



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Juliana Cardoso Alves

O impacto da terapia não cirúrgica na expressão de marcadores de apoptose em biópsias gengivais de pacientes com doença periodontal

Rio de Janeiro

2022

Juliana Cardoso Alves

**O impacto da terapia não cirúrgica na expressão de marcadores de apoptose em
biópsias gengivais de pacientes com doença periodontal**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Prof. Carlos Marcelo da Silva Figueredo

Coorientadora: Prof.^a Fernanda de Brito Silva

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBB

A474 Alves, Juliana Cardoso.

O impacto da terapia não cirúrgica na expressão de marcadores de apoptose em biópsias gengivais de pacientes com doença periodontal / Juliana Cardoso Alves - 2022.

55 f.

Orientadores: Carlos Marcelo da Silva Figueredo, Fernanda de Brito Silva.

Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia

1. Periodontite. 2. Doenças periodontais. 3. Apoptose. 4. Gengiva - Biópsia. 5. Gengiva – Doenças - Tratamento. I. Figueredo, Carlos Marcelo da Silva. II. Silva, Fernanda de Brito. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

Kárin Cardoso CRB/7 6287

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Juliana Cardoso Alves

O impacto da terapia não cirúrgica na expressão de marcadores de apoptose em biópsias gengivais de pacientes com doença periodontal

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Periodontia.

Aprovada em 18 de Fevereiro de 2022.

Orientadores:

Prof. Dr. Carlos Marcelo da Silva Figueredo (Orientador)
Griffith University

Prof.^a Dra. Fernanda de Brito Silva (Coorientadora)
Faculdade de Odontologia - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof.^a Dra. Susyane Almeida de Souza Antunes
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Prof.^a Dra. Flávia Silva Farah Ferreira Braga
Polícia Militar do Estado do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Mayla Kezy Silva Teixeira
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof.^a Dra. Tatiane Flôr Coelho de Souza Breves Beiler
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Jackson e Fatima, e ao meu noivo, Leandro, por sempre acreditarem na minha capacidade e me incentivarem a aprimorar a minha formação profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder mais uma graça.

Aos meus pais, Jackson e Fatima, pelo amor e apoio incondicionais.

Ao meu noivo, Leandro, por todo o carinho e compreensão, durante o período de elaboração deste trabalho.

Aos meus orientadores, professor Carlos Marcelo da Silva Figueredo e professora Fernanda de Brito Silva, pela paciência, incentivo e por todo conhecimento transmitido.

Aos professores Ricardo Guimarães Fischer, Susyane Almeida de Souza Antunes, Flávia Silva Farah Ferreira Braga, Mayla Kezy Silva Teixeira e Tatiane Flôr Coelho de Souza Breves Beiler, pela gentileza em aceitarem o convite para participarem da banca examinadora e contribuírem para o enriquecimento da tese.

Aos amigos, Ronaldo Lira Jr. e Manuela Rubim pela amizade e parceria durante todo o período em que estudamos juntos na UERJ e ainda nesta ocasião, pela gentileza em aceitarem ser suplentes da banca examinadora.

À amiga, Bárbara Coelho, técnica de laboratório em biotecnologia da FO UERJ, pelo auxílio no processo de maceração das biópsias gengivais e leitura das amostras no Luminex.

Às funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação e Pesquisa e da Clínica de Mestrado e Doutorado, por sempre estarem disponíveis a ajudar e esclarecer dúvidas.

Aos pacientes que participaram da pesquisa, pela confiança em nosso trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A persistência transpõe todo obstáculo.

Lucius Seneca

RESUMO

ALVES, Juliana Cardoso. *O impacto da terapia não cirúrgica na expressão de marcadores de apoptose em biópsias gengivais de pacientes com doença periodontal*. 2022. 55f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

O objetivo principal deste estudo foi avaliar o impacto da terapia periodontal não cirúrgica na expressão dos marcadores de apoptose Bad, Bcl-xL, Bim, Mcl-1 e do dímero Bax/Bcl-2, em biópsias de tecido gengival de pacientes com periodontite estágios III e IV generalizada, após 1 ano de acompanhamento. E secundariamente, avaliar o impacto do tratamento no tecido gengival dos pacientes com gengivite. Dezenove pacientes com gengivite ($41,1 \pm 5,6$ anos) e quinze pacientes com periodontite estágios III e IV generalizada ($55,9 \pm 9,6$ anos) foram incluídos no estudo. Todos os elementos dentários foram avaliados, exceto os terceiros molares, para Profundidade de Bolsa (PB), Nível de Inserção Clínica (NIC), Índice de Placa Visível (IPV) e Sangramento a Sondagem (SS). Nos dentes onde as biópsias foram coletadas, também foram avaliados os critérios de Índice de Placa (IP) e Índice Gengival (IG). Foi coletada uma biópsia de cada paciente, em ambos os grupos, no *baseline* e após 1 ano. O tecido gengival foi coletado com um punch de 1,5 mm de diâmetro, acima do fundo da bolsa ou sulco e imediatamente armazenado a -70° Celsius (C). Posteriormente, as amostras foram pesadas, maceradas em um sonicador e analisadas em um imunoenensaio com microesferas do tipo multiplex. A expressão dos marcadores de apoptose foi apresentada em nanograma por miligrama de tecido (ng/mg). Os pacientes com periodontite receberam 4 sessões de terapia periodontal não cirúrgica e os pacientes com gengivite foram tratados em sessão única. Além do *baseline*, o grupo de pacientes com periodontite, recebeu tratamento após 3, 6 meses e 1 ano. E o grupo de pacientes com gengivite, após 1 ano. No grupo de pacientes com periodontite, os valores de %IPV, %SS, %PB 4 - 6, %PB ≥ 7 , %NIC ≥ 5 , e também PB, NIC, IP e IG, relativos aos sítios de coleta das biópsias, reduziram significativamente em 3, 6 meses e 1 ano, quando comparados ao *baseline*. Na análise múltipla houve redução significativa dos mesmos parâmetros. E os valores de %PB ≤ 3 e %NIC ≤ 2 aumentaram significativamente em 1 ano. No grupo de pacientes com gengivite, os valores de %IPV, %SS, IP (sítio biópsia) e IG (sítio biópsia) reduziram significativamente após 1 ano. No *baseline*, as concentrações de Mcl-1 no tecido gengival de pacientes com periodontite foram significativamente menores, quando comparadas aos valores dos pacientes com gengivite ($p = 0,002$). Após 1 ano, as concentrações de Bim no tecido gengival de pacientes com gengivite aumentaram significativamente ($p = 0,04$). Os pacientes com periodontite apresentaram redução significativa da diferença das concentrações de Bim entre *baseline* e 1 ano (delta), quando comparados aos pacientes com gengivite ($p = 0,036$). Concluímos que a terapia periodontal não cirúrgica não alterou significativamente a expressão dos marcadores de apoptose Bad, Bcl-xL, Bim, Mcl-1 e do dímero Bax/Bcl-2, em biópsias de tecido gengival de pacientes com periodontite estágios III e IV generalizada, após 1 ano de tratamento. Entretanto, provocou aumento significativo da expressão do marcador pró-apoptótico Bim no tecido gengival dos pacientes com gengivite.

Palavras-chave: Periodontite. Doenças Periodontais. Apoptose. Gengiva - Biópsia. Gengiva – Doenças - Tratamento.

ABSTRACT

ALVES, Juliana Cardoso. *Impact of non-surgical therapy on apoptotic markers expression in gingival biopsies of patients with periodontal disease*. 2022. 55f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

The aim of this study was to evaluate the impact of non-surgical periodontal therapy on the expression of apoptosis markers Bad, Bcl-xL, Bim, Mcl-1 and the Bax/Bcl-2 dimer, in gingival biopsies from patients with generalized periodontitis stage III and IV after 1 year of follow-up. As a secondary aim, we aim to evaluate the impact of the treatment on the gingival tissue of patients with gingivitis. Nineteen subjects with gingivitis (41.1 ± 5.6) and 15 patients with generalized periodontitis stage III and IV (55.9 ± 9.6 years) were included in the study. All teeth were evaluated, except third molars, for Pocket Depth (PD), Clinical Attachment Level (CAL), Visible Plaque Index (VPI) and Bleeding on Probing (BOP). In the teeth where the biopsies were collected, the Plaque Index (PI) and Gingival Index (GI) were also evaluated. One biopsy was collected from each patient in both groups at baseline and another after 1 year. Gingival tissue was collected with a 1.5 mm diameter punch above the bottom of the periodontal pocket or sulcus and immediately stored at -70° Celsius (C). Subsequently, the samples were weighed, macerated in a cell disruptor and analyzed in a multiplex-type microsphere immunoassay. The expression of apoptotic markers were shown in nanogram per milligram of tissue (ng/mg). Periodontitis patients received 4 sessions of nonsurgical periodontal therapy and gingivitis patients were treated in a single session. In addition to baseline, periodontitis group received treatment after 3 months, 6 months and 1 year. And gingivitis group, after 1 year. The values of %IPV, %SS, %PB 4 - 6, %PB ≥ 7 , %NIC ≥ 5 , and also PB, NIC, IP and IG, relative to the biopsy sites, significantly reduced in the periodontitis group at 3, 6 months and 1 year when compared to baseline. There was a significant reduction in the same parameters in the multiple analysis. And the values of %PB ≤ 3 and %NIC ≤ 2 significantly increased at 1 year. In the gingivitis group, the values of %IPV, %SS, IP (biopsy site) and IG (biopsy site) were significantly reduced after 1 year. At baseline, Mcl-1 concentrations in the gingival tissue of periodontitis patients were significantly lower when compared with gingivitis patients ($p = 0.002$). Bim concentrations significantly increased in the gingival tissue of gingivitis patients after 1 year ($p = 0.04$). Periodontitis patients shows significantly reduction of the difference of Bim concentrations between baseline and 1 year (delta), when compared to gingivitis patients ($p = 0.036$). We concluded that non-surgical periodontal therapy did not led to a significant difference in the expression of apoptosis markers Bad, Bcl-xL, Bim, Mcl-1 and the Bax/Bcl-2 dimer in gingival biopsies from patients with generalized periodontitis stage III and IV after 1 year of treatment. However it caused a significant increase in the expression of the proapoptotic marker Bim in gingival tissue of gingivitis patients.

Keywords: Periodontitis. Periodontal Diseases. Apoptosis. Gingival tissue - Biopsy. Gingival Tissue – Diseases – Treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Vias de ativação do mecanismo de apoptose.....	21
Figura 2 –	Etapas da coleta de uma biópsia gengival.....	28
Figura 3 –	Porcentagem de detecção dos marcadores de apoptose nas biópsias de tecido gengival dos pacientes com gengivite e periodontite estágios III e IV generalizada no <i>baseline</i> e após 1 ano	38
Figura 4 –	Delta da expressão dos marcadores Bad, Bcl-2/Bax, Bcl-xL, Bim e Mcl-1 (ng/mg) no tecido gengival dos pacientes com gengivite e periodontite estágios III e IV generalizada.....	41
Figura 5 –	Análise de correlação entre os parâmetros clínicos periodontais e a expressão dos marcadores de apoptose (ng/mg) no tecido gengival dos pacientes com gengivite no <i>baseline</i> e em 1 ano.....	43
Figura 6 –	Análise de correlação entre os parâmetros clínicos periodontais e a expressão dos marcadores de apoptose (ng/mg) no tecido gengival dos pacientes com periodontite estágios III e IV generalizada no <i>baseline</i> e em 1 ano.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Dados demográficos dos pacientes com gengivite e periodontite estágios III e IV generalizada.....	33
Tabela 2 –	Mediana (intervalo interquartil) dos parâmetros clínicos periodontais dos pacientes com gengivite e periodontite estágios III e IV generalizada no <i>baseline</i>	34
Tabela 3 –	Mediana (intervalo interquartil) dos parâmetros clínicos periodontais dos pacientes com periodontite estágios III e IV generalizada no <i>baseline</i> , 3 meses, 6 meses e 1 ano.....	36
Tabela 4 –	Mediana (intervalo interquartil) dos parâmetros clínicos periodontais dos pacientes com gengivite no <i>baseline</i> e 1 ano.....	37
Tabela 5 –	Mediana (intervalo interquartil) da concentração (ng/mg) dos marcadores de apoptose no tecido gengival dos pacientes com gengivite e periodontite estágios III e IV generalizada no <i>baseline</i>	39
Tabela 6 –	Mediana (intervalo interquartil) da concentração (ng/mg) dos marcadores de apoptose no tecido gengival dos pacientes com periodontite estágios III e IV generalizada no <i>baseline</i> e 1 ano.....	40
Tabela 7 –	Mediana (intervalo interquartil) da concentração (ng/mg) dos marcadores de apoptose no tecido gengival dos pacientes com gengivite no <i>baseline</i> e 1 ano.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	Fator indutor de apoptose
Apaf-1	Fator ativador de apoptose-1
ATP	Trifosfato de adenosine
Bad	Bcl-2 associated death promoter
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BH	Domínio de homologia Bcl-2
Bid	BH3-interacting domain death agonist
Bik	BCL2 interacting killer
Bim	Activator subtype of BH3-only proteins
BIRC-1	Baculoviral IAP repeat-containing
C	Celsius
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEB	Cytosolic Extraction Buffer
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FADD	Domínio de morte associado a Fas
Fas	Fas-Proteína Associada ao Domínio de Morte
FasL	Fas Ligante
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IAPs	Proteínas inibidoras de apoptose
IG	Índice Gengival
IP	Índice de Placa
IPV	Índice de Placa Visível
LDB	Lysate Dilution Buffer
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Ácido lipoteicóico

Mcl-1	Myeloid cell leukemia 1
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
ng	Nanograma
ng/mg	Nanograma/miligrama
NIC	Nível de Inserção Clínica
ph	Potencial Hidrogeniônico
PB	Profundidade de Bolsa
PCG	Periodontite crônica generalizada
rpm	Rotações por minuto
RIP2	Receptor-interacting Serine/ Threonine Kinase-2
SA-PE	Estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente ficoeritrina
Smac/DIABLO	Segundo Ativador de Caspases Derivado da Mitocôndria/Proteína de ligação IAP direta com baixo pI
SPSS	Statistical <i>Package</i> for the <i>Social</i> Sciences
SS	Sangramento a Sondagem
tBid	Proteína Bid truncada
TNFRSF	Superfamília de receptores do fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
μ l	Microlitro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	13
1	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.1	Etiopatogenia da periodontite.....	16
1.2	Morte celular: apoptose versus necrose.....	16
1.3	Marcadores de apoptose.....	17
1.4	Vias de ativação da apoptose.....	19
1.5	A atividade de apoptose na periodontite.....	22
2	PROPOSIÇÃO.....	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1	Caracterização da amostra.....	25
3.2	CrITÉRIOS de inclusão e exclusão.....	25
3.3	Calibração dos examinadores.....	26
3.4	Coleta dos dados.....	26
3.4.1	<u>Exame clínico periodontal.....</u>	26
3.4.2	<u>BiÓpsias do tecido gengival.....</u>	27
3.5	Tratamento.....	28
3.6	Maceração das biÓpsias gengivais.....	29
3.7	Ensaio Multiplex.....	30
3.8	Análise estatística.....	31
4	RESULTADOS.....	33
4.1	Dados demográficos.....	33
4.2	Dados clÍnicos.....	33
4.3	Expressão dos marcadores de apoptose no tecido gengival.....	37
4.4	Análise de correlação.....	42
5	DISCUSSÃO.....	45
	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49
	ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	53

INTRODUÇÃO

A gengivite induzida pelo biofilme e a periodontite são as formas mais prevalentes da doença periodontal. A gengivite induzida pelo biofilme é um quadro reversível de inflamação no periodonto, caracterizada por eritema, edema e sangramento, que não provoca a perda do tecido periodontal de suporte (CATON et al., 2018). Enquanto que na periodontite a inflamação no tecido gengival é acompanhada pela migração apical do epitélio juncional, a destruição do ligamento periodontal e do tecido conjuntivo gengival e a reabsorção do osso alveolar. Sua etiologia está relacionada primariamente a um modelo de disbiose polimicrobiano, que induz a uma resposta imune exacerbada e não resolutive, modulada por doenças sistêmicas e fatores ambientais (HAJISHENGALLIS, 2015).

Apesar do biofilme bacteriano ser o fator etiológico primário da periodontite, também é necessário um hospedeiro suscetível para o desenvolvimento da doença (GURSOY et al., 2016). A resposta do hospedeiro tem sido tradicionalmente mediada por monócitos/macrófagos, linfócitos B e T e neutrófilos. Estas células são acionadas para produzir mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas, metabólitos do ácido araquidônico e enzimas proteolíticas que, em caso de exacerbação, podem contribuir coletivamente para a degradação do tecido e reabsorção óssea pela ativação de diversas vias de degradação (BORGES et al., 2019). Essas células imunes, seus produtos e suas complexas interações têm sido estudadas a fim de aumentar o entendimento sobre a modulação das vias de degradação e tentar minimizar a destruição tecidual na periodontite (BEILER et al., 2020). Neste cenário, os mecanismos de morte celular, entre eles a apoptose, estão de algum modo envolvidos nesses processos, principalmente devido ao agravamento da resposta inflamatória (SONG et al., 2017).

A apoptose celular é caracterizada por um conjunto de eventos estritamente regulados, que são essenciais para o desenvolvimento e manutenção da arquitetura de diferentes tecidos (LISTYARIFAH et al., 2017). Diversos marcadores estão envolvidos no processo de sinalização da apoptose, entre eles a família de proteínas *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) que apresenta membros com atividade pró e antiapoptótica. Estes marcadores participam do processo de morte celular, controlando o potencial da membrana mitocondrial e a liberação de fatores apoptogênicos, como o citocromo C e o fator indutor de apoptose (AIF). Uma das possíveis formas de liberação do citocromo C da mitocôndria é através de canais formados pelos fatores pró-apoptóticos *Bcl-2 homologous antagonist/killer* (Bak) e *Bcl-2-associated*

X protein (Bax) . Quando os marcadores com atividade antiapoptótica *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-xL) e *Myeloid cell leukemia 1* (Mcl-1) formam dímeros com o fator Bak, eles inibem a permeabilidade da membrana mitocondrial, com a finalidade de dificultar a liberação de citocromo C e AIF (ASHKENAZI et al., 2017).

O equilíbrio entre os processos pró e antiapoptose é delicado, e a desregulação destes mecanismos é observada em diversas condições patológicas como: a artrite reumatóide (LI et al., 2020), o câncer (HASSAN et al., 2014), o lúpus eritematoso sistêmico (YANG et al., 2019) e a periodontite (PRADEEP et al., 2016). Alguns estudos já demonstraram, através de avaliações imunohistoquímicas, a expressão aumentada de caspase-3 e Bcl-2 no fluido gengival e em biópsias de tecido gengival, de pacientes com periodontite, sugerindo que estes marcadores possam estar envolvidos com o processo inflamatório relacionado com a patogênese da doença periodontal (ABUHUSSEIN et al., 2014; GAMONAL et al., 2001). Por outro lado, já foi demonstrado que é possível observar que citocinas, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), podem retardar a apoptose em neutrófilos através do aumento da estabilidade mitocondrial, da redução da atividade da caspase-3 e da diminuição da expressão de Bax (GAMONAL et al., 2003).

Entretanto, até o presente momento são poucos os relatos do efeito do tratamento periodontal na expressão de marcadores de apoptose. Beikler et al. (2008) apresentaram aumento significativo da expressão do gene *Baculoviral IAP repeat-containing* (BIRC-1), responsável pela inibição da atividade da caspase-3, em biópsias gengivais de pacientes com periodontite crônica severa, após a terapia periodontal não cirúrgica. Concomitante a diminuição na expressão do gene *Receptor-interacting Serine/ Threonine Kinase-2* (RIP2), que estimula a atividade apoptótica. Aral et al. (2019a) avaliaram o efeito da Terapia *Full Mouth Disinfection* e do uso de antibióticos sistêmicos na expressão dos marcadores de apoptose p53 e caspase-3, no fluido gengival de pacientes com periodontite agressiva generalizada, no *baseline* e após 3 e 6 meses. Os valores de p53 apresentaram uma redução estatisticamente significativa após 6 meses, quando comparado aos valores do *baseline*. E a expressão de caspase-3 no fluido foi significativamente menor em 3 meses, porém em 6 meses, os valores foram semelhantes ao *baseline*. No presente estudo, nos propusemos a avaliar um maior número de marcadores, por um período maior de tempo e realizando apenas o controle mecânico do biofilme. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da terapia periodontal não cirúrgica na expressão dos marcadores de apoptose Bad, Bcl-xL, Bim,

Mcl-1 e do dímero Bax/Bcl-2, em biópsias de tecido gengival de pacientes com periodontite estágios III e IV generalizada, após 1 ano de acompanhamento.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Etiopatogenia da periodontite

A resposta inflamatória crônica estabelecida na periodontite é desencadeada pela interação de células de defesa do hospedeiro com os periodontopatógenos constituintes do biofilme e seus fatores de virulência, como por exemplo o lipopolissacarídeo (LPS) dos microorganismos gram-negativos e o ácido lipoteicoico (LTA) das bactérias gram-positivas. Após a interação de células primárias de defesa com esses fatores bacterianos, um infiltrado inflamatório é progressivamente formado no epitélio juncional. Grande parte deste infiltrado é composto por neutrófilos circulantes, que migram dos vasos sanguíneos, através do aumento da permeabilidade vascular e da expressão de moléculas de adesão, que facilitam o rolamento destas células ao longo do endotélio. O recrutamento de neutrófilos e de outras células de defesa é orquestrado por um complexo mecanismo de sinalização e produção de mediadores inflamatórios, como as citocinas e prostaglandinas; enzimas, como as proteases e metaloproteinases de matriz; além de espécies reativas de oxigênio (EROs). A produção exacerbada destas moléculas provoca a destruição de fibras do ligamento periodontal e do conjuntivo gengival e a ativação de osteoclastos, e consequente reabsorção do osso alveolar (CEKICI et al., 2014). Os mecanismos de morte celular podem estar envolvidos na resolução e na manutenção da inflamação. A apoptose, por exemplo, é um dos mecanismos pelo qual as células do sistema imune são renovadas, quando esgotam suas funções e devem ser recicladas, a fim de evitar uma necrose secundária e dano tecidual (D'ARCY, 2019).

1.2 Morte celular: apoptose versus necrose

A apoptose é um tipo de morte celular fisiológica ou programada, constituída por alterações morfológicas e bioquímicas coordenadas e sucessivas. Inicialmente, ocorre uma retração da célula, que causa perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares normalmente mantêm a morfologia, com exceção das mitocôndrias, que eventualmente podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre

condensação e passa a se concentrar junto a membrana nuclear, que se mantém intacta. Em seguida, a membrana celular forma prolongamentos e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear (BIRKINSHAW; CZABOTAR, 2017).

Gradativamente, os prolongamentos da membrana citoplasmática aumentam de número e tamanho e se rompem, formando os corpos apoptóticos, estruturas envoltas pela membrana celular e que contém organelas celulares preservadas, que rapidamente são reconhecidos e fagocitados por macrófagos a fim de evitar uma resposta inflamatória (POON et al., 2014). Outra alteração celular característica do processo de apoptose é a fragmentação do ácido desoxirribonucléico (DNA), que é clivado por endonucleases em regiões específicas (MAJTNEROVÁ; ROUSAR, 2018).

Diferentemente do processo de apoptose, a necrose resulta em: aumento do volume celular, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular. O conteúdo celular liberado, causa dano as células vizinhas e uma reação inflamatória local (BERTHELOOT; LATZ; FRANKLIN, 2021).

1.3 Marcadores de apoptose

O processo de apoptose celular é essencial para o desenvolvimento e manutenção da arquitetura de diferentes tecidos (SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019). Diversos marcadores estão envolvidos no processo de sinalização da apoptose, as caspases estão entre os fatores mais estudados. Estas proteases se encontram no meio intracelular, como pró-formas inativas, até que o estímulo (intra ou extracelular) para o processo apoptótico aconteça (RAMIREZ; SALVESEN, 2018). Na família de caspases, a caspase-3 é considerada uma enzima efetora, porque pode ser ativada por várias outras caspases e apresenta uma especificidade catalítica para um número relevante de substratos celulares. Portanto, a presença de células positivas para caspase-3 ativa é considerada uma marca do processo de apoptose (KESAVARDHANA; MALIREDDI; KANNEGANTI, 2020).

Membro do grupo das proteínas inibidoras de apoptose, a survivina tem a capacidade de inibir a atividade das caspases efetoras -3 e -7, e das caspases iniciadoras -8 e -9 (VAN OPDENBOSCH; LAMKANFI, 2019). Após dano mitocondrial, a proteína denominada Segundo Ativador de Caspases Derivado da Mitocôndria/Proteína de ligação IAP direta com baixo pI (Smac/DIABLO) é liberada do espaço intermembrana para o citoplasma, junto com o

citocromo C. Enquanto o citocromo C se liga diretamente a APAF-1 e ativa a caspase-9, a Smac/DIABLO remove as proteínas inibidoras de apoptose de sua ligação inibitória com as caspases, permitindo a atividade de caspases efetoras e a formação do apoptossomo (RAMIREZ; SALVESEN, 2018).

O mecanismo de apoptose é regulado por diferentes grupos de genes, dos quais os mais conhecidos são os da família bcl-2. As proteínas expressas por esta família são divididas em três grupos. O primeiro grupo é de membros com atividade antiapoptótica (exemplos: Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1), que compartilham uma sequência homóloga de quatro domínios, chamados domínios de homologia Bcl-2 (BH), BH1 ao BH4. O segundo grupo apresenta membros pró-apoptóticos (exemplos: Bax, Bak e Bad), que compartilham uma sequência homóloga de três domínios (BH1 ao BH3). E o terceiro grupo, também apresenta membros pró-apoptóticos (exemplos: Bik, Bid e Bim), que compartilham apenas a sequência homóloga BH3. Algumas proteínas, como *Bcl-2-associated X protein* (Bax) e *Bcl-2-associated death promoter* (Bad), encontram-se livres no citosol e são translocadas para a membrana mitocondrial para exercer suas respectivas funções. Outros marcadores, como o *Bcl-2 homologous antagonist/killer* (Bak), *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) e *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-xL) já se encontram na membrana externa da mitocôndria (WARREN; WONG-BROWN; BOWDEN, 2019).

A regulação do mecanismo de apoptose pelas proteínas da família Bcl-2 ocorre através do controle do potencial da membrana mitocondrial e da liberação de fatores apoptogênicos, como o AIF e o citocromo C. O AIF é uma flavoproteína, que migra da mitocôndria para o núcleo, após o estímulo de apoptose, induzindo a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA, independente da ativação das caspases. O citocromo C, quando liberado no citoplasma, se liga a proteína citoplasmática fator ativador de apoptose-1 (Apaf-1), formando o apoptossomo, um grande complexo de proteínas, que ativará a pró-caspase-9, que é uma enzima iniciadora da caspase-3 (DORSTYN; AKEY; KUMAR, 2018).

Uma das possíveis formas de liberação do citocromo C e AIF, é através de canais formados pelos fatores Bak e Bax, na membrana mitocondrial externa. Entretanto, quando estes fatores formam dímeros com as proteínas Bcl-2, Bcl-xL e *Myeloid cell leukemia 1* (Mcl-1), eles inibem a perda do potencial da membrana mitocondrial, com a finalidade de dificultar a liberação destes fatores apoptogênicos (KALE; OSTERLUND; ANDREWS, 2018). Em algumas células, como os linfócitos, a quebra da proteína citosólica *BH3-interacting domain death agonist* (Bid) produz a proteína truncada (tBid), que é translocada para a mitocôndria

para a formação de canais na membrana mitocondrial externa, e consequente liberação do citocromo C (ZHENG et al., 2020).

As lamínas nucleares são proteínas do tipo filamento intermediário, que provêm suporte mecânico e forma a estrutura nuclear e estão envolvidas na regulação da replicação do DNA, transcrição e organização da cromatina. As células dos vertebrados expressam dois tipos de lamínas: tipo A e tipo B. A lamina B é clivada pela caspase-3 nas fases iniciais da apoptose, antes da fragmentação do DNA, portanto quando encontrada no citoplasma celular, é indicadora de atividade apoptótica (STEPHENS; BANIGAN; MARKO, 2018).

1.4 Vias de ativação da apoptose

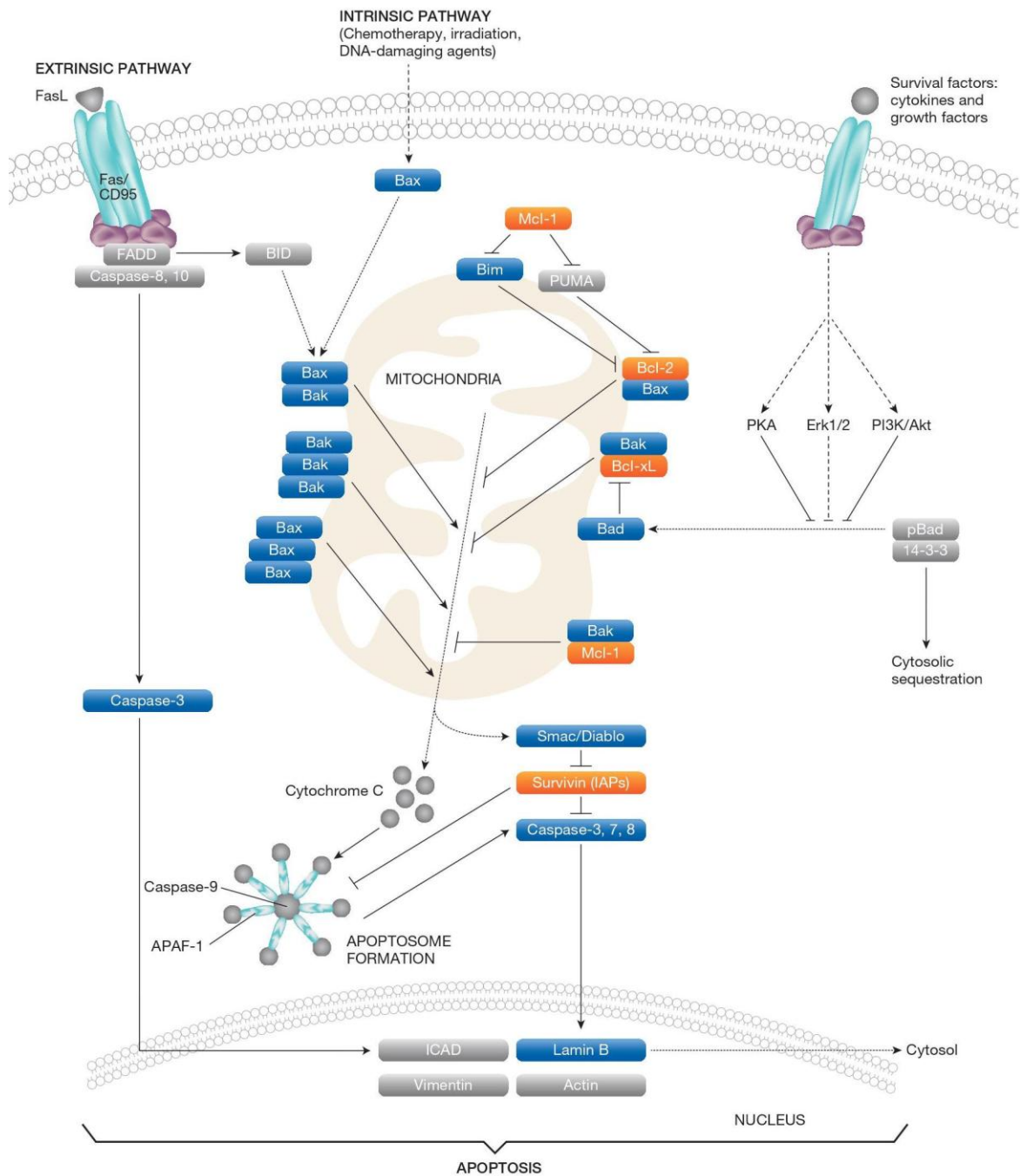
O processo apoptótico apresenta duas principais vias de ativação: a via extrínseca e a via intrínseca. A via extrínseca é ativada pela interação entre os receptores de morte celular, presentes na membrana citoplasmática das células e seus ligantes. A maioria dos receptores de morte celular identificados são membros da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFRSF). O modelo mais estudado do grupo de receptores/ligantes de morte celular é o Fas (também chamado Apo-1 e CD95) e Fas ligante (FasL) (MCELLWAIN; BERGER; MAK, 2013).

Todos os membros da TNFRSF apresentam um subdomínio extracelular rico em cisteína, que permite que eles reconheçam seus ligantes. Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, ocorre uma sinalização mediada pela porção citoplasmática destes receptores. Essa porção é uma sequência de sessenta e cinco aminoácidos chamada de “domínio de morte”, que interage com uma proteína adaptadora presente no citosol, conhecida como domínio de morte associado a Fas (FADD). A ligação desse complexo à pró-caspase-8 resulta na ativação desta enzima, que diretamente ou pela via intrínseca, ativará a caspase-3 (PARRISH; FREEL; KORNBLUTH, 2013).

A via intrínseca é ativada por diferentes formas de estresse celular como, por exemplo, dano ao DNA, estresse oxidativo, excesso de cálcio intracelular, redução do pH e radiação ionizante. Esses insultos geram uma sinalização celular, que altera principalmente, a atividade mitocondrial. Ocorre um colapso do potencial da membrana mitocondrial interna e uma transição da permeabilidade mitocondrial (BOCK; TAIT, 2020). A água do espaço entre as membranas se desloca para a matriz mitocondrial, levando à ruptura da organela e

consequente liberação de citocromo C e AIF para o citoplasma. Esse processo leva a perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de trifosfato de adenosina (ATP) e aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). A produção de EROS induz a ativação de caspase-3 e -9. Outra forma possível de liberação do citocromo C e AIF ocorre pela formação de poros na membrana mitocondrial, através de canais constituídos pelos fatores Bax, Bak e tBid (ABATE et al., 2020) (Figura1).

Figura 1 – Vias de ativação do mecanismo de apoptose



Nota: A via extrínseca é iniciada através da ligação de receptores de morte celular (Fas) com os seus ligantes (FasL), seguida da ativação da caspases-8 e da caspase-3. E a via intrínseca é ativada por formas de estresse citotóxico, que leva a translocação das proteínas Bax e Bad para a membrana mitocondrial. A oligomerização de Bak e Bax leva a liberação do citocromo C no citosol, que promove a formação do apoptossomo, ativação de caspases e a degradação de estruturas nucleares. Na ilustração, os principais marcadores envolvidos nas vias receberam marcação colorida. As proteínas pró-apoptóticas estão grifadas em azul e as anti-apoptóticas estão grifadas em laranja.

Fonte: www.bio-rad.com

1.5 A atividade de apoptose na periodontite

O desequilíbrio entre os processos pró e antiapoptóticos é estudado em diversas condições patológicas (CARNEIRO; EL-DEIRY, 2020; YANG et al., 2020; ZHANG et al., 2019), entre elas a periodontite. Abuhussein et al. (2014) investigaram a expressão de caspase-3, Fas, FasL e Fas/FasL em amostras de fluido gengival, soro e saliva. Foram avaliados três grupos de pacientes: saudáveis, com periodontite leve e com periodontite moderada a severa. A caspase-3 não foi detectada na saliva e no soro, entretanto o Fas e o FasL foram expressos, mas não apresentaram diferença significativa entre os grupos. E a expressão de caspase-3, Fas e FasL, no fluido gengival, foi significativamente maior no grupo de pacientes com periodontite crônica moderada/severa, seguido pelos grupos de periodontite crônica leve e gengivite, respectivamente.

A expressão da caspase-3 no fluido gengival e no soro, também foi alvo de investigação de Pradeep et al. (2016). Os autores selecionaram três grupos de pacientes: saudáveis, com gengivite e com periodontite crônica. Eles encontraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com o grupo de pacientes com periodontite apresentando valores de expressão mais altos, seguido do grupo de pacientes com gengivite e por último, dos pacientes saudáveis. A correlação das concentrações de caspase-3 no soro e no fluido com o IG foi estatisticamente significativa, no grupo de pacientes com gengivite; e com o IG, PB e NIC, no grupo de pacientes com periodontite.

Aral et al. (2019b) também observaram expressões significativamente maiores dos marcadores pró-apoptóticos caspase-9 e AIF no fluido crevicular gengival de pacientes com periodontite agressiva em comparação com pacientes saudáveis. Da mesma forma, Listyarifah et al. (2017) encontraram evidências de um número significativamente maior de células apoptóticas em amostras de tecido gengival de pacientes com periodontite crônica em comparação com pacientes com gengivite.

Outros autores relataram aumento da atividade antiapoptótica em pacientes com periodontite, quando comparado ao grupo de pacientes saudáveis ou com gengivite. Figueredo et al. (2019) relataram expressões de Bad, Bim e do dímero Bcl-2/Bax significativamente maiores no tecido de pacientes com gengivite. Gamonal et al. (2001) encontraram, em biópsias de tecido gengival de pacientes com periodontite, uma maior expressão de um marcador antiapoptótico (Bcl-2), comparado aos demais marcadores, que apresentaram um padrão semelhante de expressão. Gamonal et al. (2003) relataram uma correlação positiva

entre o retardamento do processo de apoptose em neutrófilos nos tecidos periodontais, com o aumento dos níveis de TNF- α e GM-CSF no fluido gengival e a baixa expressão de Bax em biópsias do tecido gengival. Os neutrófilos são células com meia-vida curta e são normalmente removidos do sistema imune por apoptose, seguida de fagocitose dos corpos apoptóticos por macrófagos (WICKMAN; JULIAN; OLSON, 2012), a fim de evitar a perpetuação da resposta inflamatória e o dano tecidual. Entretanto, o TNF- α e o GM-CSF podem retardar o mecanismo de apoptose. Os autores relataram que o fluido coletado foi analisado por *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) e as biópsias ficaram incubadas em um meio de cultura com recombinante de GM-CSF, antes da análise imunohistoquímica e da técnica de TUNEL, sendo avaliadas em dois momentos (no segundo e no quarto dia de incubação). Observou-se que a presença de GM-CSF e TNF- α foi detectada na maioria dos sítios dos pacientes com periodontite e a atividade de apoptose aumentou na análise por microscopia, das lâminas de tecido gengival, entre o segundo e o quarto dia de incubação. A expressão de Bax também aumentou durante esse período. Algumas biópsias não foram mantidas em meio de cultura com GM-CSF, para obter um grupo de comparação. Na microscopia dessas lâminas, observou-se uma maior atividade de apoptose nos dois períodos de avaliação, em relação ao grupo que foi mantido em meio de cultura com GM-CSF. Neste grupo, a atividade de apoptose também aumentou espontaneamente, entre o primeiro e o segundo dia de avaliação.

Ainda são poucos os relatos do efeito do tratamento periodontal na expressão dos marcadores de apoptose. Beikler et al. (2008) apresentaram aumento significativo da expressão do gene BIRC-1, responsável pela inibição da atividade da caspase-3, em biópsias gengivais de pacientes com periodontite crônica severa, após a terapia periodontal não cirúrgica. E também, diminuição na expressão do gene RIP2, que estimula a atividade apoptótica. Aral et al. (2019a) avaliaram o efeito da Terapia *Full Mouth Disinfection* e do uso de antibióticos sistêmicos na expressão dos marcadores de apoptose p53 e caspase-3, no fluido gengival de pacientes com periodontite agressiva generalizada, no *baseline* e após 3 e 6 meses. Os valores de p53 apresentaram uma redução estatisticamente significativa após 6 meses, quando comparado aos valores do *baseline*. E a expressão de caspase-3 no fluido foi significativamente menor em 3 meses, porém em 6 meses, os valores foram semelhantes ao *baseline*.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo principal deste estudo foi avaliar o impacto da terapia periodontal não cirúrgica na expressão dos marcadores de apoptose Bad, Bcl-xL, Bim, Mcl-1 e do dímero Bax/Bcl-2, em biópsias de tecido gengival de pacientes com periodontite estágios III e IV generalizada, após 1 ano de acompanhamento. E secundariamente, avaliar o impacto do tratamento na expressão destes mesmos biomarcadores no tecido gengival dos pacientes com gengivite, durante o mesmo intervalo de tempo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização da amostra

Este ensaio clínico longitudinal foi realizado com uma amostra total de 34 pacientes selecionados e tratados na Clínica de Mestrado e Doutorado da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Os pacientes foram divididos em dois grupos, de acordo com o diagnóstico da condição periodontal, segundo os critérios da Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Periimplantares de 2018, da Academia Americana de Periodontia e da Federação Européia de Periodontia (CATON et al., 2018).

Um grupo foi composto por quinze pacientes (8 homens e 7 mulheres; idade média: $55,9 \pm 9,6$ anos) com periodontite estágios III e IV generalizada. Portanto, apresentavam pelo menos dois ou mais sítios interproximais não adjacentes com $NIC \geq 5$ milímetros (mm) e $PB \geq 6$ mm, além de possuírem mais de 30% dos sítios acometidos pela doença (PAPAPANOU et al., 2018; TONETTI; GREENWELL; KORNMAN, 2018). E o outro grupo foi composto por dezenove pacientes com gengivite (6 homens e 13 mulheres; idade média: $41,1 \pm 5,6$ anos), que apresentavam $PB \leq 3$ mm e $NIC \leq 1$ mm. (CHAPPLE et al., 2018). No grupo de pacientes com gengivite, foram tolerados sítios com NIC de até 2 mm em faces vestibulares, onde a perda de inserção tinha origem traumática.

O trabalho foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) – UERJ, com o parecer de número 1.207.325 (ANEXO), e todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido ao iniciarem a participação na pesquisa.

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no trabalho os indivíduos maiores de 21 anos, com no mínimo 10 dentes naturais e que não apresentassem doença sistêmica. No grupo controle, os participantes também deveriam apresentar áreas que necessitassem de cirurgia periodontal (estética ou pré-protética), que serviriam como fonte de coleta das biópsias do tecido gengival. E os seguintes

critérios de exclusão foram adotados: ser gestante ou lactante; ser fumante ou ex-fumante (com menos de dez anos de abandono do tabagismo); ter feito uso de medicação anti-inflamatória nos três meses que precederam a participação na pesquisa, e de antibióticos nos seis meses anteriores; ter sofrido tratamento periodontal há menos de um ano; estar em tratamento ortodôntico e fazer uso de medicações que provoquem alterações no tecido gengival, como a nifedipina, ciclosporina e os anti-histamínicos.

3.3 Calibração dos examinadores

Dois examinadores (JCA e TFB) foram previamente calibrados para a realização das medições clínicas periodontais. Foram avaliados dez sítios em dois pacientes com periodontite estágios III e IV generalizada.

O percentual de concordância intra-examinador, para as variáveis PB e NIC foi de 90%, tendo sido feito um intervalo de uma hora entre a primeira e a segunda avaliação. E na concordância interexaminador, o percentual de concordância foi de 85%. No processo de calibração, foram consideradas variações de ± 1 mm entre as medições.

3.4 Coleta dos dados

3.4.1 Exame clínico periodontal

Após a realização da anamnese, foi executado o exame clínico periodontal e radiografias periapicais completas foram utilizadas para auxílio no diagnóstico da condição periodontal. O exame clínico periodontal foi realizado com uma sonda periodontal manual e milimetrada do tipo Carolina do Norte (15 mm), da marca Hu-Friedy® (Chicago, IL, EUA), em todos os elementos dentários, exceto os terceiros molares, avaliando os seguintes parâmetros:

a) Índice de Placa Visível (IPV) (AINAMO; BAY, 1975): Padrão dicotômico da avaliação da presença de biofilme bacteriano visível a olho nu, após o isolamento relativo e a secagem da superfície dentária, em quatro sítios por dente (faces: mesial, distal, vestibular e palatina/lingual).

b) Profundidade de Bolsa (PB): Distância da margem gengival até o fundo do sulco ou bolsa periodontal. Foi avaliada em seis sítios por dente (vestibular, mésio-vestibular, disto-vestibular, ligual/palatina, mésio-lingual/palatina e disto-lingual/palatina).

c) Sangramento a Sondagem (SS): Padrão dicotômico de avaliação do sangramento gengival, observado simultaneamente a aferição da Profundidade de Bolsa, nos mesmos sítios citados no item anterior.

d) Nível de Inserção Clínica (NIC): Distância da junção cimento-esmalte até o fundo do sulco ou bolsa periodontal. Também foi avaliado em seis sítios por dente.

Nos dentes onde as biópsias foram coletadas, além dos parâmetros clínicos descritos acima, também foram avaliados os critérios de Índice de Placa e Índice Gengival, em quatro sítios por dente (faces: mesial, distal, vestibular e palatina/lingual), da seguinte forma:

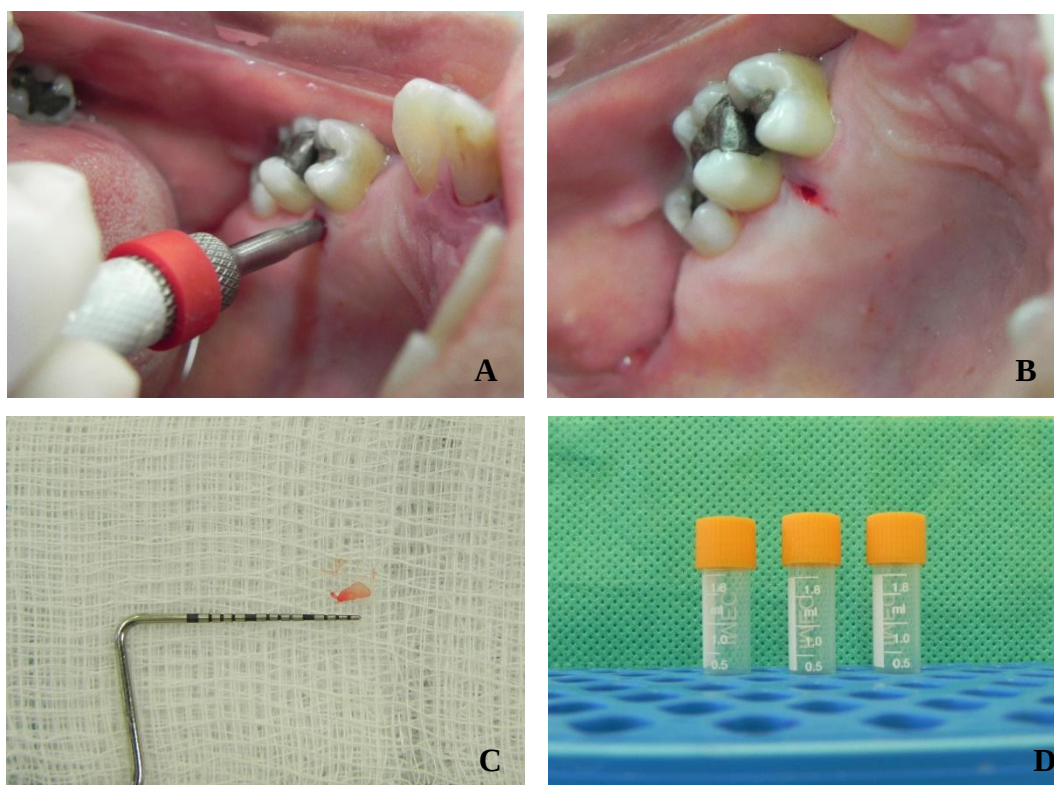
a) Índice de Placa (IP) (SILNESS; LÖE, 1964): Avaliação da presença de biofilme bacteriano visível a olho nu, após o isolamento relativo e a secagem da superfície dentária. Para classificação foram utilizados valores de zero a três. Zero significa ausência de biofilme; 1, visualização do biofilme após a remoção com uma sonda periodontal milimetrada; 2, biofilme visível clinicamente e 3, biofilme abundante.

b) Índice Gengival (IG) (LÖE, 1967): Avaliação do grau de inflamação do tecido gengival. Foram utilizados valores de zero a três. Zero significa ausência de sinais visuais de inflamação; 1, ligeira alteração na cor e textura gengival; 2, inflamação visível e tendência ao sangramento após deslizamento da sonda na margem gengival e 3, inflamação com tendência ao sangramento espontâneo.

3.4.2 Biópsias do tecido gengival

Foi coletada uma biópsia de cada paciente, em ambos os grupos, no *baseline* e após 1 ano. Nos dois períodos de tempo, a coleta foi realizada no mesmo sítio e ocorreu da seguinte forma: após a área de coleta ser anestesiada, era aferida até o fundo do sulco ou da bolsa, com uma sonda periodontal manual e milimetrada do tipo Carolina do Norte (15 mm), da marca Hu-Friedy® (Chicago, IL, EUA) e seu ponto externo correspondente estabelecido. Os tecidos foram coletados utilizando-se um punch de 1,5 de diâmetro, sendo imediatamente armazenados em recipientes estéreis e congelados a -70°C até o momento da maceração (Figura 2). Devido ao tamanho reduzido das biópsias, o paciente apresenta rápida cicatrização e mínimo desconforto pós-operatório, sem a necessidade de sutura. As chances de comprometimento estético também são mínimas.

Figura 2 - Etapas da coleta de uma biópsia gengival



Legenda: A – incisão com punch de 1,5 mm, após anestesia e marcação da área; B – ferida cirúrgica imediatamente após a incisão; C – tecido gengival biopsiado; D – armazenamento das biópsias em eppendorfs, seguido de refrigeração a -70°C .

Fonte: Alves, 2016.

3.5 Tratamento

No grupo de pacientes com periodontite, a terapia periodontal não cirúrgica foi realizada por quadrante, em quatro sessões de aproximadamente uma hora de duração. Já os pacientes com gengivite receberam o tratamento em sessão única. As raspagens supra e subgengivais foram realizadas sob anestesia e com o auxílio de dispositivos manuais (Hu-Friedy®, Chicago, IL, EUA) e ultrassônicos (Cavitron® Select, York, PA, EUA). Também foram executadas instruções de higiene oral, profilaxia com pasta profilática e taça de borracha e aplicação tópica de flúor gel neutro. Os pacientes com periodontite receberam consultas de manutenção em: 3 meses, 6 meses e 1 ano após o tratamento inicial. E o grupo de pacientes com gengivite, após 1 ano.

3.6 Maceração das biópsias gengivais

Inicialmente, foi realizada a preparação da solução tampão *Lysate Dilution Buffer* (LDB), componente do kit disponível comercialmente (Bio-Plex Pro™ RBM Apoptosis Multiplex Assays Panel 2, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) para análise dos marcadores de apoptose em um sistema Multiplex. Foi adicionado 1 comprimido do inibidor de protease S8820 SIGMAFAST™ (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, EUA), para 10 ml do tampão.

Após serem descongeladas, as amostras de tecido gengival foram pesadas em uma balança analítica Shimadzu modelo AUW220D (Shimadzu Corporation, Rosario, Cavite, PH) e transferidas para um microtubo previamente refrigerado, contendo 200 microlitros (µl) de LDB. Neste tubo foi realizada a homogeneização tecidual por um processador ultrassônico (sonicador) (Virsonic 60, Virtis, NY, EUA), em 3 ciclos de 30 segundos, sempre com a amostra sob refrigeração.

Finalizada a maceração, as amostras foram incubadas no gelo, por 10 minutos e dispostas em uma microcentrífuga de bancada refrigerada (5415R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), para centrifugação por mais 10 minutos a 10.000 rpm e a 4°C. O sobrenadante foi dividido em alíquotas, transferido para tubos de criogênio, refrigerados à - 70° C, até o momento da análise.

3.7 Ensaio Multiplex

Os níveis dos marcadores de apoptose Bad, Bcl-xL, Bim, Mcl-1 e do dímero Bax/Bcl-2 foram determinados através de um imunoensaio com microesferas (*beads*) do tipo multiplex. Trinta microlitros de cada sítio foram analisados utilizando-se um kit disponível comercialmente (Bio-Plex Pro™ RBM Apoptosis Multiplex Assays Panel 2, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), em um analisador multiplex (Bio-Plex 200®, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Inicialmente, foi realizada a reconstituição dos reagentes liofilizados em água deionizada, no volume pré-determinado no manual. Em seguida, o tampão de ensaio foi diluído em água deionizada, na proporção de 1:9. Antes das preparações, todos os reagentes e o tampão foram mantidos a temperatura ambiente por no mínimo 5 minutos, não excedendo 30 minutos.

Na sequência foi feita a curva padrão, através de uma série de diluições de 8 pontos. E então, uma placa com 96 poços foi preparada. Foi pipetado 10 µl do tampão de bloqueio em toda placa, e 30 µl das amostras e dos reagentes (padrão, controle e branco) foram adicionados nos poços previamente determinados. Em seguida, microesferas revestidas com anticorpos de detecção contra os alvos analisados foram agitadas em vortex por 20 segundos, e 10 µl deste reagente foi adicionado a todos os poços. A placa foi selada e protegida da luminosidade, permanecendo incubada sob agitação em um agitador orbital digital para microplaca (MTS 2/4, IKA, Wilmington, NC, EUA), a 850 ± 50 rpm, durante 1 hora, em temperatura ambiente.

Em seguida, a placa foi lavada três vezes com 100 µl do tampão de ensaio, usando uma lavadora automática de microplaca (Bio-Plex Pro™ II, Wash Station, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos). Após agitação em vortex por 20 segundos, 40 µl dos anticorpos de detecção foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada sob agitação por uma hora, seguindo as mesmas especificações anteriores. Na sequência, a estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente ficoeritrina (SA-PE) foi diluída no tampão de ensaio na proporção de 1:10. E após esta diluição, 20 µl foi adicionado a todos os poços. A placa foi novamente incubada sob agitação, porém neste momento por apenas por 30 minutos.

Após incubação, novamente a placa foi lavada três vezes com 100 µl do tampão de ensaio em uma lavadora automática de microplaca, sem realizar aspiração. A seguir, as *beads*

foram resuspensas em 100 μ l do tampão de ensaio e a placa foi incubada sob agitação por 30 segundos. Foi então realizada a leitura da placa em um analisador multiplex (Bio-Plex 200®, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). As concentrações das amostras foram estimadas a partir da curva padrão, utilizando o *Bio-Plex Manager Software 6.0* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Antes da aplicação dos testes estatísticos, as concentrações dos marcadores de apoptose em nanograma (ng) foram compensadas pelo peso em miligramas (mg) das biópsias do tecido gengival.

3.8 Análise estatística

O estudo foi dividido em amostragem, análise descritiva, de associação e de correlação. Foi utilizada uma amostragem não probabilística por conveniência, devido a inviabilidade de realização do cálculo amostral. Como o cálculo deve ser baseado em apenas uma única variável, não teria sentido termos vários tamanhos de amostra para o mesmo estudo, já que trabalhamos com um grupo de marcadores de apoptose (kit pré-determinado da Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Entretanto, apesar deste tipo de amostragem ser de fácil execução e baixo custo, não permite realizar afirmações com rigor estatístico.

Na análise descritiva, as variáveis qualitativas demográficas foram apresentadas por meio de frequência e percentual. A associação entre as variáveis qualitativas foi feita por meio do teste Qui-quadrado de Pearson, com simulação de Monte Carlo para variável etnia, tendo em vista que uma célula apresentou frequência esperada menor que 5, o que torna necessária a correção. A variável quantitativa idade foi apresentada como média e desvio padrão. Após a aplicação do teste Kolmogorov-Smirnov, observou-se que não houve rejeição da hipótese nula de normalidade da distribuição dos dados, deste modo foi realizado o teste paramétrico t de Student para comparação de médias de idades entre os grupos.

Na análise de associação, as variáveis quantitativas referentes aos dados clínicos e expressão dos marcadores de apoptose foram apresentadas como mediana e intervalo interquartil. Após a aplicação do teste Kolmogorov-Smirnov e verificação de rejeição da hipótese nula de normalidade dos dados, foram aplicados testes não paramétricos. Na análise transversal, o teste estatístico U de Mann-Whitney foi utilizado para amostras independentes de 2 grupos. Na análise longitudinal, os dados de 2 tempos diferentes, foram comparados por meio do teste não paramétrico de Wilcoxon de amostras pareadas. Já a avaliação em 4

tempos, foi realizada por meio da análise de variância de dois fatores de Friedman, seguido pelo teste *post hoc* de Wilcoxon com correção de Bonferroni, para as associações estatisticamente significativas. O delta dos valores de concentração dos marcadores de apoptose entre *baseline* e 1 ano também foi calculado e os valores foram comparados entre os grupos por meio do teste não paramétrico U de Mann-Whitney e apresentados em gráficos do tipo *boxplot*.

A análise de correlação foi utilizada para avaliar possíveis correlações entre os marcadores de apoptose e os dados clínicos, avaliados no mesmo grupo em cada momento do estudo. O coeficiente utilizado foi o ρ de Spearman (ρ) por ser não paramétrico (tendo em vista que se rejeitou a hipótese nula de normalidade de todos os dados com o teste Kolmogorov-Smirnov) e apresentar os melhores resultados para os dados em questão. O coeficiente de correlação e sua significância estatística entre os biomarcadores e os dados clínicos foram apresentados em gráficos do tipo *heat map*. As análises dos dados foram realizadas no programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 23, 2015 (IBM, Chicago, IL, EUA) e o nível de significância utilizado em todo estudo foi de 5% ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Dados demográficos

A amostra total foi composta em sua maioria por indivíduos do sexo feminino (58,8%) e de etnia branca (47,1%). Na análise comparativa das variáveis qualitativas não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos para gênero ($p = 0,201$) e etnia ($p = 0,267$). A idade média no grupo com periodontite foi significativamente maior que no grupo com gengivite (média de idade: $55,9 \pm 9,6$ anos e $41,1 \pm 5,6$ anos, respectivamente) ($p < 0,001$) (tabela 1).

Tabela 1 – Dados demográficos dos pacientes com gengivite e periodontite estágios III e IV generalizada

		Gengivite (n=19)	Periodontite (n=15)	Valor p*
Gênero [n (%)]	Feminino	13 (68,4%)	7 (46,7%)	0,201 ^a
	Masculino	6 (31,6%)	8 (53,3%)	
Etnia [n (%)]	Branco	11 (57,9%)	5 (33,3%)	0,267 ^a
	Pardo	4 (21,1%)	7 (46,7%)	
	Negro	4 (21%)	3 (20%)	
Idade [média ($\pm$ desvio-padrão)]		41,1 ($\pm 5,6$)	55,9 ($\pm 9,6$)	<0,001 ^b

Nota: ^aTeste Qui-quadrado de Pearson (com simulação de Monte Carlo para etnia). ^b Teste T de Student.

* $p \leq 0,05$.

Fonte: A autora, 2022.

4.2 Dados clínicos

A tabela 2 apresenta a comparação entre os grupos dos parâmetros clínicos periodontais no *baseline*. Os valores de IPV (%), SS (%), PB 4-6 mm (%), PB ≥ 7 mm (%),

NIC 3-4 mm (%), NIC $\geq$ 5 mm (%), PB (sítio da biópsia) e NIC (sítio da biópsia) foram significativamente maiores nos pacientes com periodontite ($p < 0,001$). Enquanto que, os valores percentuais de PB $\leq$ 3 mm e NIC $\leq$ 2 mm foram significativamente menores no grupo de pacientes com periodontite ($p < 0,001$). Os valores de IP e IG, relativos aos sítios de coleta das biópsias, não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p = 0,471$ e $p = 0,864$, respectivamente).

Tabela 2 – Mediana (intervalo interquartil) dos parâmetros clínicos periodontais dos pacientes com gengivite e periodontite estágios III e IV generalizada no *baseline*

	Gengivite (n=19)	Periodontite (n=15)	Valor p*
Full mouth			
% IPV	37,5 (14,7)	64,5 (28,3)	<0,001
% SS	30,4 (25,2)	52,7 (27,5)	<0,001
% PB $\leq$ 3 mm	100 (0)	68,4 (32,1)	<0,001
% PB 4-6 mm	0 (0)	30,8 (22,4)	<0,001
% PB $\geq$ 7 mm	0 (0)	9,1 (12,2)	<0,001
% NIC $\leq$ 2 mm	100 (0)	42,3 (34,8)	<0,001
% NIC 3-4 mm	0 (0)	25,6 (17,9)	<0,001
% NIC $\geq$ 5 mm	0 (0)	26,8 (17,8)	<0,001
Sítio de coleta das biópsias			
PB (mm)	3 (1)	9 (3)	<0,001
NIC (mm)	1 (1)	7 (4)	<0,001
IP	2 (0)	2 (0)	0,471
IG	2 (0)	2 (0)	0,864

Legenda: Índice de Placa Visível (IPV), Sangramento a Sondagem (SS), Profundidade de Bolsa (PB), Nível de Inserção Clínica (NIC), Índice de Placa (IP) e Índice Gengival (IG).

Nota: *Teste U de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Fonte: A autora, 2022.

Diversos dados clínicos periodontais do grupo de pacientes com periodontite foram significativamente alterados no *baseline*, 3 meses, 6 meses e 1 ano (tabela 3). Os valores de IPV (%), SS (%), PB 4 - 6 (%), PB $\geq$ 7 (%), NIC $\geq$ 5 (%), e também PB, NIC, IP e IG, relativos aos sítios de coleta das biópsias, reduziram significativamente em 3 meses, 6 meses

e 1 ano, quando comparados ao *baseline* ($p \leq 0,05$). Já os valores de $PB \leq 3$ (%) e $NIC \leq 2$ (%) aumentaram significativamente no mesmo período ($p \leq 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa para os valores de $NIC 3 - 4$ (%) em 3 meses, 6 meses e 1 ano, quando comparados ao *baseline* ($p = 0,414$, $p = 0,196$ e $p = 0,100$, respectivamente).

Na análise múltipla (4 intervalos de tempo) houve redução significativa dos valores de IPV (%), SS (%), $PB 4 - 6$ (%), $PB \geq 7$ (%), $NIC \geq 5$ (%), e também PB, NIC, IP e IG, relativos ao sítio de coleta das biópsias ($p \leq 0,001$). Enquanto que os valores de $PB \leq 3$ (%) e $NIC \leq 2$ (%) aumentaram significativamente ($p \leq 0,001$). Os valores de $NIC 3 - 4$ (%) não apresentaram diferença estatisticamente significativa ao longo do tempo ($p = 0,737$) (tabela 3).

No grupo de pacientes com gengivite, os valores de IPV (%), SS (%), IP (sítio biópsia) e IG (sítio biópsia) reduziram significativamente no tempo 1 ano quando comparados ao *baseline* ($p \leq 0,001$) (tabela 4).

Tabela 3 – Mediana (intervalo interquartil) dos parâmetros clínicos periodontais dos pacientes com periodontite estágios III e IV generalizada no *baseline*, 3 meses, 6 meses e 1 ano

	<i>Baseline</i>	3 meses	p1*	6 meses	p2*	1 ano	p3*	p4[#]
<i>Full mouth</i>								
% IPV	64,5 (28,3)	29,4 (15,5)	0,001	25 (15)	0,001	20,2 (7,4)	0,001	<0,001
% SS	52,7 (27,5)	22,4 (30,3)	0,001	17,9 (27,9)	0,001	9,5 (38,9)	0,001	<0,001
% PB ≤ 3 mm	68,4 (32,1)	82,7 (18,1)	0,001	87,2 (18,3)	0,001	87,3 (12,6)	0,001	<0,001
% PB 4-6 mm	30,8 (22,4)	17,3 (16,8)	0,001	12,3 (18)	0,001	11,3 (12,8)	0,001	<0,001
% PB ≥ 7 mm	9,1 (12,2)	3 (5,6)	0,001	0,6 (1,2)	0,001	0 (0,8)	0,001	<0,001
% NIC ≤ 2 mm	42,3 (34,8)	51,2 (31,6)	0,007	53,8 (29,1)	0,009	55,3 (29,3)	0,006	<0,001
% NIC 3-4 mm	25,7 (17,9)	23,7 (15,6)	0,414	27,3 (15,3)	0,196	28,6 (17,2)	0,100	0,737
% NIC ≥ 5 mm	26,8 (17,8)	16,7 (14,6)	0,002	12,3 (14,4)	0,001	11,1 (15,5)	0,001	<0,001
Sítio de coleta das biópsias								
PB (mm)	9 (3)	6 (4)	0,001	5 (3)	0,001	5 (3)	0,001	<0,001
NIC (mm)	7 (4)	6 (5)	0,026	5 (5)	0,002	4 (5)	0,002	<0,001
IP	2 (0)	2 (1)	0,011	1 (1)	0,001	0 (1)	0,001	<0,001
IG	2 (0)	1 (1)	0,003	0 (1)	0,001	0 (1)	0,002	<0,001

Legenda: Índice de Placa Visível (IPV), Sangramento a Sondagem (SS), Profundidade de Bolsa (PB), Nível de Inserção Clínica (NIC), Índice de Placa (IP) e Índice Gengival (IG), p1 = comparação entre *baseline* e 3 meses, p2 = comparação entre *baseline* e 6 meses, p3 = comparação entre *baseline* e 1 ano e p4 = comparação entre os 4 períodos.

Nota: *Teste de Wilcoxon. [#] Análise de Variância de dois fatores de Friedman ($p \leq 0,05$).

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 4 – Mediana (intervalo interquartil) dos parâmetros clínicos periodontais dos pacientes com gengivite no *baseline* e 1 ano

	Baseline	1 ano	Valor p*
Full mouth			
% IPV	37,5 (14,7)	14,8 (10)	<0,001
% SS	30,4 (25,2)	7,1 (9,9)	<0,001
% PB ≤ 3 mm	100 (0)	100 (0)	1,000
% PB 4-6 mm	0 (0)	0 (0)	1,000
% PB ≥ 7 mm	0 (0)	0 (0)	1,000
% NIC ≤ 2 mm	100 (0)	100 (0)	1,000
% NIC 3-4 mm	0 (0)	0 (0)	1,000
% NIC ≥ 5 mm	0 (0)	0 (0)	1,000
Sítio de coleta das biópsias			
PB (mm)	3 (1)	3 (1)	0,317
NIC (mm)	1 (1)	1 (1)	0,317
IP	2 (0)	1 (1)	0,001
IG	2 (0)	1 (1)	<0,001

Legenda: Índice de Placa Visível (IPV), Sangramento a Sondagem (SS), Profundidade de Bolsa (PB), Nível de Inserção Clínica (NIC), Índice de Placa (IP) e Índice Gengival (IG).

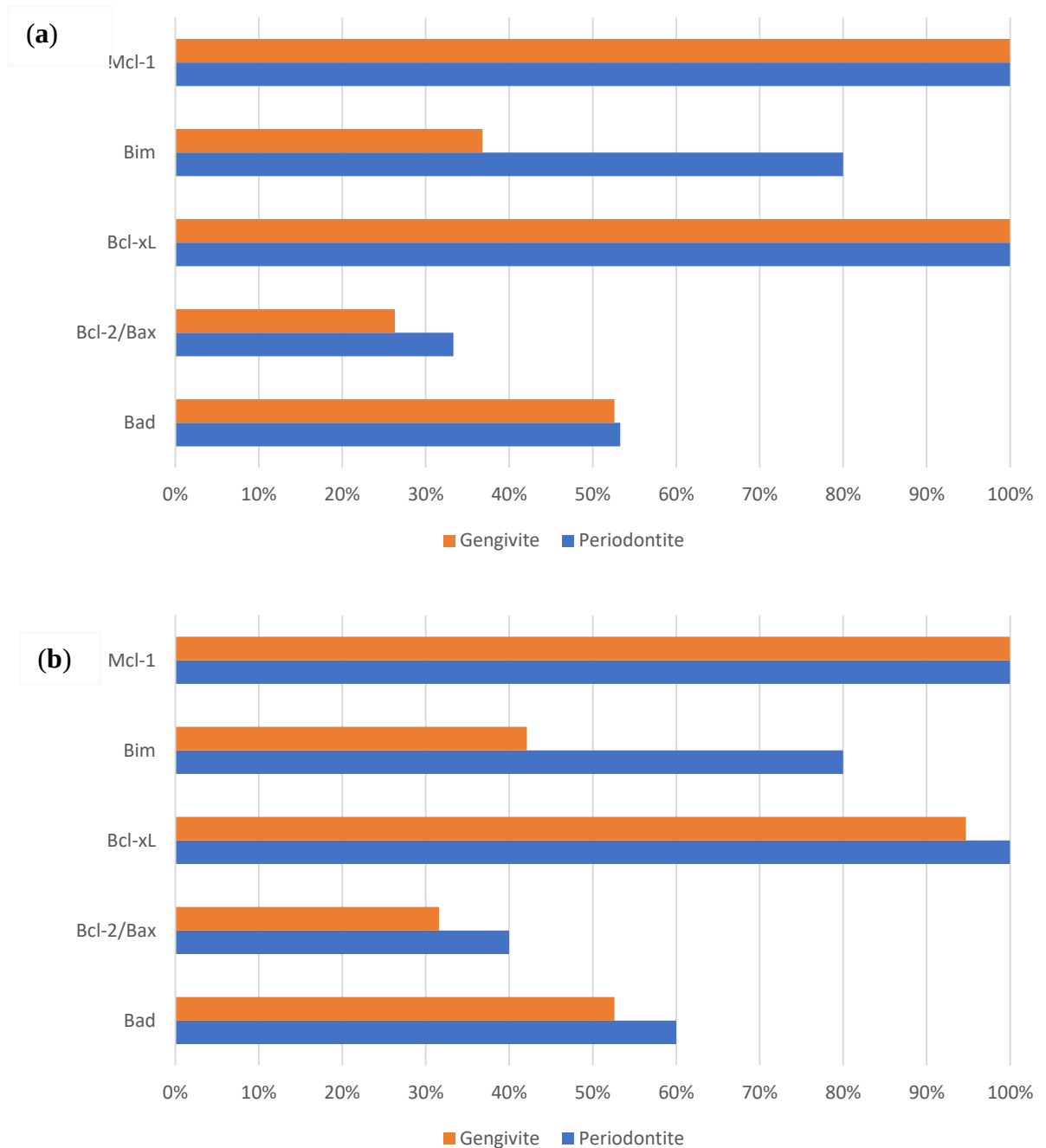
Nota: *Teste de Wilcoxon ($p \leq 0,05$).

Fonte: A autora, 2022.

4.3 Expressão dos marcadores de apoptose no tecido gengival

A figura 3 apresenta a porcentagem de detecção dos marcadores de apoptose nas biópsias de tecido gengival dos pacientes com gengivite e periodontite estágios III e IV generalizada no *baseline* e após 1 ano. Observa-se que o marcador Mcl-1 foi detectado em todas as amostras analisadas. Bcl-xL também apresentou uma ampla faixa de detecção, não sendo expresso em apenas 5,3% das biópsias de tecido gengival do grupo de pacientes com gengivite, na análise de 1 ano. Bad, Bcl-xL, Bim (no grupo de pacientes com periodontite) e Mcl-1 foram detectados em mais de 50% das amostras.

Figura 3 – Porcentagem de detecção dos marcadores de apoptose nas biópsias de tecido gengival dos pacientes com gengivite e periodontite estágios III e IV generalizada no *baseline* e após 1 ano



Legenda: (a) – *baseline*; (b) – 1 ano.

Fonte: A autora, 2022.

Na tabela 5, referente aos valores do *baseline*, observa-se que as concentrações de Mcl-1 no tecido gengival de pacientes com periodontite foram significativamente menores, quando comparadas aos valores dos pacientes com gengivite ($p = 0,002$). As concentrações de Bad, Bcl-xL, Mcl-1 e do dímero Bcl-2/Bax não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 5 – Mediana (intervalo interquartil) da concentração (ng/mg) dos marcadores de apoptose no tecido gengival dos pacientes com gengivite e periodontite estágios III e IV generalizada no *baseline*

	Gengivite (n=19)	Periodontite (n=15)	Valor p*
Bad	0 (0,1)	0 (0,3)	0,656
Bcl-2/Bax dimmer	0 (0)	0 (0,2)	0,891
Bcl-xL	0,7 (0,4)	0,8 (0,7)	0,302
Bim	0 (0)	0 (0)	0,706
Mcl-1	0,4 (0,2)	0,2 (0,1)	0,002

Nota: *Teste U de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Fonte: A autora, 2022.

Após o intervalo de um ano, não houve diferença estatisticamente significativa na concentração de Bad, Bcl-xL, Bim, Mcl-1 e do dímero Bcl-2/Bax no tecido gengival dos pacientes com periodontite ($p > 0,05$) (tabela 6). Entretanto, na tabela 7 nota-se que as concentrações de Bim no tecido gengival de pacientes com gengivite foram significativamente maiores após um ano, quando comparadas aos valores do *baseline* ($p = 0,04$).

Tabela 6 – Mediana (intervalo interquartil) da concentração (ng/mg) dos marcadores de apoptose no tecido gengival dos pacientes com periodontite estágios III e IV generalizada no *baseline* e 1 ano

	<i>Baseline</i>	1 ano	Valor p*
Bad	0 (0,3)	0,1 (0,2)	0,859
Bcl-2/Bax dimmer	0 (0,2)	0 (0)	0,214
Bcl-xL	0,8 (0,7)	0,6 (0,6)	0,609
Bim	0 (0)	0 (0)	0,334
Mcl-1	0,2 (0,1)	0,2 (0,1)	0,776

Nota: *Teste de Wilcoxon ($p \leq 0,05$).

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 7 – Mediana (intervalo interquartil) da concentração (ng/mg) dos marcadores de apoptose no tecido gengival dos pacientes com gengivite no *baseline* e 1 ano

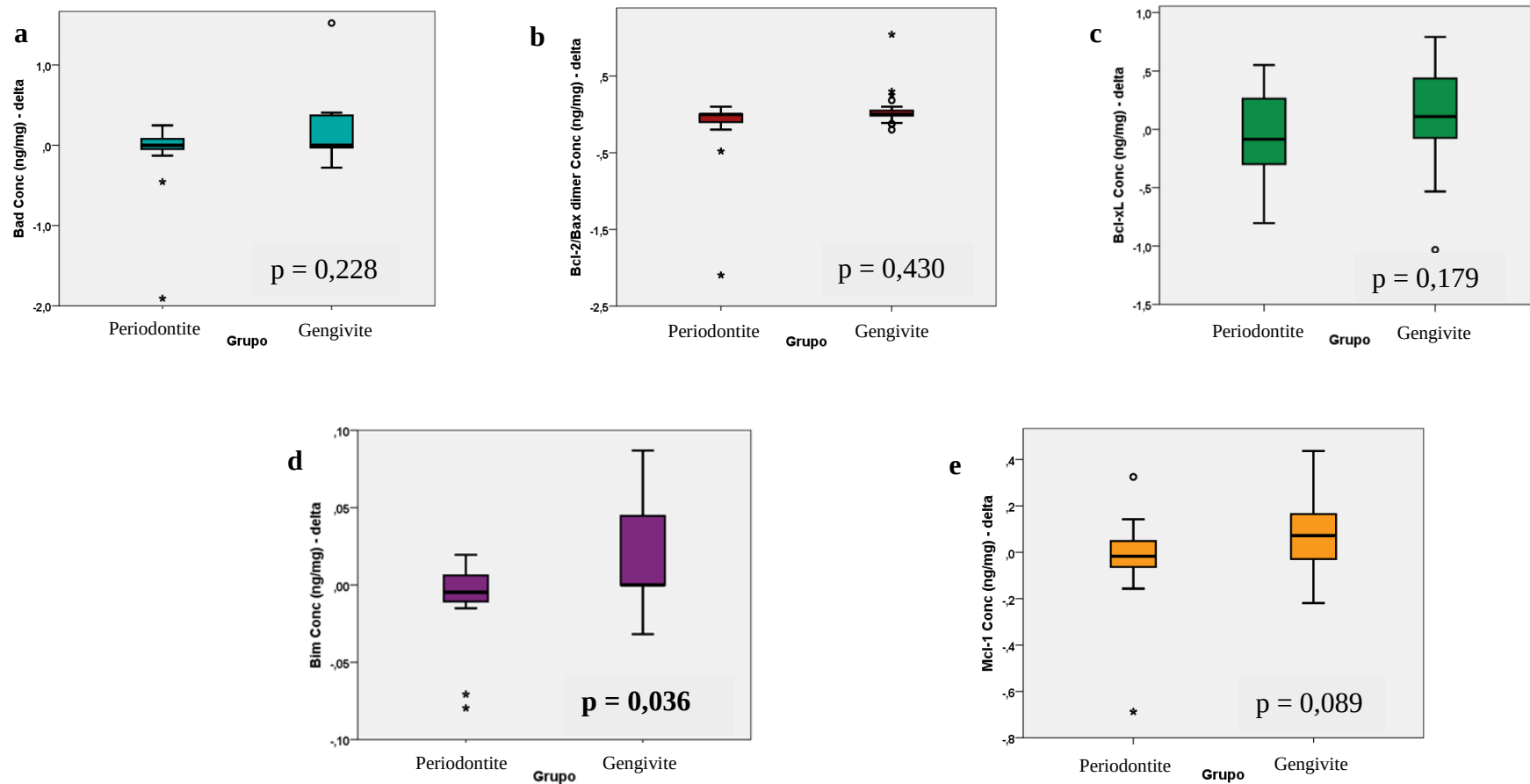
	<i>Baseline</i>	1 ano	Valor p*
Bad	0 (0,1)	0,1 (0,4)	0,084
Bcl-2/Bax dimmer	0 (0)	0 (0,1)	0,445
Bcl-xL	0,7 (0,4)	0,8 (0,6)	0,159
Bim	0 (0)	0 (0,1)	0,04
Mcl-1	0,4 (0,2)	0,4 (0,2)	0,070

Nota: *Teste de Wilcoxon ($p \leq 0,05$).

Fonte: A autora, 2022.

A figura 4 apresenta os gráficos (*box plot*) com o delta, a diferença entre *baseline* e 1 ano, da concentração dos marcadores de apoptose (ng/mg) no tecido gengival dos pacientes com gengivite e periodontite e a comparação entre grupos destes valores. Observa-se que os pacientes com periodontite estágios III e IV generalizada apresentaram valores de delta das concentrações de Bim significativamente menores, quando comparados aos valores dos pacientes com gengivite ($p = 0,036$). O delta das concentrações de Bad, Bcl-xL, Mcl-1 e do dímero Bcl-2/Bax não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$).

Figura 4 – Delta da expressão dos marcadores Bad, Bcl-2/Bax, Bcl-xL, Bim e Mcl-1 (ng/mg) no tecido gengival dos pacientes com gengivite e periodontite estágios III e IV generalizada



Legenda: a – Bcl-2 associated death promoter (Bad); b – B-cell lymphoma 2/Bcl-2-associated X protein (Bcl-2/Bax); c – B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL); d – Activator subtype of BH3-only proteins (Bim); e – Myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1).

Nota: Teste U de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Fonte: A autora, 2022.

4.4 Análise de correlação

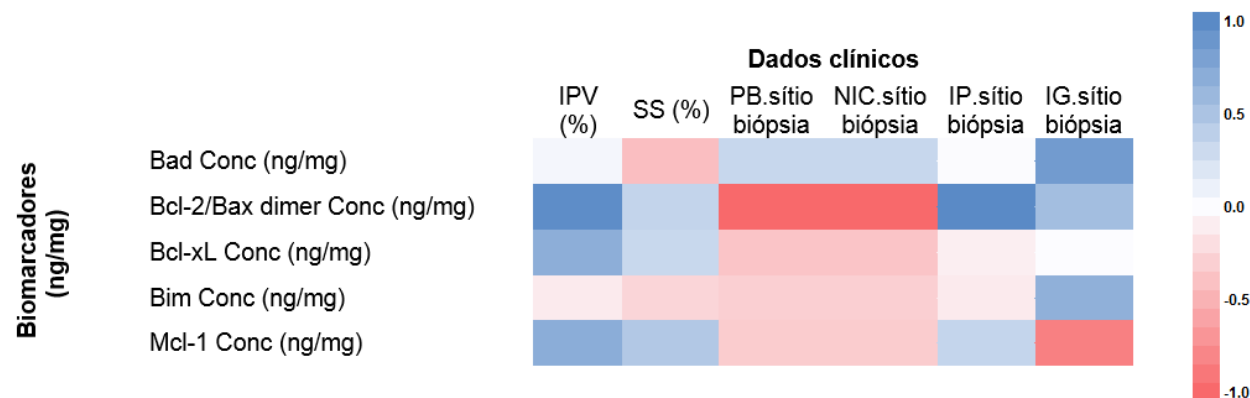
O coeficiente de correlação de Spearman (ρ) e sua significância estatística (p) entre os marcadores de apoptose (ng/mg) e os dados clínicos foram apresentados em gráficos do tipo *heat map*.

As correlações referentes ao grupo de pacientes com gengivite são apresentadas na figura 5 (baseline e 1 ano). No *baseline*, não ocorreu correlação significativa entre os dados clínicos e os biomarcadores. Contudo, em 1 ano, Mcl-1 e IG (sítio biópsia) ($\rho = 0,7$, $p = 0,002$) apresentaram correlação forte positiva e Bcl-xL e SS (%) ($\rho = 0,5$, $p = 0,019$) apresentaram correlação moderada positiva. Bcl-2/Bax e PB (sítio biópsia) e Bcl-2/Bax e NIC (sítio biópsia) (ambos $\rho = -0,5$, $p = 0,048$) apresentaram correlação moderada e inversamente proporcional.

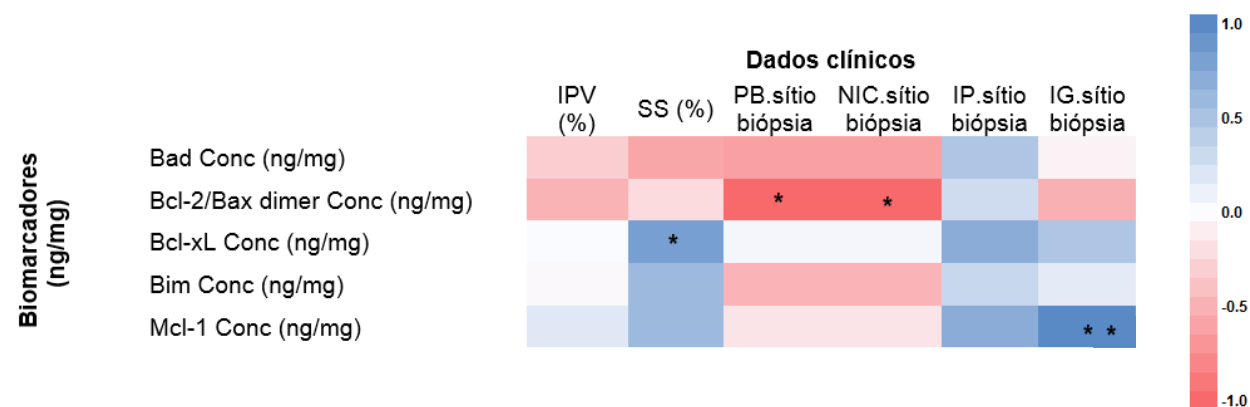
Os dados relativos ao grupo de pacientes com periodontite são apresentados na figura 6 (baseline e 1 ano). No *baseline*, houve correlação significativa entre alguns parâmetros clínicos periodontais e marcadores de apoptose. Bad e IP (sítio biópsia) apresentaram correlação moderada positiva ($\rho = 0,5$, $p = 0,038$). Bad e PB (sítio biópsia) ($\rho = -0,5$, $p = 0,037$) e Bcl-2/Bax e PB (sítio biópsia) ($\rho = -0,5$, $p = 0,041$) apresentaram correlação moderada e inversamente proporcional. Não houve correlação significativa entre os parâmetros clínicos periodontais e os marcadores de apoptose na avaliação de 1 ano.

Figura 5 – Análise de correlação entre os parâmetros clínicos periodontais e a expressão dos marcadores de apoptose (ng/mg) no tecido gengival dos pacientes com gengivite no *baseline* e em 1 ano

(a)



(b)



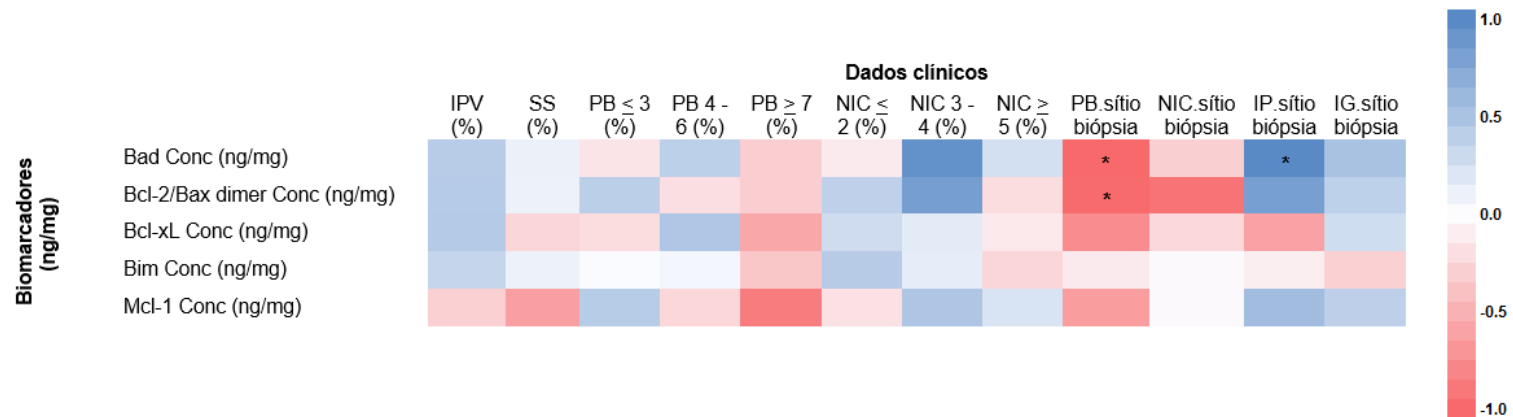
Legenda: (a) – *baseline*; (b) – 1 ano.

Nota: Coeficiente de correlação de Spearman (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

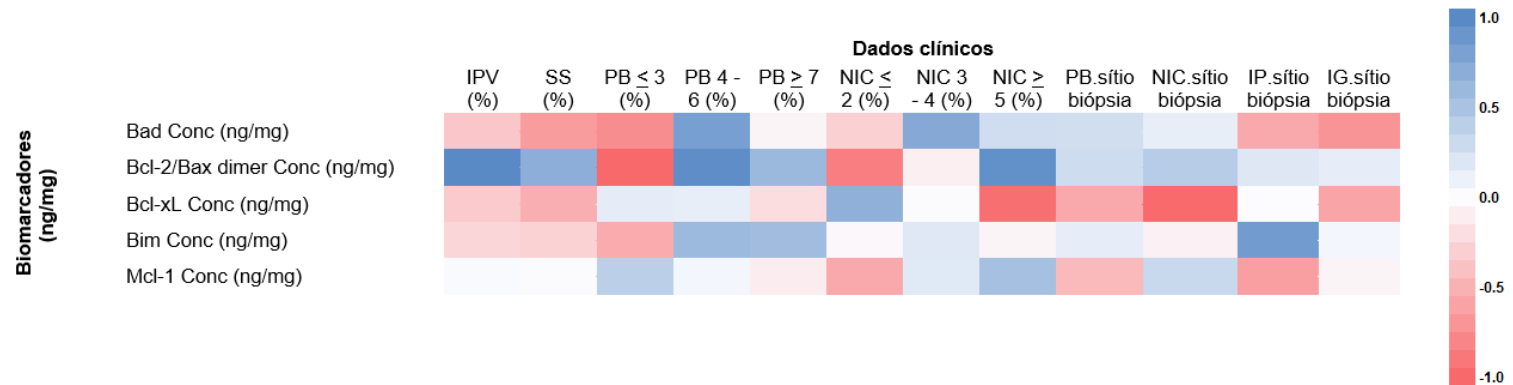
Fonte: A autora, 2022.

Figura 6 – Análise de correlação entre os parâmetros clínicos periodontais e a expressão dos marcadores de apoptose (ng/mg) no tecido gengival dos pacientes com periodontite estágios III e IV generalizada no *baseline* e em 1 ano

(a)



(b)



Legenda: (a) – *baseline*; (b) – 1 ano.

Nota: Coeficiente de correlação de Spearman (* $p \leq 0,05$).

Fonte: A autora, 2022.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, observamos maior impacto da terapia periodontal não cirúrgica na expressão dos marcadores de apoptose no tecido gengival dos pacientes com gengivite. Após 1 ano de tratamento houve aumento significativo da expressão do marcador pró-apoptótico Bim nas biópsias dos pacientes com gengivite. Apesar de não termos encontrado diferença significativa na expressão dos marcadores Bad e Mcl-1, ambos apresentaram uma tendência de aumento no tecido gengival deste mesmo grupo de pacientes. Entretanto, no grupo com periodontite, não houve diferença significativa na concentração dos biomarcadores, após 1 ano de tratamento. Diferentemente dos nossos resultados, Beikler et al. (2008) apresentaram aumento significativo na expressão do gene *Baculoviral IAP repeat-containing* (BIRC-1), responsável pela inibição da atividade da caspase-3, em biópsias gengivais de pacientes com periodontite crônica severa, após a terapia periodontal não cirúrgica. E Aral et al. (2019a), combinando a Terapia *Full Mouth Disinfection* e o uso de antibióticos sistêmicos, relataram redução significativa da expressão dos marcadores pró-apoptóticos caspase-3 e p53 no fluido gengival de pacientes com periodontite, após 3 e 6 meses de tratamento, respectivamente. A diferença no grupo de biomarcadores avaliados por cada estudo, pode justificar as divergências no equilíbrio da expressão dos marcadores pós-tratamento. Apesar de não termos encontrado diferenças significativas no grupo de pacientes com periodontite, conseguimos avaliar o impacto da terapia periodontal não cirúrgica na expressão de um maior número de biomarcadores, por um período maior de tempo e sem auxílio de antibioticoterapia.

Quando realizada a comparação entre grupos da diferença entre *baseline* e 1 ano da expressão dos marcadores (delta), observamos que a variação dos valores das concentrações de Bim no tecido gengival dos pacientes com periodontite foram significativamente menores. E houve uma tendência de diferença significativa no delta da expressão de Mcl-1 nas biópsias dos pacientes com gengivite. Sugerindo novamente ter ocorrido maior impacto da terapia periodontal não cirúrgica na expressão dos biomarcadores no tecido gengival dos pacientes com gengivite, auxiliando no equilíbrio da expressão dos marcadores para promoção da homeostasia tecidual e resolução do processo inflamatório.

Na análise transversal da expressão dos marcadores de apoptose, observamos que as concentrações de Mcl-1 no tecido gengival de pacientes com gengivite foram significativamente maiores, quando comparadas aos valores dos pacientes com periodontite. Figueredo et al. (2019) que também avaliaram a expressão de marcadores de apoptose em

biópsias de tecido gengival, porém observaram níveis significativamente maiores de Bcl-xL e dos dímeros Bcl-xL/Bak e Mcl-1/Bak no tecido gengival de pacientes com periodontite. Assim como, Gamonal et al. (2001) e Bulut et al. (2006) que relataram expressão significativamente maior da proteína antiapoptótica Bcl-2 em biópsias de tecido gengival de pacientes com periodontite crônica e agressiva. Estes resultados podem sugerir um retardamento da atividade celular apoptótica no tecido gengival de pacientes com periodontite, conforme demonstrado por Gamonal et al. (2003), que relataram uma correlação entre a apoptose tardia de neutrófilos no tecido gengival de pacientes com periodontite crônica com a baixa expressão do marcador pró-apoptótico Bax e níveis aumentados de TNF- α e GM-CSF no fluido gengival. Estes mediadores inflamatórios estão envolvidos no controle da vida útil dos neutrófilos, retardando o processo apoptótico e aumentando o potencial inflamatório destas células.

Por outro lado, outros autores relataram um aumento da atividade apoptótica em pacientes com periodontite, avaliando a expressão dos marcadores de apoptose na saliva, no soro e no fluido gengival. Abuhussein et al. (2014) encontraram maior probabilidade de expressão no fluido, dos marcadores pró-apoptóticos caspase-3, Fas-Proteína Associada ao Domínio de Morte (Fas) e Fas-Proteína Ligante (FasL) em sítios com PB $\geq$ 5 mm., quando comparados aos sítios com PB < 5 mm. Além disso, Aral et al. (2019b) observaram uma expressão significativamente maior de caspase-9 e do Fator Indutor de Apoptose (AIF) no fluido crevicular de pacientes com periodontite agressiva. Resultado semelhante foi obtido por Pradeep et al. (2016), que avaliaram a expressão de caspase-3 no soro e fluido gengival, e observaram valores significantemente maiores em pacientes com periodontite. Foi observado um aumento progressivo e significativo entre os três grupos avaliados (saudáveis, com gengivite e com periodontite, respectivamente). A razão para estas diferenças com o nosso resultado são desconhecidas, entretanto uma metodologia que permitisse mensurar a expressão dos biomarcadores e identificar os tipos celulares que estariam sofrendo apoptose poderia auxiliar na compreensão da atividade apoptótica em cada perfil de paciente.

A avaliação da atividade inflamatória, através da expressão de biomarcadores no tecido gengival, é relatada com frequência na literatura (GUO et al., 2021; CLARK et al., 2020; FIGUEREDO et al., 2017; MENEGAT et al., 2016). A análise da expressão dos marcadores de apoptose no tecido gengival parece ter um bom padrão de detecção. Neste estudo, observamos que todos os biomarcadores avaliados apresentaram uma porcentagem de detecção $\geq$ 25% nas biópsias de ambos os grupos. Listyarifah et al. (2017), Beikler et al. (2008) e Gamonal et al. (2001 e 2003) também avaliaram a expressão de marcadores pró e

antiapoptóticos em biópsias de tecido gengival. Entretanto, apenas Beikler et al. (2008) relatou o impacto da terapia periodontal não cirúrgica na expressão gênica no tecido gengival.

Ao analisarmos os resultados clínicos do estudo, verificamos o sucesso da terapia periodontal não cirúrgica, em especial nos 3 primeiros meses de tratamento. No grupo de pacientes com periodontite, houve melhora significativa de todos os parâmetros clínicos avaliados, exceto a % de sítios com NIC 3-4 mm, nas comparações em pares (2 intervalos de tempo) e na análise múltipla (ao longo de 1 ano). Na periodontia, a terapia periodontal não cirúrgica é o tratamento padrão ouro, através do qual é possível obter diminuição do SS, redução da PB e ganho de inserção clínica (BADERSTEN; NILVÉUS; EGELBERG, 1981, 1984). Em uma meta-análise, Citterio et al. (2022) reportou o efeito da terapia periodontal não cirúrgica na porcentagem e no número de bolsas periodontais, e também no potencial de cicatrização das mesmas, ao longo de 1 ano de acompanhamento. Relatando uma média de % PB 4–6 mm residuais de 33,63 % e % PB $\geq$ 7 mm de 13.65 %. Em outra meta-análise, Hung e Douglass (2012) relataram uma redução média de PB de 2 mm e ganhos de inserção médios de 1 mm, em bolsas profundas. Portanto, o desfecho clínico alcançado em nosso estudo está alinhado aos resultados relatados na literatura.

Na análise de correlação dos biomarcadores com os parâmetros clínicos observamos que, no grupo de pacientes com gengivite, as correlações com significância ocorreram apenas após 1 ano de tratamento, enquanto que no grupo com periodontite não houve correlação significativa após o tratamento, o que poderia novamente indicar um maior impacto da terapia periodontal não cirúrgica na expressão dos biomarcadores nas biópsias dos pacientes com gengivite. Após 1 ano, houve correlação forte, positiva e significante entre o Mcl-1 e IG (sítio biópsia), sugerindo aumento da atividade antiapoptótica em sítios com maior grau de inflamação.

CONCLUSÃO

A terapia periodontal não cirúrgica não alterou significativamente a expressão dos marcadores de apoptose Bad, Bcl-xL, Bim, Mcl-1 e do dímero Bax/Bcl-2, em biópsias de tecido gengival de pacientes com periodontite estágios III e IV generalizada, após 1 ano de tratamento. Entretanto, provocou aumento significativo da expressão do marcador pró-apoptótico Bim no tecido gengival dos pacientes com gengivite.

REFERÊNCIAS

- ABATE, M.. et al. Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence. *Semin. Cell. Dev. Biol.* v. 98, p. 139-153, February 2020.
- ABUHUSSEIN, H. et al. The role of factors associated with apoptosis in assessing periodontal disease status. *J. Periodontol.* v. 85, n. 8, p. 1086-1095, August 2014.
- AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int. Dent. J.* v. 25, n. 4, p. 229-235, December 1975.
- ALVES, J. C. *Expressão de fatores apoptóticos em biópsias de tecido gengival de pacientes com periodontite crônica severa generalizada*. 2016. 48f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.
- ARAL, K.; ARAL, C. A.; KAPILA, Y. Six-month clinical outcomes of non-surgical periodontal treatment with antibiotics on apoptosis markers in aggressive periodontitis. *Oral. Dis.* v. 25, n. 3, p. 839-847, April 2019a.
- ARAL, K.; ARAL, C. A.; KAPILA, Y. The role of caspase-8, caspase-9, and apoptosis inducing factor in periodontal disease. *J. Periodontol.* v. 90, n. 3, p. 288-294, March 2019b.
- ASHKENAZI, A. et al. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nat. Rev. Drug. Discov.* v. 16, n. 4, p. 273-284, April 2017.
- BADERSTEN, A.; NILVÉUS, R.; EGELBERG, J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. I. Moderately advanced periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* v. 8, n. 1, p. 57-72, February 1981.
- BADERSTEN, A.; NILVÉUS, R.; EGELBERG, J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. II. Severely advanced periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* v. 11, n. 1, p. 63-76, January 1984.
- BEIKLER, T. et al. Gene expression in periodontal tissues following treatment. *BMC Med Genomics.* n.7; p. 1-30, July 2008.
- BEILER, T. F. C. S. B. et al. Impact of non-surgical periodontal treatment on salivary expression of cytokines related to bone metabolism. *Odontol.* v. 108, n. 4, p. 646-652, October 2020.
- BERTHELOOT, D.; LATZ, E.; FRANKLIN, B. S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell. Mol. Immunol.* v. 18, n. 5, p. 1106-1121, May 2021.
- BIRKINSHAW, R. W.; CZABOTAR, P. E. The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation. *Semin. Cell. Dev. Biol.* v. 72, p. 152-162, December 2017.
- BOCK, F. J.; TAIT, S. W. G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* v. 21, n. 2, p. 85-100, February 2020.

BORGES, C. D. et al. Clinical attachment loss and molecular profile of inflamed sites before treatment. *J. Appl. Oral. Sci.* v. 27, e20180671, September 2019.

BULUT, S. et al. Expression of caspase-3, p53 and Bcl-2 in generalized aggressive periodontitis. *Head. Face. Med.* v. 2, n. 17, June 2006.

CARNEIRO, B. A.; EL-DEIRY, W. S. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* v. 17, n. 7, p. 395-417, July 2020.

CATON, G. J. et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J. Clin. Periodontol.* v. 45, s. 20, p. 1-8, June 2018.

CEKICI, A. et al. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol. 2000.* v. 64, n. 1, p. 57-80, February 2014.

CHAPPLE, I. L. C. et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. Periodontol.* v. 89, s. 1, p. 74-84, June 2018.

CITTERIO, F. et al. Pocket closure and residual pockets after non-surgical periodontal therapy: A systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Periodontol.* v. 49, n. 1, p. 02-14, January 2022.

CLARK, R. et al. Expression of colony-stimulating factor 1 and interleukin-34 in gingival tissue and gingival fibroblasts from periodontitis patients and controls. *J. Periodontol.* v. 91, n. 6, p. 828-835, June 2020.

D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell. Biol. Int.* v. 43, n. 6, p. 582-592, June 2019.

DORSTYN, L.; AKEY, C. W.; KUMAR, S. New insights into apoptosome structure and function. *Cell. Death. Differ.* v. 25, n. 7, p. 1194-1208, July 2018.

FIGUEREDO, C. M.. et al. Anti-apoptotic traits in gingival tissue from patients with severe generalized chronic periodontitis. *J. Investig. Clin. Dent.* v. 10, n. 3, p. e12422, August 2019.

FIGUEREDO, C. M.. et al. Activity of inflammatory bowel disease influences the expression of cytokines in gingival tissue. *Cytokine.* v. 95, p. 1-6, July 2017.

GAMONAL, J. et al. Apoptosis in chronic adult periodontitis analyzed by in situ DNA breaks, electron microscopy and immunohistochemistry. *J Periodontol.* v. 72, n. 4, p. 517-525, April 2001.

GAMONAL, J. et al. Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients. *J. Clin. Periodontol.* v. 30, n. 7, p. 616-623, July 2003.

GUO, et al. Leptin regulates OPG and RANKL expression in Gingival Fibroblasts and Tissues of Chronic Periodontitis Patients. *Int. J. Med. Sci.* v. 18, n. 11, p. 2431-2437, April 2021.

GURSOY, U. K. et al. Associations between salivary bone metabolism markers and periodontal breakdown. *J. Periodontol.* v. 87, n. 4, p. 367–375, April 2016.

HAJISHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* v. 15, n. 1, p. 30-44, January 2015.

HASSAN, M. et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed. Res. Int.* v. 1, 150845, June 2014. Retraction in: *Biomed. Res. Int.* v. 1, 2451249, August 2020.

HUNG, H. C.; DOUGLASS, C. W. Meta-analysis of the effect of scaling and root planing, surgical treatment and antibiotic therapies on periodontal probing depth and attachment loss. *J. Clin. Periodontol.* v. 29, n. 11, p. 975-986, November 2002.

KALE, J.; OSTERLUND, E. J.; ANDREWS, D. W. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell. Death. Differ.* v. 25, n. 1, p. 65-80, January 2018.

KESAVARDHANA, S.; MALIREDDI, R. K. S.; KANNEGANTI, T. D. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Pyroptosis. *Annu. Rev. Immunol.* v. 26, n. 38, p. 567-595, April 2020.

LI, K. X. et al. LTB4-induced anti-apoptosis and infiltration of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* v. 38, n. 3, p. 543-551, May-June 2020.

LISTYARIFAH, D. et al. Infection and apoptosis associated with inflammation in periodontitis: An immunohistologic study. *Oral. Dis.* v. 23, n. 8, p. 1144-1154, November 2017.

LÖE, H. The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J Periodontol.* v. 38, n. 6, p. 610-616, November-December 1967.

MAJTNEROVÁ, P.; ROUŠAR, T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Mol. Biol. Rep.* v. 45, n. 5, p. 1469-1478, October 2018.

MCLLWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase functions in cell death and disease. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* v. 5, n. 4, a008656, April 2013. a008656. doi: 10.1101/cshperspect.a008656. Erratum in: *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* v. 7, n. 4, pii: a026716, April 2015.

MENEGAT, J. S. et al. Cytokine expression in gingival and intestinal tissues of patients with periodontitis and inflammatory bowel disease: An exploratory study. *Arch. Oral. Biol.* v. 66, p. 141-146, June 2016.

PAPAPANOU, P. N. et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. Clin. Periodontol.* v. 45, s 20, p.162–170, June 2018.

PARRISH, A. B.; FREEL, C. D.; KORNBLUTH, S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* v. 5, n. 6, a008672, June 2013.

POON, I. K. et al. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat. Rev. Immunol.* v. 14, n. 3, p. 166-180, March 2014.

PRADEEP, A. R. et al. Expression of key executor of apoptosis caspase-3 in periodontal health and disease. *J. Investig. Clin. Dent.* v. 7, n. 2, p. 174-179, May 2016.

RAMIREZ, M. L. G.; SALVESEN, G. S. A primer on caspase mechanisms. *Semin. Cell. Dev. Biol.* v. 82, p. 79-85, October 2018.

SILNESS, J.; LÖE, H. Periodontal disease in pregnancy II – Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand.* v. 22, n. 1, p. 121-135, February 1964.

SINGH, R.; LETAI, A.; SAROSIEK, K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* v. 20, n. 3, p. 175-193, March 2019.

SONG, B. et al. Programmed cell death in periodontitis: recent advances and future perspectives. *Oral. Dis.* v. 23, n. 5, p. 609-619, July 2017.

STEPHENS, A. D.; BANIGAN, E. J.; MARKO, J. F. Separate roles for chromatin and lamins in nuclear mechanics. *Nucleus.* v. 9, n. 1, p. 119-124, January 2018.

TONETTI, M. S.; GREENWELL, H.; KORNMAN, K. S. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J. Periodontol.* v. 89, s. 1, 159–172, June 2018.

VAN OPDENBOSCH, N.; LAMKANFI, M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity.* v. 50, n. 6, p. 1352-1364, June 2019.

WARREN, C. F. A.; WONG-BROWN, M. W.; BOWDEN, N. A. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell. Death. Dis.* v. 10, n. 3, p. 177, February 2019.

WICKMAN, G.; JULIAN, L.; OLSON, M. F. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. *Cell. Death. Differ.* v. 19, n. 5, p. 735-742, May 2012.

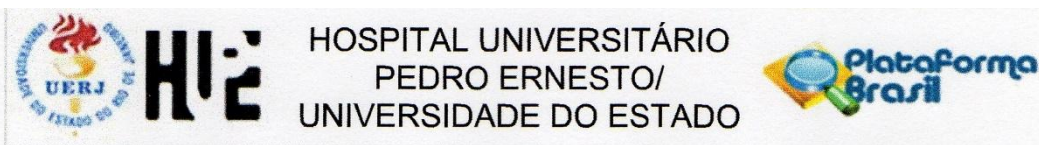
YANG, F. et al. Programmed Cell Death Pathways in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol. Res.* v. 1, 3638562, December 2019.

YANG, S. K. et al. The Role of Mitochondria in Systemic Lupus Erythematosus: A Glimpse of Various Pathogenetic Mechanisms. *Curr. Med. Chem.* v. 27, n. 20, p. 3346-3361, January, 2020.

ZHANG, Q. et. al. Apoptosis Induction of Fibroblast-Like Synoviocytes Is an Important Molecular-Mechanism for Herbal Medicine along with its Active Components in Treating Rheumatoid Arthritis. *Biom.* v. 9, n. 12, p. 795. November 2019.

ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

		HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO/ UNIVERSIDADE DO ESTADO													
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP															
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA															
Título da Pesquisa: Análise de fatores apoptóticos em biópsias de tecido gengival e saliva humanos após a terapia periodontal não cirúrgica															
Pesquisador: Juliana Cardoso Alves															
Área Temática:															
Versão: 1															
CAAE: 47835015.6.0000.5259															
Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ															
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio															
DADOS DO PARECER															
Número do Parecer: 1.207.325															
 Apresentação do Projeto:															
O projeto está apresentado corretamente, Projeto bem estruturado apresentando todas informações necessárias para avaliação ética.															
 Objetivo da Pesquisa:															
Avaliar os efeitos da terapia periodontal nas células dos tecidos adjacentes															
 Avaliação dos Riscos e Benefícios:															
Prezado pesquisador: Caracteriza-se como risco direto para os sujeitos da pesquisa a possibilidade de desconforto ou constrangimento no momento do preenchimento dos questionários. Os pesquisadores devem se comprometer a minimizar os riscos ou desconfortos que possam vir a ser causados. O risco principal é o desconforto causado pelas biópsias															
 Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:															
O trabalho é atual e relevante. Projeto bem estruturado apresentando todas informações necessárias para avaliação ética.															
<table border="0" style="width: 100%;"><tr><td style="width: 40%;">Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo</td><td style="width: 20%;"></td><td style="width: 40%;">CEP: 20.551-030</td></tr><tr><td>Bairro: Vila Isabel</td><td></td><td></td></tr><tr><td>UF: RJ</td><td>Município: RIO DE JANEIRO</td><td></td></tr><tr><td>Telefone: (21)2868-8253</td><td>Fax: (21)2264-0853</td><td>E-mail: cep-hupe@uerj.br</td></tr></table>				Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo		CEP: 20.551-030	Bairro: Vila Isabel			UF: RJ	Município: RIO DE JANEIRO		Telefone: (21)2868-8253	Fax: (21)2264-0853	E-mail: cep-hupe@uerj.br
Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo		CEP: 20.551-030													
Bairro: Vila Isabel															
UF: RJ	Município: RIO DE JANEIRO														
Telefone: (21)2868-8253	Fax: (21)2264-0853	E-mail: cep-hupe@uerj.br													



Continuação do Parecer: 1.207.325

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Toda a documentação pertinente foi apresentada. Termos de apresentação obrigatória estão de acordo com a legislação pertinente e devidamente assinados pelos responsáveis.

Recomendações:

Tornar o TCLE mais claro para o leigo, explicando o termo "apoptótico"

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O trabalho pode ser realizado da fora como está apresentado. Diante do exposto e à luz da Resolução CNS nº466/2012, o projeto pode ser enquadrado na categoria – APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente, o CEP recomenda ao Pesquisador: 1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas. 2. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes. 3. O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que encaminhe relatórios parciais e anuais referentes ao andamento da pesquisa ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto DOC versão 1.doc	29/06/2015 17:04:10		Aceito
Outros	Declaração de ciência JU.jpg	05/07/2015 20:34:47		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	05/07/2015 20:38:54		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto JU.jpg	05/07/2015 20:40:47		Aceito
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	05/07/2015		Aceito

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

Bairro: Vila Isabel

CEP: 20.551-030

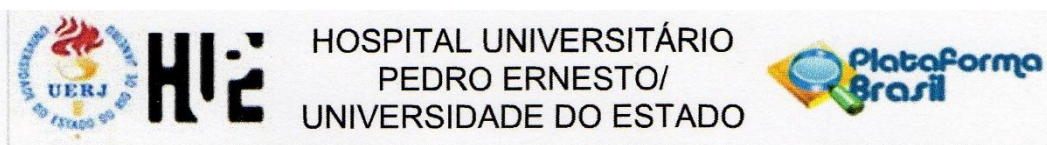
UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2868-8253

Fax: (21)2264-0853

E-mail: cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 1.207.325

Básicas do Projeto	ETO_546646.pdf	20:44:30	Aceito
--------------------	----------------	----------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 31 de Agosto de 2015

Assinado por:
DENIZAR VIANNA ARAÚJO
 (Coordenador)

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

Bairro: Vila Isabel

CEP: 20.551-030

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2868-8253

Fax: (21)2264-0853

E-mail: cep-hupe@uerj.br