

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ

Lilibeth Ferraz de Brito Penna Forte

**EFEITO DO ESTRESSE SOBRE OS NÍVEIS
SALIVARES DE β -DEFENSINA 2 E β -DEFENSINA 3**

Taubaté – SP

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ

Lilibeth Ferraz de Brito Penna Forte

**EFEITO DO ESTRESSE SOBRE OS NÍVEIS
SALIVARES DE β -DEFENSINA 2 E β -DEFENSINA 3**

Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Taubaté.

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Gilson César Nobre Franco

Co-orientadora: Profa. Dra. Sheila Cavalca Cortelli

Taubaté – SP

2009

LILIBETH FERRAZ DE BRITO PENNA FORTE

Data: _____

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ **Universidade de Taubaté**

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ **Universidade** _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ **Universidade** _____

Assinatura: _____

Dedico este trabalho ao meu marido Rogério,

Aos meus pais, Jeremias e Lenilza

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Rogério, que esteve em todos os momentos deste curso me apoiando;

Aos meus pais Jeremias e Lenilza, que de longe sempre estiveram torcendo pelo meu sucesso e me incentivando;

A minha irmã Lissandra e meu cunhado Erick, que torceram por mim em mais essa vitória;

À minha família, vovó Nete, tios e tias, primos e primas que sempre se alegraram com minhas conquistas. Em especial a tia Teresa que esteve presente nesta defesa.

Aos meus compadres e amigos Fabiana e Glauber; Gisele e Eduardo, Mariana e Carlinhos, Quele e Fábio, Aline e Cadu. Muito obrigada pelo apoio de todos vocês;

Ao meu orientador Prof. Dr. Gilson César Nobre Franco que sempre teve muita paciência e dedicação em todos os momentos da construção deste trabalho;

A Prof. Dra. Sheila Cavalca Cortelli, coordenadora da área de Periodontia, que desde o primeiro dia que cheguei a esta faculdade me recebeu de braços abertos;

À Universidade de Taubaté, em nome da Reitora Prof. Dra. Maria Lucila Junqueira Barbosa;

À Coordenadora do programa de Mestrado e Doutorado em Odontologia Profa. Dra. Chistina Claro Neves.

À Adriana Peloggia e a todo o pessoal da secretaria, bem como os funcionários da Faculdade, principalmente à bibliotecária Regina.

Agradeço imensamente ao Prof. Ms Davi Quirino pelo apoio na parte da periodontia e da estatística;

À Juliana Guimarães pelo apoio na parte laboratorial;

Ao Prof. Jarbas Francisco dos Santos pelo apoio inicial e constante desde o momento que cheguei a São José dos Campos;

À Mery Anne (ex-aluna UNITAU) que foi a primeira pessoa que me falou da Universidade de Taubaté;

Aos meus colegas da Periodontia, Alexandre, Carol e Rodrigo pelo incentivo e coleguismo, além de Adriana, Manuel, Zilla, Patrícia, Juliana, Mariana, Marília, Altino, Paulo, Esdras e Cláudio;

A todos os Professores que fizeram parte desta minha formação, Ana Christina Neves, Ana Lia Anbinder, Denise Raldi, Laís Concílio, Leonardo Cunha, Marcos Augusto do Rego, Maria Rozeli Quirino, Mariella Leão, Priscila Liporoni, Sandra

Habitante, Silvana Soléo, Vanessa Gobbo, Wilson Saad, Maximiliano Neisser, Edna Chamon e Celso Queiroz.

Em especial aos professores da Periodontia que me fizeram descobrir um novo mundo, Profa. Dra. Marinella Holzhausen, Prof. Dr. José Roberto Cortelli, Profa. Dra. Débora Pallos e Profa. Dra. Lucilene Hernandes Ricardo.

Forte, LFBP. Efeito do estresse sobre os níveis salivares de β -defensina 2 e β -defensina 3. [Dissertação de Mestrado]. Taubaté: Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia, 2009. 50p.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito do estresse sobre os níveis salivares de β -defensinas (HBD-2 e HBD-3) em indivíduos periodontalmente saudáveis. **Método:** Para esta finalidade, 75 estudantes da aeronáutica foram selecionados e submetidos a uma avaliação psicológica em relação à presença ou não de estresse. Esta avaliação foi realizada por uma psicóloga previamente calibrada e treinada, através de um questionário previamente validado (questionário de Lipp - ISS). Após análise do questionário, os indivíduos foram divididos em dois grupos (Grupo A - ausência de estresse e Grupo B - presença de estresse). Amostras de saliva não estimulada foram coletadas e os níveis de proteína total – PT (método do ácido bicinconímico), HBD-2 e HBD-3 (ensaio imunoenzimático - ELISA de captura) foram determinados. **Resultados:** Não foi observada diferença estatisticamente significativa quanto à dosagem de proteína total salivar entre os grupos avaliados ($p=0,4599$). As avaliações dos níveis de HBD-2 e HBD-3 também não sofreram alterações significativas quando da presença do estresse ($p=0,3664$ e $p=0,3608$, HBD-2 e HBD-3 respectivamente). **Conclusão:** Em indivíduos periodontalmente saudáveis, a presença de estresse não induziu a uma alteração dos níveis de HBD-2 e HBD-3.

Palavras-chave: Estresse; Proteínas salivares; Saliva; Beta-defensinas; Doenças periodontais.

Forte, LFBP. Effect of stress on saliva level of β -defensin-2 and β -defensin-3. [Dissertação de Mestrado]. Taubaté: Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia, 2009. 50p.

ABSTRACT

Objective: Evaluate the effect of stress on saliva level of β -defensins (HBD-2 and HBD-3) in periodontal health subjects. **Method:** For this purpose, 75 aeronautic students were selected to submit to a psychological evaluation under stressful and non-stressful situations. This evaluation was performed by a previously trained psychologist, with the use of a previously validated questionnaire (Questionnaire of Lipp - ISS). After the questionnaire analysis, the subjects were divided in two groups (group A – lack of stress and Group B – under stress). Non-stimulated saliva samples were collected and the total level of protein – PT (method of bicinonímic acid), HBD-2 and HBD-3 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA) were determined. **Results:** The level of total protein did not show a significant statistic difference between the groups ($p = 0,4599$). The analysis of HBD-2 and HBD-3 levels also did not show a significant alteration under stressful situations ($p = 0,3664$ and $p = 0,3608$, HBD-2 and HBD-3, respectively). **Conclusion:** In periodontal health subjects, the levels of HBD-2 and HBD-3 are not affect by the stress.

Keywords: Stress; Salivary proteins; Saliva; Beta-defensin; Periodontal diseases.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Quantificação de proteína total salivar nos diferentes grupos (Teste “t” de Student) 36
- Figura 2 - (A) Concentração total de HBD-2 na saliva entre indivíduos estressados e não estressados (teste “t” Student); (B) Valores obtidos para HBD-2 normalizados em função da proteína total (teste Mann-Whitney) 37
- Figura 3 - (A) Concentração total de HBD-3 na saliva entre indivíduos estressados e não estressados (teste Mann-Whitney); (B) Valores obtidos para HBD-3 normalizados em função da proteína total (teste Mann-Whitney) 38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	DEFENSINAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS	14
2.2	A IMPORTÂNCIA DAS B-DEFENSINAS HUMANAS (HBD) NA MANUTENÇÃO DA SAÚDE BUCAL	16
2.3	ESTRESSE: CARACTERÍSTICAS GERAIS	18
2.4	A RELAÇÃO DO ESTRESSE COM O DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL	20
2.5	ESTRESSE X B-DEFENSINAS	24
3	PROPOSIÇÃO	26
4	MÉTODO	27
4.1	POPULAÇÃO DO ESTUDO	27
4.2	AVALIAÇÃO PERIODONTAL	28
4.3	AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE ESTRESSE	29
4.4	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS SALIVARES	29
4.5	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL, HBD-2 E HBD-3	30
4.5.1	Preparo da amostra	30

4.5.2	Quantificação de proteína total (PT)	31
4.5.3	Quantificação de HBD-2 e HBD-3	31
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5	RESULTADOS	34
5.1	AVALIAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL (PT)	35
5.2	AVALIAÇÃO DA HBD-2 E HDB-3	36
6	DISCUSSÃO	39
7	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44
	ANEXOS	50

1 INTRODUÇÃO

Para que ocorra o início e progressão da doença periodontal (DP), os microrganismos periodontopatogênicos necessitam superar as defesas do organismo, representadas pela resposta imune inata e adaptativa. Dentre os componentes da resposta imune inata (primeira linha de defesa do organismo) incluem as “defensinas”, peptídeos presentes na cavidade bucal com atividade antimicrobiana). Estas defensinas podem ser divididas em dois grandes grupos: α -defensinas e β -defensinas (Goebel et al., 2000).

As β -defensinas exercem uma função primordial na resposta imune inata e também na ligação entre esta e a resposta imune adquirida (Krisanaprakornkit et al., 2003). Além disso, estas moléculas têm a capacidade de regular a produção de citocinas, proliferação fibroblástica e liberação de histamina dos mastócitos (Book et al., 2007).

Na área da periodontia, recentes estudos atribuem um papel fundamental para as β -defensinas humanas na manutenção da saúde do periodonto, tendo os seus níveis alterados com os estágios clínicos da DP (Dommisch et al., 2005; Vardar-Sengul et al., 2007).

Atualmente, a descoberta e o entendimento de fatores de risco relacionados com a progressão da doença periodontal possibilitaram um avanço no diagnóstico e na elaboração de protocolos terapêuticos mais eficazes. Neste contexto, diferentes autores vêm destacando uma possível associação entre o estresse e a DP (Wimmer et al., 2002; Vettore et al., 2003).

O estresse surge em decorrência a situações de conflito não triviais, que podem gerar danos físicos e mentais. Alterações no comportamento (hábitos de

higienização bucal) e fisiológicos são descritos como possíveis causas deste aumento na susceptibilidade para a DP (Roberts et al., 2005). O estresse psicossocial aumenta os níveis de adrenalina e noradrenalina, que por sua vez influenciam no crescimento de espécies bacterianas (Roberts et al., 2005). Além disso, também são observados em pacientes com estresse, depressão do sistema imune, decorrente dos altos níveis de glicocorticóides (Genco et al., 1998).

Porém, uma informação que ainda permanece não esclarecida na literatura é se os níveis orais de β -defensinas são afetados pelo estado de estresse. Neste contexto, este trabalho terá a finalidade de comparar e analisar os níveis salivares de dois subtipos de β -defensina (β -defensina 2 e β -defensina 3) entre indivíduos estressados e não estressados, buscando desta forma o entendimento da relação entre estresse e DP.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DEFENSINAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS

A imunidade inata representa a primeira linha de defesa do organismo contra a ação de microrganismos patogênicos. Na cavidade bucal, diferentes componentes salivares, tais como peroxidases, lactoferrinas, lisozimas, histatinas, e um peptídeo descoberto posteriormente aos outros citados, denominado defensinas, participam deste importante processo responsável pela manutenção da saúde bucal (Levy, 1996; Mizukawa et al., 1999).

As defensinas são peptídeos com propriedades antimicrobianas, que vêm se destacando atualmente por exercer uma importante atividade contra diferentes agentes infecciosos, tais como, bactérias, fungos e vírus (Diamond et al., 2000; Lehrer, 2004).

Especificamente, as defensinas são peptídeos catiônicos antimicrobianos de baixo peso molecular, produzidos por células epiteliais e polimorfonucleares - PMN (Goldammer et al., 2004). Seu mecanismo de ação baseia-se na formação de canais ou microporos na membrana dos microrganismos patogênicos, ocasionando assim, um aumento na permeabilidade da bicamada lipídica e conseqüentemente, induzindo a sua destruição (Dommisch et al., 2005; Book et al., 2007).

Atualmente este peptídeo vem sendo estudado em diversos campos da área médica como marcadores de doenças intestinais, renais, pulmonares (Goebel et al., 2000) e em pacientes com septicemia (Book et al., 2007).

As defensinas humanas são classificadas dentro de dois subgrupos: α -defensinas e β -defensinas. As α - e β -defensinas diferem na posição e ligação do resíduo conservado da cisteína. Recentemente, seis α -defensinas (HAD 1-6) e quatro β -defensinas (HBD 1-4) tem sido descritas na literatura (Dommisch et al., 2005).

As α -defensinas são produzidas por leucócitos polimorfonucleares (PMN) e participam do mecanismo de defesa não dependente de oxigênio, enquanto que as β -defensinas são expressas por células epiteliais de diferentes mucosas, incluindo a mucosa bucal (Vardar-Sengul et al., 2007).

As β -defensinas, além de exercerem uma função primordial na resposta imune inata, atuam na ligação entre esta e a resposta imune adquirida, por agirem como quimiotáticos para linfócitos T (Krisanaprakornkit et al., 2003). Em acréscimo, estas moléculas têm a capacidade de regular e aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão, além de induzirem a proliferação fibroblástica e liberação de histamina dos mastócitos (Book et al., 2007).

A HBD-1 foi isolada pela primeira vez no plasma de pacientes com doença renal em estágio terminal (Bensch et al., 1995). A HBD-2 foi isolada por Harder et al. (1997), enquanto que a HBD-3 foi por Harder et al. (2001), ambas em peles de pacientes com psoríase.

A expressão da HBD-1 em células epiteliais orais é constitutiva, enquanto a HBD-2 é regulada em resposta à estimulação por componentes bacterianos (LPS) e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IFN- γ) (Abiko et al., 2003; Kurland et al., 2006). HBD-1 e -2 demonstram um largo espectro de atividade, atuando contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além de agirem contra fungos e vírus (HIV e Herpes vírus) (Krisanaprakornkit et al., 2003; Chang et al., 2005; Dommisch

et al., 2005). A HBD-3, que também é induzida por componentes bacterianos e citocinas pró-inflamatórias, parece exercer uma atividade mais específica contra microrganismos Gram-positivos e vírus (Krisanaprakornkit et al., 2003).

2.2 A IMPORTÂNCIA DAS B-DEFENSINAS HUMANAS (HBD) NA MANUTENÇÃO DA SAÚDE BUCAL

Na cavidade bucal, a resposta imune inata desempenha um papel fundamental para a manutenção de um estado de equilíbrio na microbiota bacteriana e conseqüentemente na saúde periodontal. Dentre os fatores que compõem esta proteção, destacam-se o epitélio, atuando como uma barreira física a invasão de microrganismos e a saliva, contendo substâncias com atividades antimicrobianas. As β -defensinas destacam-se por atuarem contra um amplo espectro de microrganismos envolvidos no início e progressão da doença periodontal (DP) (Dommisch et al., 2005).

Neste contexto, recentes estudos na odontologia atribuem um papel fundamental para as β -defensinas humanas (HBD) na manutenção da saúde bucal. Isto se deve ao fato deste peptídeo exercer uma ação antibacteriana contra os principais agentes etiológicos relacionados ao processo de cárie e doença periodontal (Kurland et al., 2006). Assim sendo, a ausência destes peptídeos antimicrobianos na cavidade bucal pode conduzir a diversas doenças, como a periodontite ou até mesmo infecções oportunistas como a candidose (Kido et al., 1999; Dale et al., 2001; Dunsche et al., 2001).

Dunsche et al. (1994) sugerem que a HBD-2 pode servir no futuro como uma droga antimicótica potente, especialmente em casos de candidose. Harder et al. (2001) complementam que a HBD-2 é de grande interesse clínico por sua alta efetividade na morte da *Candida albicans*, bactérias Gram-negativas e *Staphylococcus aureus*.

Pesquisas na área da periodontia relatam a importância das β -defensinas humanas na manutenção de um periodonto saudável. Dommisch et al. (2005) e Vardar-Sengul et al. (2007) descrevem níveis alterados desse peptídeo de acordo com o estágio clínico da DP.

As doenças periodontais caracterizam-se como um processo inflamatório crônico que acomete os tecidos periodontais, levando à perda progressiva de inserção, com reabsorção óssea e migração apical do epitélio juncional, constituindo-se hoje como uma das principais causas de perda do elemento dentário (Albandar & Kingman, 1999).

Dommisch et al. (2005) investigaram a expressão de HBD-1, HBD-2 e HBD-3 em biópsias de tecido gengival em indivíduos saudáveis (n=10), com gengivite (n=10) ou periodontite (n=10). O diagnóstico clínico foi confirmado por análise histológica e a expressão do RNAm de HBD-1, HBD-2 e HBD-3 avaliada por RT-PCR. Níveis similares de expressão foram encontrados dentre as amostras de tecido saudável. Nas amostras com gengivite houve maior expressão de HBD-2 quando comparada com HBD-1 ou HBD-3, enquanto nas amostras com periodontite, a expressão da HBD-2 foi maior que a de HBD-1, entretanto igual ao da HBD-3. Assim sendo, os autores observaram que no primeiro estágio da inflamação (gengivite) há maior expressão da HBD-2 e que em estágios mais avançados

(periodontite) embora a HBD-2 se mantenha elevada ocorre também a expressão de HBD-3.

Lu et al. (2005) investigaram a expressão da HBD-3 em 49 biópsias de gengiva humana. Para tanto realizaram imunistoquímica e hibridização in situ, além de dois corantes para identificar HBD-3 em células de Langehans e de Merkel. Foi detectado HBD-3 em 90% das amostras nas camadas basal e espinhosa do epitélio gengival e não somente em queratinócitos, mas também em células de Langehans e de Merkel. Os autores concluíram que a HBD-3 contribui para manter a homeostasia periodontal através do efeito antimicrobiano e promoção de resposta imune adaptativa.

Vardar-Sengul et al. (2007) avaliaram, através de RT-PCR, a expressão da HBD-1 e HBD-2 em tecido gengival de 55 indivíduos divididos em quatro grupos (1-saudáveis; 2-gengivite; 3-periodontite agressiva e 4-periodontite crônica). A expressão de HBD-1 foi significativamente menor em pacientes com gengivite e periodontite agressiva e maior nos pacientes com periodontite crônica (todos em comparação com o grupo saudável). A expressão RNAm de HBD-2 variou de acordo com a condição periodontal. Os autores concluíram que os genes de HBD-1 e HBD-2 em epitélio gengival parecem mostrar diferentes expressões em pacientes saudáveis e com diferentes tipos de doença periodontal.

2.3 ESTRESSE: CARACTERÍSTICAS GERAIS

O estresse é o estado de tensão emocional, desencadeado por uma situação súbita ou por situações conflitantes contínuas, o qual inclui a resposta de componentes físicos e mentais que produz um quadro psicológico desagradável caracterizado por irritabilidade, distúrbio do sono e do apetite, dificuldade de concentração e preocupação exagerada com relação a situações triviais. Em geral há queda no rendimento, diminuição da memória, impotência sexual e mudanças comportamentais (Roberts et al., 2005).

O estresse é dividido fisiologicamente em três fases. A fase de alerta ocorre quando o indivíduo entra em contato com sua fonte de estresse, também conhecida como estressor e fisiologicamente ocorre liberação de corticóides (cortisol) e de catecolaminas pelas glândulas supra-renais. A fase de adaptação ou resistência se caracteriza, basicamente, pela hiperatividade da glândula supra-renal, aumento dos glóbulos brancos no sangue, glicogênese no fígado, havendo ainda inibição da insulina e estimulação do glucagon. Ocorre quando o organismo tenta se recuperar do desequilíbrio sofrido na primeira fase. Caso o agente estressor se mantenha, ocorre déficit das reservas de energia e a fase da exaustão ou esgotamento se manifesta, podendo ocasionar a morte (Lipp & Novaes, 1996).

As reações de estresse resultam exatamente desse esforço adaptativo. As doenças, como por exemplo, o estado conhecido por “esgotamento” representa o custo mental e biológico do esforço adaptativo. Inicialmente as alterações são meramente funcionais e posteriormente observam-se também lesões anatômicas. Deste modo, pode-se dizer que as doenças psicossomáticas são aquelas determinadas ou agravadas por motivos emocionais (Lipp & Novaes, 1996).

O estresse ocupacional ocorre quando as exigências do trabalho superam as capacidades, os recursos ou as necessidades do trabalhador. A profissão militar

pode estar incluída, muitas vezes, no contexto de estresse ocupacional por ter revelado, ao longo da história, aspectos marcantes de singularidade. Recursos humanos altamente qualificados, treinados, motivados, bem equipados e integralmente dedicados à atividade militar são o fundamento da capacitação de qualquer Força Armada, refletindo o desejo da própria sociedade. Daí decorrem as especificidades da vida militar como, risco de vida, rigor disciplinar e hierárquico, dedicação exclusiva, disponibilidade permanente, mobilidade geográfica, vigor físico e vínculo permanente (Vadenal, 2003).

2.4 A RELAÇÃO DO ESTRESSE COM O DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL

De acordo com Gjermo et al. (2002), quatro a 19% da população da América Central e América do Sul são afetados por doença periodontal severa. Neste sentido, o envolvimento de fatores de risco, como fumo e diabetes, podem modificar a resposta do hospedeiro, modificando a progressão e severidade da doença. Outros fatores como estresse, depressão e ansiedade não tem sido confirmados como fatores de risco absoluto, mas foram identificados em estudos observacionais como fatores potenciais que podem afetar a doença periodontal (Johnson et al., 1988).

O estresse psicossocial aumenta os níveis das catecolaminas, adrenalina e noradrenalina, as quais têm mostrado influência no crescimento de um grande número de espécies bacterianas. Assim, Roberts et al. (2005) determinaram os

efeitos de crescimento, relacionados ao ferro em 43 microrganismos normalmente encontrados no biofilme subgengival. Os resultados sugeriram que as catecolaminas podem exercer seus efeitos nos microrganismos subgengivais pela ativação do mecanismo de ligação com o ferro. Tais mecanismos podem desempenhar um importante papel na resposta dos microrganismos bucais ao estresse o que pode alterar o curso clínico da doença periodontal associada ao estresse.

Em acréscimo, níveis elevados de glicocorticóide também são relatados em pacientes em estado de estresse. Esses agentes estressores psicossociais podem desencadear a cascata de eventos fisiológicos para liberação do hormônio corticotrófico no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, tendo como uma consequência fisiológica a depressão do sistema imune, aumentando assim, a susceptibilidade a DP (Genco et al., 1998).

Tem sido sugerida uma relação entre eventos estressantes e periodontite embasados, sobretudo pelo fato de que o aumento na produção de corticóides possa ter efeitos deletérios sobre os tecidos periodontais. Entretanto, alguns autores relatam que os fatores psicossociais participem da etiologia da doença periodontal apenas quando associados a outros fatores, como pobre higiene bucal e tabagismo (Genco et al., 1998-1999; LeResche & Dworkin, 2002).

Genco et al. (1999) relataram que há evidências em relação ao estresse psicológico e DP através de um estudo epidemiológico cross-seccional com 1.426 adultos com idades entre 25 e 74 anos. Este estudo relatou que problemas financeiros e manifestações de estresse como depressão são indicadores de risco significantes para uma maior perda óssea e periodontal. Além disso, a idade, gênero, fumo, diabetes, *Porphyromonas gingivalis* e *Tanerella forsythensis* também são indicadores de risco significantes.

Deinzer et al. (1999) verificaram através de intervenção experimental, a relação entre estresse acadêmico e inflamação gengival através da mensuração de IL-1 β , que é um componente na destruição do tecido periodontal. Treze estudantes participaram do grupo controle e outros 13 negligenciaram tratamento em dois quadrantes por 21 dias para indução de gengivite experimental, porém mantiveram excelente higiene oral nos outros dois quadrantes. Foi observado significativo aumento dos níveis de IL-1 β tanto nos quadrantes com gengivite experimental quanto nos quadrantes com boa higiene oral, indicando que o estresse pode afetar a saúde periodontal através da supressão imune e que a relação pode ser mais pronunciada quando a higiene oral for mais deficiente.

LeResche & Dworkin (2002) afirmam que a literatura científica periodontal contém numerosos estudos sobre a relação entre estressores físicos e psicossociais e destruição periodontal. Estudos em animais e humanos têm sido relatados sob condições experimentais usando métodos observacionais. Em uma série de estudos laboratoriais usando camundongos Shapira et al. (1999-2000) concluíram que um estressor emocional (isolamento) e um estressor físico (frio), comparado com o controle, tiveram um efeito de aumentar a resposta inflamatória induzida por *Porphyromonas gingivalis*.

Vettore et al. (2003) fizeram um estudo caso-controle sobre estresse e ansiedade com as características clínicas periodontais. Os 79 participantes ($46,8 \pm 8$ anos de idade) foram divididos em três grupos de acordo com os valores de profundidade de sondagem (PS): grupo controle (PS < 3mm, n=22), grupo teste um (mínimo quatro sítios com PS > 4mm e < 6mm, n=27) e grupo teste dois (mínimo quatro sítios com PS > 6mm, n=30). O estresse, a condição social, a história médica e o grau de ansiedade foram medidos por questionários. Clinicamente, medidas de

índice de placa, índice gengival, profundidade de sondagem e perda de inserção foram coletadas. Profundidade de sondagem moderada associada à perda de inserção clínica esteve significativamente associada com ansiedade, mesmo quando a análise foi ajustada para nível socioeconômico e consumo de tabaco.

Vadenal (2003) fez um estudo sobre a condição dentária e periodontal de pilotos da Aviação do Exército Brasileiro, residentes na região do Vale do Paraíba. Além da avaliação clínica, determinou-se indiretamente a presença de bactérias periodontopatogênicas pelo teste BANA (Benzoil-DL-Arginina-Beta-Naftilamida) e o estresse oxidativo pela quantificação de radicais livres com auxílio do teste HLB (Heitan-LaGarde-Bradford). Sessenta pilotos foram selecionados e divididos em dois grupos, um Aéreo (n=48), cujos integrantes eram ligados diretamente à atividade aérea (média de 37 hs-vôo/2002) e um grupo Terrestre (n=12). As idades variaram de 25 a 45 anos, com média de 32,6 anos para o grupo Aéreo e de 41 anos para o grupo Terrestre. A prevalência da gengivite foi de 30%, sendo 31,2% para o grupo Aéreo e 25% para o Terrestre. Apenas o grupo Aéreo exibiu periodontite com prevalência de 15%. A atividade enzimática de bactérias periodontopatogênicas foi observada em 81,7% da amostra total, sendo 51,7% reações fracamente positivas e 30% reações positivas.

Peruzzo et al. (2008) relataram que embora estudos em animais e humanos tenham sugerido a influência do estresse na susceptibilidade e progressão da DP, há informações limitadas a respeito de como o estresse modularia a DP localmente através do sistema imuno-inflamatório. Desta forma estes autores realizaram um estudo com sessenta ratos *Wistar* para avaliar o efeito do estresse crônico na perda óssea resultante da doença periodontal induzida por ligadura e o impacto deste estresse sobre os níveis de RNAm de fatores que regulam o processo inflamatório

em tecido gengival. Foi observado que o estresse crônico pode afetar a quantidade de perda óssea em sítios com DP significativa. Dados deste estudo mostram que a inflamação, produzida pela ligadura associada ao estresse, elevou os níveis de catecolaminas, que por sua vez, aumentou significativamente os níveis de RNAm de IL-1 β , IL-10, IFN- γ e RANKL. Desta forma, os achados confirmam elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6/IL-10 e IFN- γ) e de fator pró-reabsortivo (RANKL), e decréscimo do nível de citocina antiinflamatória (IL-1ra) em sítios de destruição periodontal. Os autores concluíram que o estresse é um importante fator na etiologia e manutenção de muitas doenças inflamatórias, inclusive DP, indicando que o estresse pode modular a destruição óssea na DP.

2.5 ESTRESSE X B-DEFENSINAS

Durante o estado de estresse, níveis elevados de glicocorticóide e glicose são observados. Neste contexto, Aberg et al. (2007) demonstraram, em modelo animal, que a administração tópica ou sistêmica de glicocorticóide foi capaz de diminuir a expressão de β -defensina 3 em epiderme de camundongo, induzindo um aumento na susceptibilidade a infecções. Já Froy et al. (2007) mostraram que altos níveis de glicemia induziram uma diminuição significativa na expressão das defensinas.

Portanto, embora haja uma plausível associação indireta/direta entre o estresse e os níveis de β -defensinas, não existem na literatura científica atual trabalhos que avaliem o nível deste importante peptídeo antimicrobiano em

indivíduos sobre o estado de estresse. O conhecimento da relação (estresse x defensas) permitirá um melhor entendimento de como o estresse pode atuar como um fator de risco para o desenvolvimento da DP.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do estresse sobre níveis salivares de β -defensinas (HBD-2 e HBD-3) em indivíduos periodontalmente saudáveis.

4 MÉTODO

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade de Taubaté – Protocolo # 782/2006 (Anexo A).

4.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Para este estudo, foram selecionados 75 alunos (Curso de Formação de Sargentos da Escola de Especialistas de Aeronáutica-Guaratinguetá/SP), sendo estes divididos em dois grupos (Grupo A: Sem estresse e Grupo B: Com estresse). O número de indivíduos a serem incluídos foi previamente calculado através de um cálculo amostral. Para tanto, um estudo piloto (n=10) foi realizado, adotando significância estatística de 5% ($\alpha=0,05$) e Power de 0,8. Aplicou-se o teste t de Student para amostras independentes com o auxílio do Software BioEstat 5.0. De acordo com os valores sugeridos pelo teste o número de indivíduos a serem incluídos em cada grupo experimental (mínimo de 22/grupo) foi determinado.

Os seguintes critérios de inclusão foram utilizados para a formação da amostra do estudo:

- Ter entre 18 e 35 anos de idade;
- Não ser tabagista ou etilista;
- Não possuir doenças imunossupressoras;

- Não ter sido submetido ao uso local ou sistêmico de antibióticos nos últimos seis meses e de antiinflamatórios nos últimos três meses;
- Ser periodontalmente saudável, conforme critério de López et al. (2002) [não possuir mais que quatro sítios periodontais com profundidade de sondagem (PS) \geq 4mm e nível clínico de inserção (NCI) \geq 3mm].

4.2 AVALIAÇÃO PERIODONTAL

Para a avaliação periodontal foi utilizado espelho clínico número cinco (SSWHITE Duflex® - Brasil), pinça para algodão (SSWHITE Duflex® - Brasil), explorador de ponta romba (SSWHITE Duflex® - Brasil) e sonda periodontal milimetrada (PCPUNC156, Hu-Friedy - USA). Foram analisados os seguintes parâmetros periodontais: índice de placa bacteriana (IP) e índice gengival (IG): avaliação em quatro pontos por dente (mésio-vestibular, médio-vestibular, disto-vestibular e médio-lingual/palatina) utilizando-se os dentes presentes na cavidade bucal e classificados em escores 0, 1, 2 ou 3 (Silness & Løe, 1964); profundidade de sondagem (PS) e nível de inserção clínica (NIC): medida linear (mm) avaliada em seis pontos por dente (mésio-vestibular, médio-vestibular, disto-vestibular, médio-lingual/palatina, médio-lingual/palatina e disto-lingual/palatina)

Os parâmetros periodontais foram determinados por um único examinador previamente treinado e calibrado.

4.3 AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE ESTRESSE

A avaliação e a classificação do indivíduo de acordo com a presença de estresse foram realizadas por uma psicóloga mediante aplicação de um questionário previamente validado denominado Inventário de Sintomas de stress para adultos de Lipp (ISS) – (Lipp & Guevara, 1994).

O ISS é composto por três partes. A primeira parte é relacionada ao estágio de alerta do estresse que os voluntários tenham passado nas últimas 24 horas de sua vida. É formado por doze questões relacionadas com sintomas físicos do estresse e três questões com sintomas psicológicos do estresse. O estágio de resistência do estresse, segunda parte do questionário, é composto por dez questões sobre sintomas físicos e cinco questões sobre sintomas psicológicos, vividos pelos voluntários na última semana. A terceira e última parte do questionário, consiste de doze questões sobre sintomas físicos e onze questões sobre sintomas psicológicos vividos pelos voluntários no último mês e é conhecido como estágio de exaustão do estresse (Carvalho et al., 2008).

Após a interpretação do inventário pela psicóloga, e seguindo as instruções do mesmo, os voluntários foram classificados em dois grupos: (A) Sem estresse ou (B) Com estresse.

4.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS SALIVARES

A coleta de amostra não estimulada ocorreu no período entre 9h e 11h da manhã para evitar efeitos do ciclo circadiano. A ingestão de alimentos líquidos ou sólidos foi suprimida nas duas horas que antecederam o estudo.

Para este procedimento, os indivíduos permaneceram sentados com a cabeça ligeiramente inclinada (aproximadamente 45°). Inicialmente, o pesquisador instruiu cada participante a coletar a saliva não estimulada produzida no período de um minuto em um copo descartável. Essa primeira amostra foi desprezada e em seguida uma segunda amostra foi coletada em um tubo de plástico tipo Falcon por um período de cinco minutos (Navazesh et al., 2008). O material coletado foi devidamente identificado e mantido em congelador (-80°C) até o processamento.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL, HBD-2 E HBD-3

4.5.1 Preparo da amostra

Previamente à análise, as amostras de saliva foram descongeladas e centrifugadas (12.000rpm x cinco minutos - 4°C). Após este procedimento o sobrenadante (500µl) foi coletado e transferido para um minitubo tipo Eppendorf. A este sobrenadante, foi adicionado 500µl de uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 0,05% de Tween 20 (PBST), PMSF (1mM) e Coquetel inibidor de protease (1:1000).

4.5.2 Quantificação de proteína total (PT)

A quantificação de PT nas amostras salivares foi realizada pelo método do ácido bicinconímico (BCA) empregando-se o Kit comercial “BCA Protein Assay Kit” (Pierce, Rockford, Illinois, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Esta detecção colorimétrica baseia-se na redução do Cu^{+2} em Cu^{+1} pelas proteínas em um meio alcalino. A reação colorimétrica desenvolve-se com a quelação de duas moléculas do BCA com uma do íon Cu^{+1} . Todo o experimento foi realizado em duplicada e a absorbância foi mensurada em um comprimento de onda de 562nm.

4.5.3 Quantificação de HBD-2 e HBD-3

As quantificações de HBD-2 e HBD-3 na saliva foram realizadas através de ensaio imunoenzimático de captura (ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay) de captura, empregando os Kits comerciais: Human BD-2 ELISA Development Kit e Human BD-3 ELISA Development Kit (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) seguindo as instruções do fabricante. Esta metodologia baseou-se na especificidade da reação antígeno-anticorpo.

Inicialmente, 100 μ l (0,25 μ g/ml) de anticorpo específico (anti HBD-2 ou anti HBD-3) foram adicionados a cada poço de uma placa de poliestireno (96 poços). Após este procedimento, a placa foi incubada por um período de 14 horas (overnight) a 4°C.

Em seguida, a placa foi lavada (0,05% Tween-20 em PBS) e 300µl de solução de bloqueio (1% BSA em PBS) foram adicionados em cada poço. O tempo de incubação para esta etapa foi de uma hora. Após nova lavagem, 100µl da amostra foram adicionados nos respectivos poços. Posteriormente ao período de incubação (duas horas) e lavagem da placa, 100µl do anticorpo de detecção (0,5µg/ml) foram adicionados em cada poço, e esta placa foi incubada por duas horas. Ao final do procedimento de lavagem, 100µl de Avidin-horseradish peroxidase - Avidin-HRP (diluído 1:2000 em PBS) foram adicionados. Finalmente, após trinta minutos de incubação, a placa foi lavada e 100µl de uma solução contendo o substrato enzimático orto-fenilenodiamina (OPD) foram adicionados a cada poço.

O desenvolvimento de cor em cada poço foi monitorado com o emprego de um leitor de ELISA (comprimento de onda: 490nm). A quantificação de HBD-2 e HBD-3 foi realizada plotando os resultados relativos à absorbância de cada amostra com uma curva de calibração construída a partir de concentrações conhecidas dos respectivos antígenos (8-1000pg/ml). Todo o experimento foi executado em duplicata.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico específico com o auxílio do software Bio Estat 5.0. O nível de significância empregado foi de 5% ($\alpha=0,05$). Em cada agrupamento de interesse preparado para análise, a característica de distribuição amostral foi testada através do teste de aderência

Kolmogorov-Smirnov (Lilliefors). Em função dos resultados estabelecidos, o teste “t” de Student foi aplicado para os grupos que apresentaram distribuição normal, enquanto o teste Mann-Whitney foi empregado para os grupos que não apresentaram distribuição normal.

5 RESULTADOS

Foram incluídos no presente estudo 75 indivíduos ($22,6 \pm 3,8$ anos) de ambos os gêneros (39 mulheres / 36 homens). Após a aplicação e interpretação do Inventário de Sintomas de stress para adultos de Lipp (ISS), os participantes foram classificados em dois grupos (Grupo A: Sem estresse e Grupo B: Com estresse), conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição e classificação dos indivíduos de acordo com a presença ou ausência de estresse

	Sem estresse	Com estresse
Homens	22	14
Mulheres	4	35
Total	26	49
MI±DP	$23,8 \pm 4,7$ anos	$22,0 \pm 2,3$ anos

Média de idade; DP – Desvio padrão

Ainda, considerando as diferentes fases descritas para o estresse, os indivíduos do grupo B (Com estresse, $n=49$) foram classificados e distribuídos da seguinte forma: (1) Fase de alerta: quatro indivíduos; (2) Fase de resistência: 25 indivíduos; (3) Fase de quase exaustão: cinco indivíduos e (4) Fase de exaustão: 15 indivíduos.

Clinicamente, todos os participantes foram submetidos a um exame periodontal para determinação dos seguintes parâmetros [profundidade de sondagem (PS), nível clínico de inserção (NCI), índice de placa (IP) e índice gengival (IG)]. O critério de López et al. (2002) [não possuir mais que quatro sítios periodontais com profundidade de sondagem (PS) ≥ 4 mm e nível clínico de inserção

(NCI) \geq 3mm] foi empregado para a definição de doença. Os resultados obtidos para os diferentes grupos estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores médios de profundidade de sondagem (PS), nível clínico de inserção (NCI), índice de placa (IP) e índice gengival (IG) de acordo a condição de estresse dos indivíduos

	Sem estresse (Média \pm DP)	Com estresse (Média \pm DP)
PS	1,68 \pm 0,23	1,68 \pm 0,47
NCI	1,32 \pm 0,45	1,15 \pm 0,36
IP	0,70 \pm 0,50	0,88 \pm 0,47
IG	0,82 \pm 0,55	0,94 \pm 0,59

5.1 AVALIAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL (PT)

Inicialmente, foi realizada a dosagem de proteína total salivar pelo método do ácido bicinconímico. Os resultados obtidos com esta análise não mostraram diferenças estatísticas significativas ($p=0,4599$) entre os grupos avaliados (A: Sem estresse e B: Com estresse) (Figura 1).

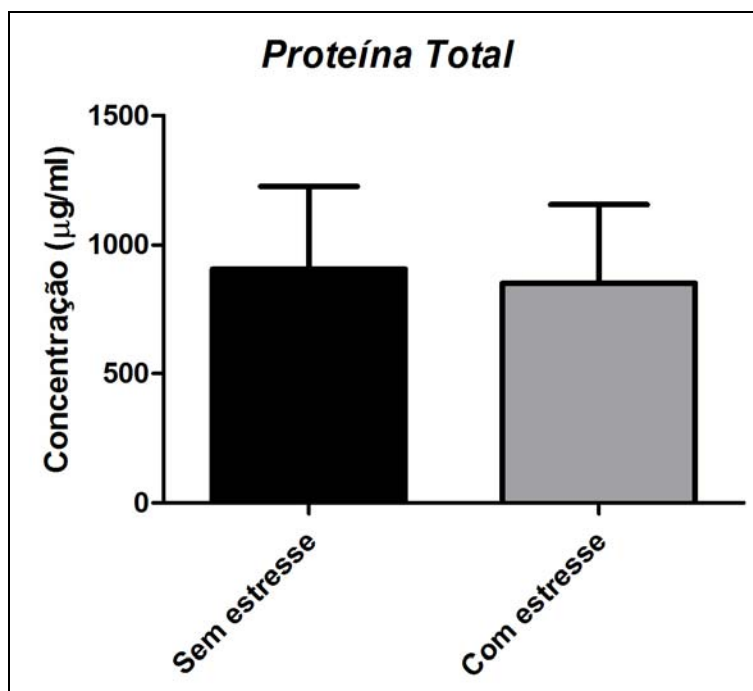


Figura 1 – Quantificação de proteína total salivar nos diferentes grupos. Teste “t” de Student

5.2 AVALIAÇÃO DA HBD-2 E HBD-3

Posteriormente a mensuração protéica, foi realizada a quantificação de HBD-2 e HBD-3 pelo método de ELISA de captura. Os valores obtidos foram expressos e analisados de duas formas: (1) concentração total (pg/ml) de HBD-2 e HBD-3 na saliva coletada e (2) normalização dos resultados em relação à proteína total presente na saliva (PT/HBD-2 ou PT/HBD-3), buscando assim, uma relação entre PT e os peptídeos estudados.

Os resultados obtidos com a quantificação total ou com os valores normalizados, não mostraram diferenças significativas entre os grupos avaliados

(HBD-2: Concentração total, $p=0,3664$ – Normalizado, $p=0,8343$ / HBD-3: Concentração total, $p=0,3608$ – Normalizado, $p=0,2005$).

Porém, embora a realização da normalização dos resultados em função da PT não tenha promovido uma mudança de forma estatisticamente significativa, houve, interessantemente, uma inversão do comportamento de ambos os peptídeos. Os resultados obtidos estão ilustrados nas Figuras 2 e 3 para os HBD-2 e HBD-3.

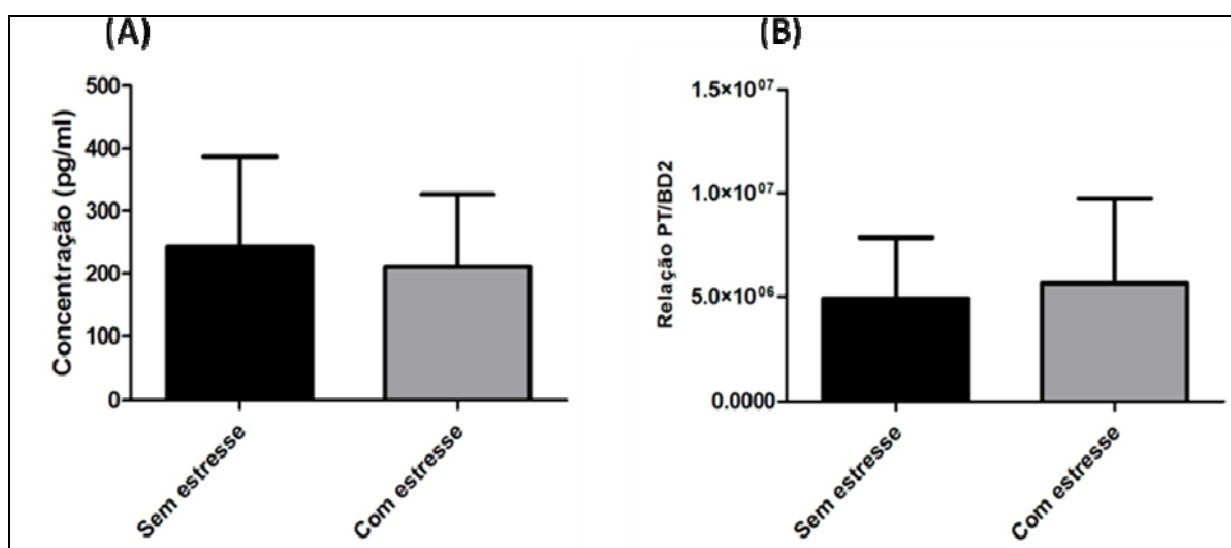


Figura 2 - (A) Concentração total de HBD-2 na saliva entre indivíduos estressados e não estressados (teste "t" Student), (B) Valores obtidos para HBD-2 normalizados em função da proteína total (teste Mann-Whitney)

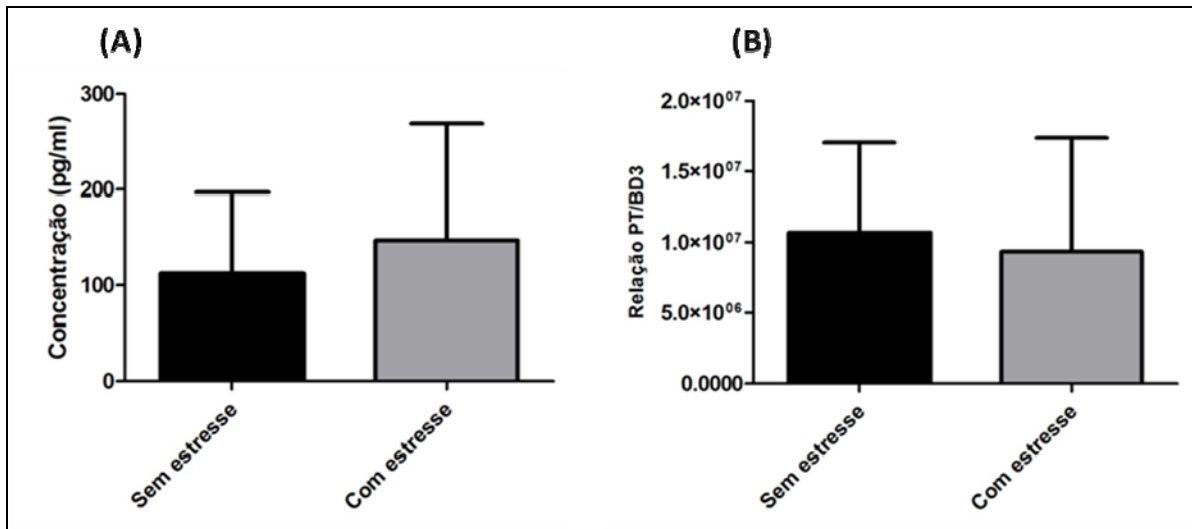


Figura 3 - (A) Concentração total de HBD-3 na saliva entre indivíduos estressados e não estressados (teste Mann-Whitney), (B) Valores obtidos para HBD-3 normalizados em função da proteína total (teste Mann-Whitney)

6 DISCUSSÃO

A doença periodontal (DP) pode ser definida como uma infecção crônica de caráter inflamatório que leva à destruição dos tecidos de suporte dos dentes, com perda progressiva de inserção, reabsorção óssea e migração apical do epitélio juncional (Van Dyke & Serhan, 2003). Atualmente, a doença representa a principal causa de perda do elemento dental, afetando cerca de 10 a 15% da população mundial (Kinane & Bartold, 2007), além de agir como um fator modificador para a saúde sistêmica (Seymour et al., 2007).

Para que ocorra o início e progressão da DP, os microrganismos periodontopatogênicos necessitam superar as defesas do organismo, representadas pela resposta imune inata e adaptativa. Neste contexto, diferentes fatores de risco podem alterar esta resposta, facilitando assim, o estabelecimento e desenvolvimento da DP.

Fator de risco é uma parte de uma reação em cadeia que implica em um aumento direto na probabilidade da doença ocorrer e sua compreensão é fundamental para o estabelecimento de medidas preventivas e/ou terapêuticas nas diferentes patologias (Papapanou et al., 1988). O termo “fator de risco” pode ser definido como características pessoais ou comportamentais que, quando presente, resulta diretamente no aumento da probabilidade da pessoa adquirir uma doença (Beck et al., 1997).

Atualmente, diferentes fatores de riscos são descritos para a DP, destacando-se: idade, fumo, fatores sócio-econômicos, obesidade, doenças sistêmicas como diabetes e HIV e o estresse.

O estresse, segundo Boyapati & Wang (2007), é um processo de componentes fisiológicos e psicológicos causado por um estímulo adverso, físico, mental ou emocional, interno ou externo, que tende a perturbar o funcionamento de um organismo e que o organismo naturalmente tem vontade de evitar.

No presente trabalho, a população alvo foi formada por alunos da Escola de Especialistas da Aeronáutica de Guaratinguetá/SP devido a um aumento da incidência desta patologia ter sido relatada entre militares. Nossos achados confirmam estes dados, uma vez o estado de estresse esteve presente em 65,3% dos participantes.

Ainda sobre a seleção dos indivíduos participantes deste estudo, optamos pela inclusão de uma população periodontalmente saudável, empregando para isto, o critério de López et al. (2002). Com esta escolha, tivemos o objetivo de buscar um melhor entendimento de como um fator de risco (estresse), poderia modificar as condições fisiológicas locais e/ou sistêmicas em um estágio ainda de saúde, tornando assim, um indivíduo susceptível ao início da DP.

Os níveis salivares dos peptídeos orais β -defensina-2 (HBD-2) e β -defensina-3 (HBD-3) foram comparados entre indivíduos com e sem estresse. A escolha destes peptídeos baseou-se principalmente em dois fatores: (1) importância dos mesmos na manutenção da saúde periodontal e (2) possível relação entre glicocorticóides (hormônio produzido em altas quantidades durante o estado de estresse) e o padrão de expressão de HBD-2 e HBD-3 em modelo animal.

Inicialmente, realizamos a mensuração de proteína total (PT) salivar entre os dois grupos (com e sem estresse). Esta avaliação é usada como um marcador do grau de inflamação, tendo os seus níveis alterados quando há presença de

patologias inflamatórias, como por exemplo, a DP. Os resultados não mostraram diferenças significativas entre os grupos ($p=0,4599$).

As avaliações dos níveis de HBD-2 e HBD-3 foram realizadas de duas formas: (1) concentração total (pg/ml) e (2) normalizados em função da PT. Em ambas as análises não se observaram alterações significativas entre os níveis de HBD-2 e HBD-3 entre os grupos estudados. Porém, embora a realização da normalização dos resultados em função da PT não tenha promovido uma mudança de forma estatisticamente significativa, houve, interessante, uma inversão do comportamento de ambos os peptídeos.

A normalização dos dados foi realizada em decorrência a uma tendência de trabalhos atuais envolvendo mensuração de proteínas salivares e/ou presentes no fluido gengival, em normalizar os valores obtidos em função da proteína total (Vastardis et al., 2003), buscando assim, minimizar uma única interpretação dos resultados, a de concentração, a qual está diretamente relacionada e podendo assim, sofrer uma influência do fluxo local (salivar/fluido gengival).

Sobre este aspecto, Vernal et al. (2005) realizaram um trabalho com o objetivo de avaliar os níveis de IL-17 no fluido gengival de pacientes saudáveis e portadores de doença periodontal. Interessante, os autores encontraram uma maior concentração desta citocina pró-inflamatória no grupo de indivíduos saudáveis. Porém, após o processo de normalização dos níveis de IL-17 em função da proteína total presente nas amostras, as diferenças não mais foram significativas entre os grupos. Os autores justificam que nos pacientes com doença periodontal com bolsas maiores do que cinco milímetros, o fluxo de fluido gengival é claramente maior, promovendo assim, uma menor detecção desta citocina neste grupo de pacientes.

Embora as expressões orais de HBD-2 e HBD-3 sejam consideradas induzidas principalmente por periodontopatógenos, os quais estão presentes em um quadro de DP estabelecido (Ouhara et al., 2006), a produção de HBD-2 e HBD-3 também pode ser modificada, em um menor grau, por bactérias comensais presentes na cavidade oral (Krisanaprakornkit et al., 2000). Assim, como descrito previamente, este trabalho buscou avaliar os efeitos do estresse sobre os níveis salivares de HBD-2 e HBD-3 em um estágio de saúde, ou seja, no qual as produções de HBD-2 e HBD-3 estariam sendo regulada dentro de um estado de homeostasia. E assim, um fator de risco poderia atuar, quebrando este equilíbrio biológico.

No presente trabalho, embora o estresse não tenha afetado de forma significativa a produção de HBD-2 e HBD-3 em um estado de saúde, não descartamos ainda, a possibilidade de uma possível relação entre estresse e defensas orais. Uma vez que a maior exigência de sua produção ocorra após o estabelecimento da DP, o estresse, através de um efeito deletério sobre a resposta imunológica em decorrência do aumento da produção de glicocorticóides, poderia afetar a expressão deste peptídeo, contribuindo assim, não para o início da doença (objetivo deste trabalho), mas sim, em uma maior progressão e gravidade da DP em pacientes portadores de estresse.

7 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos do presente trabalho, permite concluir que o estresse não interfere nos níveis salivares de β -defensina 2 e β -defensina 3 em indivíduos periodontalmente saudáveis.

REFERÊNCIAS¹

1. Goebel C, Mackay LG, Vickers ER, Mather LE. Determination of defensin HNP-1, HNP-2, and HNP-3 in human saliva by using LC/MS. *Peptides* 2000; 21(6):757-65.
2. Krisanaprakornkit S, Jotikasthira D, Dale BA. Intracellular calcium in signaling Human β -defensin-2 expression in oral epithelial cells. *J Dent Res* 2003; 82(11):877-882.
3. Book M, Chen Q, Lehmann L, Klaschik S, Weber S, Schewe J et al. Inducibility of the endogenous antibiotic peptide B-defensin 2 is impaired in patients with severe sepsis. *Critical care* 2007; 11(1):R19.
4. Dommisch H, Acil Y, Dunsche A, Winter J, Jepsen S. Differential gene expression of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20(3):186-90.
5. Vardar-Sengul S, Demirci T, Sen BH, Erkizan V, Kurulgan E, Baylas H. Human beta defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. *J Periodontal Res* 2007; 42(5):429-37.
6. Wimmer G, Janda M, Wieselmann-Penkner K, Jakse N, Polansky R, Pertl C. Coping with stress: its influence on periodontal disease. *J Periodontol* 2002; 73:1343-51.
7. Vettore MV, Leão AT, Monteiro da Silva AM, Quintanilha RS, Lamarca GA. The relationship of stress and anxiety with chronic periodontitis. *J Clin Periodonto* 2003; 30:394-402.
8. Roberts A, Matthews JB, Socransky SS, Freestone PP, Williams PH, Chapple IL. Stress and the periodontal diseases: growth responses of periodontal bacteria to *Escherichia coli* stress-associated autoinducer and exogenous Fe. *Oral Microbiol Immunol* 2005 Jun; 20(3):147-53.

¹ Referências elaboradas segundo o modelo Vancouver

9. Genco RJ, Ho AW, Kopman J, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LA. Models evaluate the role of stress in periodontal disease. *Ann Periodontol* 1998; 3:288-302.
10. Levy O. Antibiotic proteins of polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Haematol* 1996; 56:263-77.
11. Mizukawa N, Sugiyama K, Ueno T, Mishima K, Takagi S, Sugahara T. Level of human defensin-1, an antimicrobial peptide in saliva of patients with oral inflammation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 87:539-43.
12. Diamond G, Kaiser V, Rhodes J, Russel JP, Bevins CL. Transcriptional regulation of β -defensin gene expression in tracheal epithelial cells. *Infection and immunity* 2000; 68:113-19.
13. Lehrer RI. Primate defensins. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2:727-38.
14. Goldammer T, Zerbe H, Molenaar A, Schuberth HJ, Brunner RM, Kata SR et al. Mastitis increases mammary mRNA abundance of β -defensin 5 toll-like-receptor 2 (TLR-2), and TLR4 but not TLR-9 in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11:174-185.
15. Bensch KW, Raida M, Mägert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. HBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 1995 Jul 17; 368(2):331-5.
16. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997 Jun 26; 387(6636):861.
17. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001 Feb 23; 276(8):5707-13.
18. Abiko Y, Nishimura M, Kaku T. Defensins in saliva and the salivary glands. *Med Electron Microsc* 2003; 36(4):247-52.
19. Kurland AR, Schreiner H, Diamond G. In vivo beta-defensin gene expression in rat gingival epithelium in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. *J Periodontal Res* 2006; 41(6):567-72.

20. Chang TL, Vargas J Jr, DelPortillo A, Klotman ME. Dual role of α -defensin-1 e anti-HIV-1 innate immunity. *J Clin Invest* 2005; 115(3):765-73.
21. Kido J, Nakamura T, Kido R, Ohishi K, Yamauchi N, Kataoka M et al. Calprotectin in gingival crevicular fluid correlates with clinical and biochemical markers of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1999; 26(10):653-7.
22. Dale BA, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Roberts F, Robinovitch M, O'Neal R et al. Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. *J Periodontal Res* 2001; 36(5):285-94.
23. Dunsche A, Acil Y, Siebert R, Harder J, Schroder JM, Jepsen S. Expression profile of human defensins and antimicrobial proteins in oral tissues. *J Oral Pathol Med* 2001; 30(3):154-8.
24. Dunsche A, Kerscher A, Terheyden H, Sahly H. Indication for and effectiveness of fluconazole in oral candidiasis. *Mycoses* 1994; 37 Suppl 1:105-9.
25. Albandar JM, Kingman A. Gingival recession, gingival bleeding, and dental calculus in adults 30 years of age and older in the United States, 1988–1994. *J Periodontol* 1999; 70:30–43.
26. Lu Q, Samaranayake LP, Darveau RP, Jin L. Expression of human beta-defensin-3 in gingival epithelia. *J Periodontal Res* 2005 Dec; 40(6):474-81.
27. Lipp MN, Novaes LE. *O stress. Mitos e Verdades*. São Paulo: Contexto; 1996.
28. Vadenal R. *Condição dentária e periodontal em pilotos da aviação do exército brasileiro incluindo testes BANA e HLB [Dissertação de Mestrado]*. Taubaté: Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia, 2003. 68p.
29. Gjermo P, Rösing CK, Susin C, Oppermann R. Periodontal diseases in Central and South America. *Periodontol* 2000 2002; 29:70-78.
30. Johnson NW, Griffiths GS, Wilton JM, Maiden MF, Curtis MA, Gillett IR et al. Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases. Evidence for the existence of high-risk groups and individuals and approaches to their detection. *J Clin Periodontol* 1988 May; 15(5):276-282.

31. Genco RJ, Ho AW, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LA. Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J Periodontol* 1999 Jul; 70(7):711-23.
32. LeResche L, Dworkin SF. The role of stress in inflammatory disease, including periodontal disease: review of concepts and current findings. *Periodontol* 2002; 30: 91-103.
33. Deinzer R, Förster P, Fuck L, Herforth A, Stiller-Winkler R, Idel H. Increase of crevicular interleukin 1beta under academic stress at experimental gingivitis sites and at sites of perfect oral hygiene. *J Clin Periodontol* 1999 Jan; 26(1):1-8.
34. Shapira L, Hourri-Haddad Y, Frolov I, Halabi A, Ben-Nathan D. The effect of stress on the inflammatory response to *Porphyromonas gingivalis* in a mouse subcutaneous chamber model. *J Periodontol* 1999 Mar; 70(3):289-93.
35. Shapira L, Frolov I, Halabi A, Ben-Nathan D. Experimental stress suppresses recruitment of macrophages but enhanced their *P. gingivalis* LPS-stimulated secretion of nitric oxide. *J Periodontol* 2000 Mar; 71(3):476-81.
36. Peruzzo DC, Benatti BB, Antunes IB, Andersen ML, Sallum EA, Casati MZ et al. Chronic stress may modulate periodontal disease: a study in rats. *J Periodontol* 2008 Apr; 79(4):697-704.
37. Aberg KM, Radek KA, Choi EH, Kim DK, Demerjian M, Hupe M et al. Psychological stress downregulates epidermal antimicrobial peptide expression and increases severity of cutaneous infections in mice. *J Clin Invest* 2007; 117:3339-49.
38. Froy O, Hananel A, Chapnik N, Madar Z. Differential effect of insulin treatment on decreased levels of beta-defensins and Toll-like receptors in diabetic rats. *Mol Immunol* 2007 Feb; 44(5):796-802.
39. López NJ, Smith PC, Gutierrez J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. *J Periodontol* 2002 Aug; 73(8):911-24.
40. Silness J, Løe H. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 1964; 22(1):121-35.

41. Lipp MEN, Guevara AJH. Validação empírica do Inventário de Sintomas de Stress (ISS). *Estudos de Psicologia* 1994; 11(3):43-49.
42. Carvalho AL, Cury AA, Garcia RC. Prevalence of bruxism and emotional stress and the association between them in Brazilian police officers. *Braz Oral Res* 2008 Jan-Mar; 22(1):31-5.
43. Navazesh M, Kumar SK. Measuring salivary flow: challenges and opportunities. *J Am Dent Assoc* 2008 May; 139 Suppl:35S-40S.
44. Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Den Res* 2003; 82(2):82-90.
45. Kinane DF, Mark Bartold P. Clinical relevance of the host responses of periodontitis. *Periodontol 2000* 2007; 43:278-93.
46. Seymour GJ, Ford PJ, Cullinan MP, Leishman S, Yamazaki K. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13 Suppl 4:3-10.
47. Papapanou PN, Wennström JL, Gröndahl K. Periodontal status in relation to age and tooth type. A cross-sectional radiographic study. *J Clin Periodontol* 1988 Aug; 15(7):469-78.
48. Beck JD, Cusmano L, Green-Helms W, Koch GG, Offenbacher S. A 5-year study of attachment loss in community-dwelling older adults: incidence density. *J Periodontal Res* 1997 Aug; 32(6):506-15.
49. Boyapati L, Wang HL. The role of stress in periodontal disease and wound healing. *Periodontol 2000* 2007; 44:195-210.
50. Vastardis S, Leigh JE, Wozniak K, Yukna R, Fidel PL Jr. Influence of periodontal disease on Th1/Th2-type cytokines in saliva of HIV-positive individuals. *Oral Microbiol Immunol* 2003 Apr; 18(2):88-91.
51. Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Antonieta Valenzuela M, Gamonal J. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005 Apr; 32(4):383-9.

52. Ouhara K, Komatsuzawa H, Shiba H, Uchida Y, Kawai T, Sayama K et al. Actinobacillus actinomycetemcomitans outer membrane protein 100 triggers innate immunity and production of beta-defensin and the 18-kilodalton cationic antimicrobial protein through the fibronectin-integrin pathway in human gingival epithelial cells. Infect Immun 2006 Sep; 74(9):5211-20.
53. Krisanaprakornkit K, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA. Inducible expression of human b-defensin-2 (hBD-2) by Fusobacterium nucleatum in oral epithelial cells. Multiple signaling pathways and the role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. Infect Immun 2000; 68:2907–2915.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa



PRPPG-Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação
Comitê de ética em Pesquisa
Rua Visconde do Rio Branco, 210 Centro Taubaté-SP 12020-040
Tel.: (12) 3625.4143 – 3635.1233 Fax: (12) 3632.2947
cepunitau@unitau.br

DECLARAÇÃO Nº 782/2006

Protocolo CEP/UNITAU nº 412/06 (Esse número de registro deverá ser citado pelo pesquisador nas correspondências referentes a este projeto)

Projeto de Pesquisa: *Associação entre estresse e parâmetros microbiológicos, salivares e condição clínica periodontal: estudo transversal com estudantes da escola de especialistas na Aeronáutica*

Pesquisador(a) Responsável: Sheila Cavalca Cortelli

Pesquisadores/Alunos:

O Comitê de Ética em Pesquisa, em reunião de **08/12/2006**, e no uso das competências definidas na Resolução CNS/MS 196/96, considerou o Projeto acima **aprovado**, após atendimento às pendências.

Taubaté, 14 de dezembro de 2006

Prof. Robison Baroni

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Taubaté

CÓPIA

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial desta obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Lilibeth Ferraz de Brito Penna Forte

Taubaté, Março 2009

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)