis em: www.icmje.org), devendo ser numeradas seqüencialmente conforme aparição no texto. E, as abreviações das revistas devem estar em conformidade com o Index Medicus/ MEDLINE.

Todos os autores da obra devem ser mencionados.

Exemplos – Normas **Vancouver**:

Artigo de Revista:

1. Lima RC, Escobar M, Wanderley Neto J, Torres LD, Elias DO, Mendonça JT et al. Revascularização do miocárdio sem circulação extracorpórea: resultados imediatos. Rev Bras Cir Cardiovasc 1993; 8: 171-176.

Instituição como Autor:

1. The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. Med J Aust 1996; 116:41-42.

Sem indicação de autoria:

1. Cancer in South Africa. [editorial]. S Af Med J 1994; 84-85.

Capítulo de Livro:

1. Mylek WY. Endothelium and its properties. In: Clark BL Jr, editor. New frontiers in surgery. New York: McGraw-Hill; 1998. p.55-64.

Livro:

1. Nunes EJ, Gomes SC. Cirurgia das cardiopatias congênitas. 2a ed. São Paulo: Sarvier; 1961. p.701.

Tese:

1. Brasil LA. Uso da metilprednisolona como inibidor da resposta inflamatória sistêmica induzida pela circulação extracorpórea [Tese de doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1999. 122p.

Eventos:

1. Silva JH. Preparo intestinal transoperatório. In: 45º Congresso Brasileiro de Atualização em Coloproctologia; 1995; São Paulo. Anais. São Paulo: Sociedade Brasileira de Coloproctologia; 1995. p.27-9.

1. Minna JD. Recent advances for potential clinical importance in the biology of lung cancer. In: Annual Meeting of the American Medical Association for Cancer Research; 1984 Sep 6-10. Proceedings. Toronto: AMA; 1984;25:293-4.

Material eletrônico:

Artigo de revista:

1. Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1(1):[24 screens]. Disponível em: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

Livros:

1. Tichenor WS. Sinusitis: treatment plan that works for asthma and allergies too [monograph online]. New York: Health On the Net Foundation; 1996. [cited 1999 May 27]. Disponível em : URL: <http://www.sinuses.com>

Capítulo de livro:

1. Tichenor WS. Persistent sinusitis after surgery. In: Tichenor WS. Sinusitis: treatment plan that works for asthma and allergies too [monograph online]. New York: Health On the Net Foundation; 1996. [cited 1999 May 27]. Disponível em: URL: <http://www.sinuses.com/postsurg.htm>

Tese:

1. Lourenço LG. Relação entre a contagem de microdensidade vasal tumoral e o prognóstico do adenocarcinoma gástrico operado [tese online]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1999. [citado 1999 Jun 10]. Disponível em: URL:<http://www.epm.br/cirurgia/gastro/laercio>

Eventos:

1. Barata RB. Epidemiologia no século XXI: perspectivas para o Brasil. In: 4º Congresso Brasileiro de Epidemiologia [online].; 1998 Ago 1-5; Rio de Janeiro. Anais eletrônicos. Rio de Janeiro: ABRASCO; 1998. [citado 1999 Jan 17]. Disponível em: URL: <http://www.abrasco.com.br/epirio98>

Informações adicionais podem ser obtidas no seguinte endereço

eletrônico: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- **Citações no texto:**Ao longo do texto, deve ser empregado o sistema autor-data. Segundo as normas **Vancouver**, apenas a primeira letra do sobrenome do autor é grafada em maiúscula, sendo o ano da publicação apresentado entre parênteses. Trabalhos com até dois autores, tem ambos os sobrenomes mencionados no texto, separados por "&". Trabalhos com três ou mais autores, terão ao longo do texto mencionado apenas o primeiro seguido da expressão "et al".

Se um determinado conceito for suportado por vários estudos, para a citação desses, deverá ser empregada a ordem cronológica das publicações. Nesse caso, o ano de publicação é separado do autor por vírgula (",") e as diferentes publicações separadas entre si por ponto e vírgula (";").

- Figuras e Tabelas

As tabelas e figuras deverão ser apresentadas em folhas separadas após a secção: *Referências*

Bibliográficas (uma tabela/figura por folha com a sua respectiva legenda).

Figuras em formato digital (arquivo JPG ou TIFF): Resolução de 300 DPIs.

As imagens serão **publicadas em preto e branco**. Caso haja interesse dos autores há possibilidade de impressão colorida das imagens, havendo custo adicional de responsabilidade dos autores.

ANEXO C – ARTIGOS REFERENCIADOS

Artigos em anexo.