

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

HEITOR ALBERGONI DA SILVEIRA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS
PLUNC EM GLÂNDULAS MUCOSAS DE PACIENTES
COM RINOSSINUSITE**

BAURU
2016

HEITOR ALBERGONI DA SILVEIRA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS
PLUNC EM GLÂNDULAS MUCOSAS DE PACIENTES
COM RINOSSINUSITE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências da
Saúde da Universidade do Sagrado
Coração como parte dos requisitos para
obtenção do título de bacharel em
Odontologia, sob orientação da Profa.
Dra. Andréia Aparecida da Silva.

BAURU
2016

Silveira, Heitor Albergoni da

S5871a

Avaliação da expressão das proteínas PLUNC em glândulas mucosas de pacientes como rinosinusite / Heitor Albergoni da Silveira -- 2016.

33f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Aparecida da Silva.

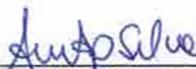
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia)
- Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP

1. Proteínas PLUNC. 2. Imuno-histoquímica. 3. Rinosinusite.
I. Silva, Andréia Aparecida da. II. Título.

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ata de Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de Heitor Albergoni da Silveira.

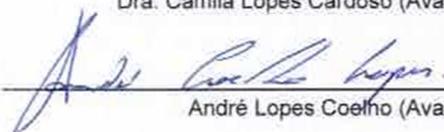
Ao dia cinco de dezembro de dois mil e dezesseis, reuniu-se a banca examinadora do trabalho apresentado como Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de Heitor Albergoni da Silveira intitulado: "**Avaliação da expressão das proteínas Plunc em glândulas mucosas de pacientes com rinosinusite**". Compuseram a banca examinadora os professores Dra. Andréia Aparecida da Silva, Dra. Camila Lopes Cardoso e André Lopes Coelho. Após a exposição oral, o candidato foi arguido pelos componentes da banca que se reuniram, e decidiram, Aprovado, com a nota 10,0 a monografia. Para constar, fica redigida a presente Ata, que aprovada por todos os presentes, segue assinada pelo Orientador e pelos demais membros da banca.



Dra. Andréia Aparecida da Silva (Orientadora)



Dra. Camila Lopes Cardoso (Avaliador 1)



André Lopes Coelho (Avaliador 2)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer Á Deus, por ter me dado saúde, força e a benção de ter realizado o maior sonho da minha vida que é me formar, sem sua base me sustentando eu não conseguiria enfrentar as dificuldades nesses 4 anos de graduação;

Aos meus Avós Sr. Osmar e Sra. Elza que são as pessoas mais importantes na minha vida, sempre preocupados e me dando todo apoio em busca dos meus objetivos, sem eles nada disso estaria acontecendo;

Á minha mãe, pelo amor incondicional e incentivo, foi a pessoa que sempre me mostrou o lado bom da vida, e que precisamos passar por dificuldades hoje para sabermos agradecer o dia de amanhã, dividindo todos os meus receios, medos, a ela todo o meu amor, agradecimento e respeito;

Á minha irmã Amanda, pelo companheirismo, respeito, amor e amizade, sempre presente e de prontidão para o que fosse necessário, e pelo presente mais lindo que ela me deu, minha sobrinha Isabela, minha eterna gratidão;

Ao meu pai, que com todas suas dificuldades, me fortaleceu, incentivou e sempre presente na minha caminhada;

À minha tia Patricia que não mede esforços em me ajuda, e por todo amor e segurança que me passa;

À minha querida orientadora Profa. Dra. Andréia Aparecida da Silva, que foi um presente de Deus, agradeço imensamente por toda dedicação para comigo, toda educação, paciência, respeito, me mostrou uma forma linda de profissionalismo e honestidade, me ajudando e me dando os melhores conselhos para o futuro, vou levar sempre em meu coração;

Aos meus mestres Profa. Dra. Camila Lopes Cardoso e Prof. Dr. Marcos Martins Curi, que colaboraram de forma muito significativa no meu crescimento profissional, incentivando e apoiando minha participação em congressos, e sem dúvidas fizeram me apaixonar pela cirurgia e a estomatologia;

Ao Prof. Dr. Hugo Nary Filho pela disponibilização das amostras e laudos, que foram essenciais em minha pesquisa;

Ao Prof. Dr. Joel Ferreira Santiago Junior, que colaborou na parte estatística da minha pesquisa;

À técnica Mayra do laboratório de histopatologia que me ajudou nas realizações das reações imuno-histoquímicas;

Ao coordenador do curso Prof. Dr. Fernando Accorci Orosco;

Ao mestrando André Coelho Lopes;

À Dra. Lynne Bingle por gentilmente doar os anticorpos;

As minhas amigas Carolina F. Ruiz e Betina Ramos, sem duvidas foram os melhores presentes que a faculdade e a vida poderia ter me dado, sem as duas essa jornada seria mais difícil, sempre deixando os meus dias mais alegres, obrigado por cada riso e parceria nesses quatro anos inesquecíveis;

À Francielli Nunes, Larissa Faria, Larissa Paulino, Mari Campelli, que foram pessoas maravilhosas que tive o prazer de conviver;

A todos os professores da graduação, que se doaram, colaborando no crescimento profissional e humano de cada aluno, em especial à Dra. Izabel Maria Marchi de Carvalho, Dra. Carolina Nunes Pegoraro, Dra. Danieli Colaço Siqueira, Dra. Patrícia Pinto Saraiva, Dra. Mirela Lindoso Gomes Campos, Dra. Élcia Maria Varize Silveira, Dra. Jéssica Lemos Gulinelli, Dr. João Henrique Nogueira Pinto os meus mais sinceros agradecimentos.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis." (José de Alencar).

RESUMO

Os mecanismos da imunidade inata são a primeira linha de defesa contra infecção, está sempre presente e podem ser ativados rapidamente, no entanto, nem sempre tem a capacidade de eliminar a infecção. PLUNC (“Palate, lung and nasal epithelium clone”) é uma proteína secretada por epitélio que desempenha um papel crucial na defesa do hospedeiro contra a infecção bacteriana. O objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão de PLUNC em casos de rinosinusite de pacientes que foram submetidos à cirurgia ortognática. Doze casos com diagnóstico de rinosinusite foram selecionados do arquivo de histopatologia da Universidade do Sagrado Coração no período de dezembro de 2015 a agosto de 2016 para a realização de reações de imuno-histoquímica para os anticorpos LPLUNC 1A e LPLUNC 1B. A amostra foi composta por 6 (50%) homens e 06 (50%) mulheres com média de idade de 26,43 anos. Quando comparado os 2 anticorpos, foi possível observar resultado estatisticamente significativo ($p < 0,001$). Foi possível observar maior expressão para o anticorpo LPLUNC 1B tanto no revestimento epitelial quanto nas glândulas mucosas. Podemos concluir que a proteína PLUNC é um fator essencial para o mecanismo de defesa inato da mucosa nasal.

Palavras-chaves: Proteínas PLUNC. Imuno-histoquímica. Rinosinusite.

ABSTRACT

The mechanisms of innate immunity are the first line of defense against infection, is always present and can be activated quickly, however, don't always have the ability to eliminate the infection. PLUNC ("Palate, lung and nasal epithelium clone") is a protein secreted by epithelium that plays a crucial role in protecting the host against bacterial infection. The objective of this work was to evaluate the expression of PLUNC proteins in rhinosinusitis patients who underwent orthognathic surgery. Twelve cases of rhinosinusitis diagnosis were selected from the histopathology of the University of the Sacred Heart in December 2015 period to August 2016 for the realization of immunohistochemical reactions for anti-LPLUNC LPLUNC 1A and 1B. The sample was composed of 6 (50%) men and 06 (50%) women with an average age of 26.43 years. When compared the antibody 2, it was possible to observe statistically significant results ($p < 0.001$). It was possible to observe greater expression to the antibody LPLUNC 1B both in the epithelial lining as in mucous glands. We can conclude that the PLUNC protein is an essential factor for the innate defense mechanism of the nasal mucosa.

Keywords: PLUNC proteins. Immunohistochemistry. Rhinosinusitis.

Listas de abreviaturas e siglas

BPI;	Proteína de aumento da permeabilidade bactericida
CRS;	Rinossinusite crônica
CRSwNP	do inglês <i>Chronic rhinosinusitis with nasal polyps</i>
CRSsNP	do inglês <i>Chronic rhinosinusitis without nasal polyps</i>
CD-14	do inglês <i>Cluster of Differentiation 14</i>
DC	do inglês <i>Dendritic cell</i>
H&E;	Hematoxilina e Eosina
HCCI;	Cornetos nasais inferiores hipertróficos
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IL-8	Interleucina -8
LBP	Proteína de ligação para lipopolissacarídeos
LPLUNC	do inglês <i>Long palate, lung, nasal epithelium clone</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
MHC	Molécula de histocompatibilidade principal classe I
MP	<i>Mycoplasma Pneumoniae</i>
NK	do inglês <i>Natural Killer</i>
PB	Pares de base
PBS	Tampão Salino
PLUNC	do inglês <i>palate, lung, nasal epithelium clone</i>
PSP	Proteína secretora da parotida
PT-PCR	do inglês <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SPLUNC	do inglês <i>Short palate, lung, nasal epithelium clone</i>

Sumário

1. Introdução e Justificativa.....	10
1.1 Células envolvidas na imunidade inata	11
1.2 Descrição da proteína PLUNC	13
1.3 Definição de Rinossinusite Crônica (CRS).....	16
2. Objetivo.....	19
3. Material e Método	20
3.1 Avaliação da marcação imuno-histoquímica.....	21
3.2 Teste Estatístico	21
4. Resultados.....	22
5. Discussão	25
6. Considerações Finais	27
Referências bibliográficas	28
APNDICE 01	32

1. Introdução e Justificativa

A entrada de patógenos pelo trato respiratório superior é de conhecimento das áreas médicas e odontológicas. Estudos foram realizados comprovando a presença de vários microrganismos de diferentes tipos que tem livre passagem durante a respiração. As superfícies mucosas da cavidade bucal e trato aéreo superior são importantes pontos de entrada de microrganismos envolvidos em doenças locais e sistêmicas (GEETHA et al. 2005).

O organismo possui dois tipos de resposta frente à invasão de um patógeno: a resposta imune inata e a adaptativa. Os mecanismos da imunidade inata são a primeira linha de defesa contra infecção (BINGLE et al. 2003), está sempre presente e podem ser ativados rapidamente, no entanto, nem sempre tem a capacidade de eliminar a infecção. A imunidade inata consiste de mecanismos que existem no organismo antes deste ser submetido à infecção (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002), são capazes de realizar rápidas respostas frente ao agente agressor e reagem essencialmente do mesmo modo as infecções repetidas.

Os principais componentes da imunidade inata são: barreiras físicas e químicas, tais como os epitélios e as substâncias antimicrobianas produzidas nas superfícies epiteliais, células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos), células natural killer, proteínas do sangue, incluindo membros do sistema complemento e outros mediadores da inflamação, e citocinas que regulam e coordenam muitas atividades celulares na imunidade inata.

Barreiras Epiteliais podem ser definidas como superfícies epiteliais que formam barreiras físicas contra microrganismos externos, assim, a pele, superfície do trato respiratório e o trato intestinal são protegidos por epitélio contíguo que tem como objetivo impedir a entrada de microrganismos, onde que a perda da integridade destes epitélios causa predisposição à infecção.

Uma variedade de proteínas e peptídeos antimicrobianos têm sido identificados na saliva e fluídos das vias aéreas superiores como beta-defensina na língua (WEINBERGL et al.1998, GANZ et al. 2003), polipeptídios catiônicos (COLE et al.2002), lactoferrinas, lisozima e peroxidase salivares (TENOVU, 1998, EDGERTON e KOSHLIKOVA, 2000). Estas proteínas têm função protetora na cavidade bucal e vias aéreas superiores. De acordo com Bradshaw (2003), a

identificação de novas proteínas e peptídeos antimicrobianos é prioridade contínua. Proteína secretora da parótida (PSP) e PLUNC foram recentemente descobertas na cavidade bucal e trato aéreo superior (BINGLE e BINGLE, 2000). Tanto o PSP e PLUNC exibem semelhança com LPS e proteínas de ligação como BPI e LBP (BINGLE e CRAVEN, 2002).

1.1 Células envolvidas na imunidade inata

O sistema imune inato é composto por fagócitos (que são os neutrófilos e macrófagos) que possuem a função de ingerir e destruir microorganismo invasores. Os neutrófilos e macrófagos reconhecem os micróbios através de diversos receptores que funcionam para estimular a migração das células para o sítio da infecção, promover fagocitose desse agente agressor e estimular a produção de substância microbicida. Os diferentes receptores apresentam funções distintas, porém se sobrepõem. Os receptores transmembrana de sete α -hélices dos fagócitos reconhecem os produtos microbianos e alguns mediadores que são produzidos em resposta à inflamação. Esses receptores transmembrana estimulam principalmente a migração de leucócitos para o sítio de infecção. Os macrófagos usam alguns receptores para se ligar diretamente aos micróbios e fagocitá-los, por exemplo, o receptor de manose, que é uma lectina, se liga a resíduos terminais da manose e frutose das glicoproteínas e glicolipídeos presentes nas paredes dos micróbios. Os macrófagos expressam também receptores para as porções Fc dos anticorpos IgG que podem revestir os micróbios e promover a fagocitose. Essa eficiência pode ser aumentada se esses micróbios estiverem revestidos por macromoléculas chamadas de opsoninas, que podem ser reconhecidas pelo sistema de receptores dos macrófagos.

Os lipopolissacarídeos (LPS) são produtos de bactéria gram-negativa que contém componentes lipídicos e metade polissacarídea, liga-se ao receptor dos macrófagos e estimula a atividade microbicida dessas células e a secreção de citocinas. O sistema do macrófago sensível ao LPS consiste em três componentes: uma proteína plasmática chamada proteína de ligação LPS (LPB), um receptor de superfície para LPS chamado CD14 e uma subunidade receptora de transdução de sinais de mamíferos chamado receptor 4 de proteína semelhante ao "Toll". O LPS

circulante é inicialmente ligado ao LPB e depois liberado para CD14 na superfície do macrófago onde LPB é liberado. A subsequente ativação dos macrófagos é resultado de sinais desencadeados pela subunidade semelhante ao Toll, que compartilham homologia estrutural e vias de transdução de sinais com o receptor da IL tipo 1 (ABAS et al. 2002). O reconhecimento precoce de produtos bacterianos é crítico para a sobrevivência humana. Os lipopolissacarídeos (LPS) que são constituintes das paredes de bactérias gram-negativas, ácidos lipoteicóico de bactérias gram-positivas e lipoarabinamans de micobactérias apresentam um intenso efeito crítico. Em sepse, muitos tipos celulares, incluindo neutrófilos e macrófagos, respondem a estes constituintes ativando potentes mediadores inflamatórios (HOFFMANN et al. 1999, BINGLE E CRAVEN 2002).

Muitas moléculas associadas com a resposta inata interagem especificamente com a superfície bacteriana. Em humanos, duas proteínas são críticas na mediação de sinais de bactérias gram-negativas: proteínas ligadoras (LBP) e proteína de aumento de permeabilidade bactericida (BPI). Estas duas proteínas estão estruturalmente relacionadas e podem ser consideradas como tendo funções antagonistas. LPB aumenta a resposta celular para LPS, enquanto BPI diminui essa resposta (BINGLE e CRAVEN 2002, BINGLE et al. 2003).

BPI é uma molécula de 55 Kd presentes nos grânulos dos leucócitos que apresenta toxicidade seletiva contra bactérias gram-negativas. É constituída por 2 domínios distintos, onde um se liga as endotoxinas bacterianas e o outro tem função de opsonina (HOFFMANN et al. 1999, WHEELER et al.2003).

As células natural killer (NK) são uma subpopulação de linfócitos que lisam as células infectadas por vírus e secretam citocinas, principalmente IFN- γ . O principal papel fisiológico dessas células é o de defesa contra infecção por vírus e alguns outros microrganismos intracelulares. O reconhecimento das células infectadas pelas células NK é regulado por uma combinação de receptores de ativação e de inibição. Os receptores inibitórios reconhecem as moléculas de MHC de classe I (molécula de histocompatibilidade principal classe I), razão pelo qual as células NK não destroem as células normais do hospedeiro, porém matam as células nas quais a expressão de MHC classe I está reduzida, tal qual nas células infectadas por vírus. Sendo assim, as células NK são ativadas pelo reconhecimento de três tipos de células: células revestidas de anticorpos, células infectadas por vírus ou por algumas

bactérias intracelulares e células com pouca expressão de moléculas de MHC. A ativação das células NK resulta no desencadeamento de funções efetoras de lise das células alvo e produção de citocinas.

Outras células que estão envolvidas na imunidade inata são as células dendríticas (DC). Essas células se originam de precursores linfóides ou mielóides na medula óssea. Apresentam importante papel durante a resposta imune inata, como reconhecimento de antígeno e na produção de citocinas, além de terem um papel de ligação entre o sistema imune inato e o adaptativo. (JANEWAY e MEDZHITOV 2002, CHAUVIN e JOSEN 2008).

1.2 Descrição da proteína PLUNC

A primeira descrição do gene “Palate, lung and nasal epithelium clone (PLUNC)”, foi realizada por Weston et al. (1999) no epitélio embriológico do palato e fossas nasais de ratos e no epitélio traqueobrônquico do pulmão de camundongos adultos durante estudo para identificar genes com possíveis papéis na regulação do desenvolvimento facial. Weston et al. (1999) e através desse estudo acabaram descobrindo esse novo gene expresso pelo epitélio do palato, pulmão e fossas nasais de camundongos. O gene PLUNC possui aproximadamente 1.1 “kilobases” (Kb) de comprimento e codifica uma proteína de aproximadamente 300k, denominada pelos autores de PLUNC (palate, lung and nasal epithelium clone).

Bingle e Bingle em 2000 caracterizaram o gene PLUNC humano que contém 1020 pb e está localizado no cromossomo 2q11, contém 9 éxons (segmento de um gene que efetivamente codifica parte da sequência de aminoácidos de uma proteína) com aproximadamente 7.3 Kb. O primeiro (menor) e o nono éxons não são traduzidos. Uma suposta TATAbox está localizada a 40 pares de base (pb) do fim do primeiro éxon. Os éxons variam de tamanho entre 40 a 174 bp, enquanto que os íntrons variam entre 1642 e 159 bp. Um longo íntron separa o primeiro e o segundo éxon. Segundo os autores, o gene PLUNC humano apresenta 72% de similaridade com o gene PLUNC dos roedores.

Vários estudos demonstraram homologia de PLUNC em células de epitélio normal da cavidade nasal e vias aéreas superiores de ratos, vaca, porco, camundongo e humanos (BINGLE e BINGLE 2000, LECLAIR et al. 2001, SUNG et

al.2002, LECLAIR, 2003, LARSEN et al. 2005). LeClair et al. (2004) caracterizaram a sequência genômica e expressão de SPLUNC 5 em camundongo, no qual apresentou 60% de homologia com SPLUNC 1 de camundongos, no entanto, SPLUNC 5 é expresso exclusivamente no epitélio intrapapilar da superfície dorsal da língua. Esse padrão de expressão é consistente com a hipótese de que estas proteínas protegem as superfícies epiteliais colonizadas por microrganismos potencialmente patogênicos. De acordo com Bingle e Craven (2003), há aproximadamente 45-76% de homologia entre os genes de PLUNC humano e de camundongo.

A função de PLUNC ainda é incerta, porém devido à superexpressão de PLUNC em epitélios expostos a injúrias, pode ser sugerido que essas proteínas são secretadas como produtos com papel defensivo ou protetor (BINGLE e CRAVEN, 2003).

Algumas hipóteses foram sugeridas para a função de PLUNC (BPIF) no sistema imune inato do epitélio oral e das vias aéreas superiores por Bingle e Craven (2002) e LeClair (2003). Segundo estes autores as proteínas da família PLUNC, assim como outras moléculas de imunidade inata (BPI, LBP), possuem potenciais receptores de lipopolissacarídeos (LPS), sendo assim, as proteínas LPLUNC podem atuar de modo similar a LBP, tendo uma função pró-inflamatória (BINGLE e CRAVEN 2004) apresentando moléculas microbianas à via CD14/receptores toll-like (TLR) 2 ou TLR-4, envolvendo outras vias de TLRs ou ainda sinalizando outras vias desconhecidas. Em contrapartida, a SPLUNC agiria de forma similar a BPI, tendo uma função antiinflamatória, diminuindo a carga microbiana através da morte celular direta ou do sequestro de moléculas inflamatórias.

As proteínas SPLUNCs (proteína curta) apresentam homologia com o domínio N-terminal da proteína BPI, enquanto que as proteínas LPLUNC (proteína longa) apresentam homologia com os domínios N-terminal e C-terminal do BPI (BINGLE e CRAVEN 2003).

A expressão da proteína PLUNC foi avaliada por diferentes autores e em diferentes sítios. Kim et al. (2006) demonstraram que BPIF (PLUNC) é secretado por células do epitélio nasal e não são influenciados pela diferenciação mucociliar ou por mediadores pré-inflamatórios. Através de reações de imuno-histoquímica e western

blot, os autores mostraram que a proteína PLUNC foi expressa na superfície de células ciliadas epiteliais e nas células serosas da glândula submucosa da mucosa nasal humana e nas secreções nasal de pessoas saudáveis.

LeClair et al. (2004) analisaram os genomas de humanos, ratos e camundongos buscando relações entre a família de proteínas PLUNC de humanos e outras espécies e membros da família BPI. SPLUNC 1 é expresso em células do epitélio normal da cavidade nasal e trato aéreo superior de camundongos (Weston et al. 1999). SPLUNC é um gene ortólogo, ou seja, gene semelhante em diferentes espécies. SPLUNC 1 é expresso em humanos (BINGLE e BINGLE 2000), ratos (SUNG et al.2002), vacas (WHEELER et al. 2002) e porcos (LARSEN et al. 2005), sendo também expresso em células do epitélio normal da cavidade nasal e trato aéreo superior. SPLUNC 1 também tem sido detectado em lavados nasal e brônquico (SUNG et al. 2002, GHAFOURI et al. 2003, COLE et al. 2002). A expressão de SPLUNC 1 parece aumentado em casos de cirurgia invasiva (SUNG et al. 2002) e irritação no trato aéreo superior (GHAFOURI et al. 2002, LINDAHE et al. 2001) e em doenças pulmonares (DI et al. 2003). SPLUNC 5 é expresso apenas no epitélio de língua de camundongos e ratos e não em humanos e LPLUNC 1 foi encontrada em células serosas das glândulas de Von Ebner's, palato, faringe anterior, traquéia e brônquios. Bingle e Craven (2002) também observaram a expressão de SLUNC 2 e LPLUNC 2 em glândulas submandibulares. Bingle et al. (2005) identificaram a expressão de SPLUNC 1 em glândulas submucosas do trato aéreo superior, glândulas mucosas da orofaringe, mucosa de seio maxilar e em diferentes cânceres de pulmão, sugerindo que a expressão de SPLUNC 1 está associada com tumores que apresentam fenótipo secretor.

Zhou et al. (2006) avaliaram a expressão do SPLUNC1 em quatro fetos humanos normais por imuno-histoquímica e RT-PCR. Os autores avaliaram o trato respiratório superior, glândulas salivares, trato digestivo, olhos e tecido adiposo. Os autores indicam que SPLUNC1 não está somente envolvida nos mecanismos de defesa do trato respiratório superior, olhos, e trato digestivo, mas provavelmente também esteja envolvido no desenvolvimento do feto e do metabolismo lipídico.

A expressão de PLUNC também foi observada em tecido glandular do trato respiratório por Bingle et al. (2005). Eles demonstraram também que SPLUNC 1 pode ser encontrado em células mucosas, em ductos de glândulas submucosas,

glândulas menores do nariz, seios paranasais, região posterior da língua e tonsila. Chu et al. (2007) determinaram as funções antiinflamatórias e de defesa da proteína SPLUNC1 na infecção respiratória por *Mycoplasma pneumoniae* (MP) e a regulação de SPLUNC1 pelo MP e na inflamação alérgica. Os resultados demonstraram que a proteína SPLUNC1 diminuiu os níveis de infecção pelo MP e inibiu a produção epitelial de IL-8 induzida pelo MP; muitas células epiteliais respiratórias de humanos e ratos mostraram um alto nível de expressão de SPLUNC1; foi observado também que a infecção pelo MP aumenta a expressão de SPLUNC1 e diminui a expressão de IL-13. Dessa forma, sugere-se que SPLUNC 1 serve como uma nova proteína de defesa do hospedeiro contra o MP e que uma reação alérgica pode reduzir acentuadamente a expressão de SPLUNC 1, o que pode contribuir em parte para a natureza persistente de infecções bacterianas nas vias respiratórias alérgicas.

A proteína PLUNC foi identificada pela primeira vez na saliva humana por Vitorino et al. (2004) utilizando a técnica proteômica. Das proteínas avaliadas pelos autores, 11 foram separadas e identificadas na saliva pela primeira vez utilizando as ferramentas proteômicas. Além disso, as proteínas PLUNC, cistatina A e cistatina B foram pioneiramente identificadas na saliva.

1.3 Definição de Rinossinusite Crônica (CRS)

A rinossinusite é caracterizada pela inflamação crônica da mucosa nasal e seios paranasais. A rinossinusite aguda é considerada de natureza infecciosa, já rinossinusite crônica (CRS) está associada a uma gama de recorrências dessa inflamação. Dentro da literatura as etiologias mais aceitas estão associadas às bactérias, fungos, vírus e causas alérgicas. Esta condição pode ser subdividida em 2 entidades: CRS com pólipos nasais (CRSwNP) e CRS sem pólipos nasais (CRSsNP). Sua etiologia está relacionada com bactérias, fungos, vírus e causas alérgicas. (MELTZER et al., 2004; SESHADRI et al., 2012; WEY et al., 2014).

Segundo o Consenso em rinite de 2012 uns dos fatores que explicam a ocorrência da rinossinusite alérgica se deve ao mecanismo fisiopatológico pelo qual a rinite alérgica também pode causar rinossinusite, via edema e hipersecreção da mucosa nasossinusal e obstrução dos óstios dos seios paranasais, com

consequente estase de muco, o que favorece a infecção bacteriana secundária, levando a um quadro de inflamação das estruturas.

O sintoma que podem ser relatados pelos pacientes portadores desse processo inflamatório pode ser: obstrução nasal, rinorréia anterior ou posterior, dor ou pressão facial, redução ou perda de olfato.

A mucosa nasossinusal é especializada, revestida por epitélio respiratório. Sendo composta por células colunares ciliadas, glândulas seromucosas que conjuntamente com as células caliciformes irão produzir o muco, e todo o conjunto de estruturas formará os sistemas mucociliar desse epitélio, importante mecanismo de defesa das vias aéreas. Qualquer falha nesse sistema irá aumentar em muito a morbidade das estruturas dessas regiões, levando à instalação de processo inflamatório associado ou não à infecção. (DORGAM et. al. 2004)

Os cornetos nasais inferiores são estruturas que se desenvolvem aproximadamente entre a 38^a a 40^a semanas da vida intrauterina, são localizadas na parede nasal lateral que se ligam ao osso da concha nasal inferior, sendo recoberta por epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado. As conchas nasais inferiores são de extrema importância, porque colaboram com a umidificação, aquecimento e filtração do ar e também atua regulando a quantidade de ar inspirado.

A congestão nasal crônica é um sintoma que acomete cerca de 20 a 25% da população e tem como principal etiologia a hipertrofia dos cornetos nasais inferiores (HCCI), mas também são considerados fatores causais o desvio septal, polipose nasal e hipertrofia das tonsilas faríngeas. O procedimento cirúrgico realizado para o alívio da congestão nasal é a turbinectomia ou turbinoplastia visando redução das conchas nasais inferiores ou a sua completa remoção, a ampliação (ou aumento) da cavidade nasal e com isso reduzir a resistência nasal (HAMERSCHMIDT, 2016).

A expressão da proteína PLUNC foi avaliada por diferentes autores e em diferentes sítios, sendo observado que PLUNC é secretado por células do epitélio nasal e não são influenciados pela diferenciação mucociliar ou por mediadores pré-inflamatórios. Através de reações de imuno-histoquímica e western blot, é possível observa a expressão da proteína em superfície de células ciliadas epiteliais e nas células serosas da glândula submucosa da mucosa nasal humana e nas secreções nasal de pessoas saudáveis.

Desta forma, como uma das funções da proteína PLUNC (BPIF) está relacionado ao sistema imune inato e nesses pacientes com rinosinusite há uma intensa infamação. Poucos trabalhos relacionam o papel dessas proteínas com a rinosinusite, pretendemos estudar a expressão de PLUNC nesses pacientes que foram submetidos à terapia ortognática e remoção dos cornetos nasais hipertróficos inferiores.

2. Objetivo

Objetivo Geral

Analisar a expressão das proteínas PLUNC em cornetos nasais de pacientes que foram submetidos à cirurgia ortognática com diagnóstico histopatológico de Rinossinusite.

Objetivos Específicos

- 1) Avaliar a expressão de LPLUNC 1A em cornetos nasais de pacientes submetidos à cirurgia ortognática
- 2) Avaliar a expressão de LPLUNC 1B em cornetos nasais de pacientes submetidos à cirurgia ortognática

3. Material e Método

Foram utilizados neste trabalho os blocos de parafina correspondentes aos cornetos nasais de pacientes submetidos à cirurgia ortognáticas no período de 2015 e 2016 disponíveis no laboratório de histopatologia da Universidade do Sagrado Coração.

Os dados clínicos (idade, gênero, classificação de oclusão) foram obtidos dos prontuários odontológicos. Todos os cornetos foram fixados em formol neutro tamponado a 10% por 24 horas e incluídos em parafina. Cortes histológicos de 5µm de espessura foram corados com Hematoxilina & Eosina para descrição das estruturas presentes em cada caso selecionado.

As reações para avaliar o padrão de expressão da família PLUNC nos cornetos nasais foram realizadas no laboratório de Histopatologia da Universidade do Sagrado Coração. Utilizou os seguintes anticorpos: LPLUNC 1B (diluição 1:600); LPLUNC 1A (diluição 1:300). Estes anticorpos não são comerciais e foram gentilmente doados para essa pesquisa pela Dra. Lynne Bingle.

O seguinte protocolo foi utilizado: inicialmente foram obtidos cortes parafinados de 3µm de espessura, montados em lâminas silanizadas em todos os casos selecionados. Em seguida foi realizada a primeira desparafinização em xilol por 5 minutos, segunda desparafinização em xilol por 5 minutos. A próxima etapa realizou duas hidratações dos cortes em etanol absoluto e álcool 70% por 5 minutos cada, seguida por lavagens em água corrente e destilada. Foi então, realizado o bloqueio da peroxidase endógena, em água oxigenada (3% em metanol) por 20 minutos, e lavado rapidamente em PBS (Tampão fosfato salino). A recuperação antigênica foi realizada pela fervura em microondas, com solução de citrato de sódio (tribásico) 0,01M por 8 minutos, deixando esfriar até atingir a temperatura ambiente seguida por lavagem em PBS. Posteriormente, foi realizado um bloqueio de proteínas com 100% de soro fetal de cabra (Sigma Aldrich), em câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente.

Então, realizou a incubação por 18 horas a 4°C com o anticorpo primário diluído em soro fetal de cabra, o qual será diluído de acordo com as especificações citadas acima. Um controle negativo utilizando anticorpo IgG (Dako Cytomation) foi utilizado em cada caso. As lâminas foram lavadas 2 vezes em PBS sob agitação por 5 minutos cada e então incubadas com anticorpos secundários conjugados com

peroxidase (Vectastain Elite ABC kit, Rabbit/Vector Laboratories) por 30 minutos em temperatura ambiente, seguido de 2 lavagens em PBS sob agitação por 5 minutos cada. Após isso, as lâminas foram incubadas com complexo Avidina – Biotina (Vectastain Elite ABC kit, Rabbit/Vector Laboratories) por mais 30 minutos em temperatura ambiente. Foi feita então uma nova lavagem com PBS com duas trocas de 5 minutos sob agitação. Na próxima etapa as lâminas foram reveladas com o substrato cromógeno para peroxidase (Vector NovaRed, Substrate kit for peroxidase) por 2 a 5 minutos ou até o aparecimento de cor em temperatura ambiente e lavadas em água destilada por 5 minutos. As lâminas foram então contra coradas com Hematoxilina Harris e lavadas em água corrente e água destilada. Os cortes foram desidratados em banhos de álcool 70%, 90% e absoluto seguido pela diafanização em xilol e montagem das lâminas com resina de baixa viscosidade.

3.1 Avaliação da marcação imuno-histoquímica

As reações foram avaliadas como positivas ou negativas, para isso cinco campos por lâmina em aumento de 40x foram aleatoriamente selecionados. A imunoreatividade para os anticorpos LPLUNC 1A, LPLUNC1B nos cornetos nasais foram de modo semi-quantitativo utilizando-se escores de 1 a 4 (1= ausente a 4= intenso), de acordo com Pedrosa Jr. et al. utilizando o programa Image Pro-Plus versão 4.5.

3.2 Teste Estatístico

Os dados provenientes das mensurações foram organizados em tabela em formato Excel (Microsoft Office Excel, Redmond, WA, Estados Unidos) e submetidos ao software SigmaPlot (SigmaPlot, San Jose, CA, EUA) versão 12.0 e analisados em relação à distribuição normal (teste Shapiro-Wilk e igualdade de variância) e, posteriormente, foi adotado o teste de análise de variância a dois critérios (Fatores: Proteínas e região analisada). O pós-teste adotado para indicar as diferenças entre grupos foi o teste de Tukey. Adotou-se um nível de significância de 5% para as análises

4. Resultados

Doze casos com diagnóstico de Rinossinusite de pacientes que foram submetidos à cirurgia ortognática e que tiveram parte dos cornetos inferiores removidos foram selecionados a partir do arquivo do laboratório de Histopatologia da Universidade do Sagrado Coração.

06 pacientes eram do sexo masculino e 06 pacientes do sexo feminino com média de idade de 26,43 anos. A deformidade facial mais presente foi classe II.

Todos os casos foram previamente avaliados na coloração de rotina de Hematoxilina & Eosina. Em todos os casos foi possível observar revestimento respiratório constituído por Epitélio estratificado cilíndrico ciliado com presença de células caliciformes com quantidade variadas de glândulas mucosas e infiltrado inflamatório predominantemente crônico (Fig. 01).

Para os anticorpos LPLUNC 1A e LPLUNC 1B foi possível observar a marcação tanto em células mucosas quanto nas células caliciformes presentes no revestimento epitelial. A tabela 01 mostra os scores para a imunomarcação e as diferenças de intensidade em cada uma das estruturas.

O anticorpo LPLUNC 1B foi mais intensamente marcado tanto no revestimento epitelial, quanto nas glândulas quando comparados com o anticorpo LPLUNC1 A.

Em uma análise da expressão de proteína (LPLUNC 1B vs. LPLUNC 1A) foi encontrado uma diferença significativa entre os grupos, $p < 0,001$. Sendo que a média para o grupo LPLUNC 1B foi de 2,375 e LPLUNC 1A foi de 1,083, portanto foi identificada uma diferença significativa indicando maior expressão de LPLUNC 1B.

Em relação às estruturas, observados para as análises da expressão no epitélio, foi identificada uma diferença significativa na comparação de LPLUNC 1B (média: 2,083) vs. LPLUNC 1A (média: 1,083), $p = 0,009$, sendo de maior expressão para LPLUNC 1B.

Finalmente, em relação ao tecido glandular também foi identificado uma diferença significativa na expressão das proteínas, $p < 0,001$, sendo que LPLUNC 1B (média: 2,667) apresentou maior expressão que LPLUNC 1A (média: 1,083).

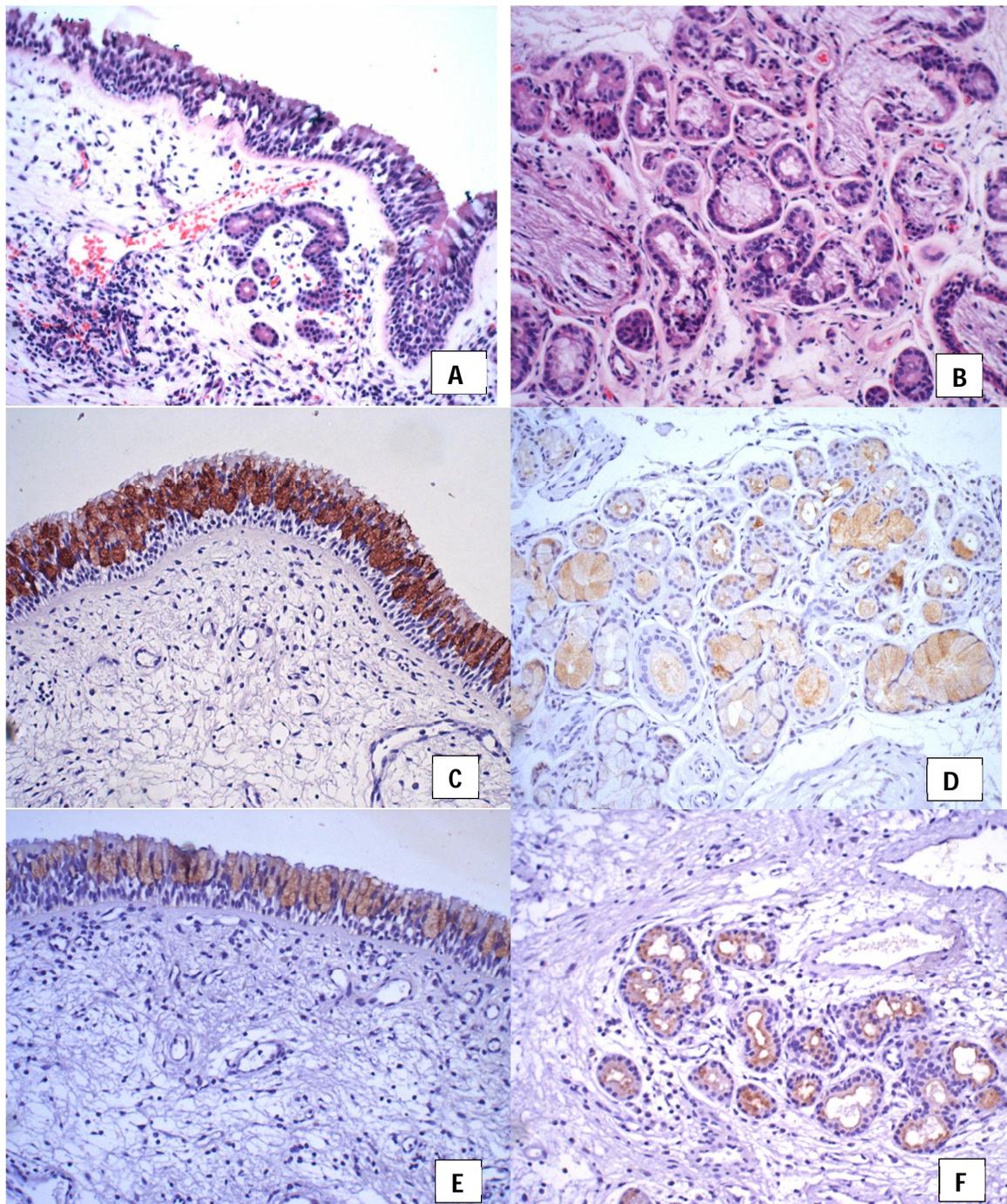


Figura 01 – **A** - Epitélio estratificado cilíndrico ciliado e tecido conjuntivo frouxo associado a infiltrado inflamatório crônico (20x H&E); **B**- Glândulas mucosas presentes nos casos de rinosinusite (20x H&E); **C/D**- Imunomarcagem para o anticorpo LPLUNC 1A em epitélio respiratório e nas glândulas mucosas (20x); **E/F** - Imunomarcagem para o anticorpo LPLUNC 1B em epitélio respiratório e nas glândulas mucosas. Fonte: elaborado pelo autor

Lâminas	LPLUNC 1B	LPLUNC1A
Caso 01	Epitélio ++ Glândula +++	Epitélio + Glândula +
Caso 02	Epitélio +++ Glândula +++	Epitélio + Glândula +
Caso 03	Epitélio ++ Glândula +++	Epitélio + Glândula +
Caso 04	Epitélio ++ Glândula ++	Epitélio ++ Glândula ++
Caso 05	Epitélio ++ Glândula +++	Epitélio ++ Glândula ++
Caso 06	Epitélio ++ Glândula +++	Epitélio - Glândula +
Caso 07	Epitélio - Glândula ++	Epitélio +++ Glândula ++
Caso 08	Epitélio +++ Glândula ++	Epitélio - Glândula -
Caso 09	Epitélio ++ Glândula +++	Epitélio - Glândula -
Caso 10	Epitélio ++ Glândula +++	Epitélio - Glândula -
Caso 11	Epitélio +++ Glândula +++	Epitélio ++ Glândula +
Caso 12	Epitélio + Glândula ++	Epitélio - Glândula -

Tabela 01 – Escores da análise semi-quantitativa, variando de “-“ para ausência de imunomarcção a “+, ++, +++” para marcação leve, moderada e intensa respectivamente. Fonte: elaborado pelo autor.

5. Discussão

O objetivo do presente trabalho foi mostrar a expressão de 2 diferentes anticorpos da família PLUNC em cornetos nasais hipertróficos o que justifica a sua remoção cirúrgica. Em todos os casos os pacientes apresentavam Rinossinusite crônica. “Palate, lung and nasal epithelium clone (PLUNC)”, foi primeiramente descrito por Weston et al. (1999) no epitélio embrionário do palato e fossas nasais de ratos e no epitélio traqueobrônquico do pulmão de camundongos adultos. No ano de 2000, Bingle e Bingle caracterizaram o gene PLUNC humano que contém 1020 pb e está localizado no cromossomo 2q11. Apesar de muitos estudos (GHAFOURI et al., 2002; LECLAIR 2004; KIM et al., 2006; VARGAS et al., 2008; GAKHAR et al., 2010; SILVA et al., 2011; PASSALI et al., 2014) a função de PLUNC continua incerta, porém devido à superexpressão de PLUNC em tecidos expostos a diversas injúrias, é sugerido que estas proteínas sejam secretadas com finalidade de proteção. (BINGLE e CRAVEN, 2003).

Kim et al. (2006) demonstraram que PLUNC é secretado por células do epitélio nasal e não são influenciados pela diferenciação mucociliar ou por mediadores pré-inflamatórios. Os autores mostraram que a proteína PLUNC foi expressa na superfície de células ciliadas epiteliais e nas células serosas da glândula submucosa da mucosa nasal humana e nas secreções nasal de pessoas saudáveis.

Nossos resultados demonstraram que LPLUNC foi expresso em epitélio respiratório e em glândulas mucosas de pacientes que tiveram os cornetos parcialmente removidos durante cirurgia ortognática. Dois anticorpos foram utilizados para esse estudo onde o anticorpo LPLUNC 1B foi estaticamente significativa quando comparado com LPLUNC1 A. Além do epitélio respiratório LPLUNC 1 foi encontrada em células serosas das glândulas de Von Ebner's, palato, faringe anterior, traqueia e brônquios (BINGLE e CRAVEN 2002).

Min-man et al. em 2009 realizaram estudo de proteomica para identificação de proteínas associadas a pólipos nasais e Rinossinusite crônica. Após a validação das proteínas mais presentes, foi observado expressão significativa de PLUNC nos tecidos estudados. Eles concluíram que estas proteínas, juntamente com PLUNC

podem servir de biomarcadores para monitoramento, progressão ou terapia instituída nas doenças estudadas.

De acordo com Bartlett et al., 2011, a expressão PLUNC foi significativamente reduzida no epitélio da mucosa e submucosas glândulas nos pacientes com colonização de multibactérias, particularmente aqueles mediada por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Estes resultados sugerem que os pacientes afetados por rinosinusite crônica com reduzida expressão PLUNC podem ter dificuldades em combater a infecção bacteriana; assim reduzida expressão PLUNC pode facilitar infecções recorrentes por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Nosso estudo não teve como objetivo estudar a presença de bactérias, entretanto, expressão significativa das proteínas foram encontradas tanto no epitélio respiratório quanto nas glândulas mucosas.

Seshadi et al., 2012 também mostraram a redução da expressão de PLUNC em casos de rinosinusites, entretanto, eles utilizaram anticorpos diferentes (SPLUNC1 e LPLUNC2) dos quais utilizamos na presente pesquisa. Nosso trabalho é o primeiro estudo a demonstrar a expressão de LPLUNC 1 nos casos de rinosinusites.

No nosso trabalho as proteínas LPLUNC estão expressas confirmando os achados de Bingle e Craven (2003) e Bingle e Craven (2004).

6. Considerações Finais

1. Podemos concluir que a proteína PLUNC é um fator essencial para o mecanismo de defesa inato da mucosa nasal.
2. LPLUNC está expresso em casos de processos inflamatórios da mucosa nasal

Referências bibliográficas

- ABAS, A. K; LICHTMAN, A. H; PODER, J. S. Imunidade inata, In: **Imunologia celular e molecular**. 4.ed. Revinter. Rio de Janeiro p.270-290.
- BARTLETT, J. A. et. al. PLUNC: a multifunctional surfactant of the airways. **Biochem Soc Trans**. v.39, n.4, p.1012-6. Aug. 2011
- BINGLE, C. D. SPLUNC1 (PLUNC) is expressed in glandular tissues of the respiratory tract and in lung tumours with a glandular phenotype. **J Pathol**. v.205, n.4, p.491-7. Mar. 2005
- BINGLE, C. D; BINGLE L. Characterization of the human PLUNC gene, a gene product with an upper airways and nasopharygeal restricted expression pattern. **Biochim Biophys Acta**. v.1493, n.3, p.363-7. Oct. 2000.
- BINGLE, C. D; CRAVEN, C. J. Comparative analysis of the PLUNC (palate, lung and nasal epithelium clone) protein families. **Biochem Soc Trans**. v.31, n.4, p.806-809. Aug. 2003.
- BINGLE, C. D; CRAVEN J. Meet the relatives: a family of BPI-and LBP-related proteins. **Trends Immunol**. v.25 n.2, p.53-55. Feb. 2004.
- BINGLE, C. D; CRAVEN, J. PLUNC: A novel family of candidate host defense proteins expressed in the upper airways and nasopharynx. **Hum Mol Genet**. v.11, n.8, p.932-943. Apr. 2002.
- BRADSHAW, J. Cationic antimicrobial peptides: issues for potential clinical use. **Bio Drugs**. v.17, n.4, p.233-240. 2003.
- CHAUVIN, C; JOSIEN, R. Dendritic cells as killers: mechanistic aspects and potential roles. **J Immunol**. v.181, n.1, p.11-16. Jul. 2008.
- CHU, H. W. et al. Function and regulation of SPLUNC1 protein in Mycoplasma infection and allergic inflammation. **J Immunol**. v.179, n.6, p.3995-4002. Sep. 2007.
- COLE, A. M. et al. Cationic polypeptides are required for antibacterial activity of human airway fluid. **J Immunol**. v.169 n.12, p.6985-6991. Dec. 2002.
- DA SILVA, A. A. et al. PLUNC protein expression in major salivary glands of HIV-infected patients. **Oral Dis**. V.17, n.3, p.258-264. Apr. 2011.

- DI, Y. P. et al. Molecular Cloning and characterization of spurt, a human novel gene that is retinoic acid-inducible and encodes a secretory protein specific in upper respiratory tracts. **J Biol Chem.** v.278, n.2, p.1165-1173. 2003.
- DORGAM, V. J. et al. Histology and ultrastructural study of the mucosa of the maxillary sinus in patients with chronic rhinosinusitis and nasosinus polyposis. **Rev Bras Otorrinolaringol.** v.70, n.1, p.7-13. Jan/Fev. 2004.
- EDGERTON, M; KOSHLUKOVA, S. E. Salivary histatin 5 and similarities to the other antimicrobial proteins in human saliva. **Adv Dent Res.** v.14, p.16-21. Dec. 2000.
- GAKHAR, L. et al. PLUNC is a novel airway surfactant protein with anti-biofilm activity. **PLoS One.** v.9;5, n.2. Feb. 2010.
- GANZ, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. **Nat Rev Immunol.** v.3, n.9, p.710-720. 2003
- GEETHA, C; et al. Design and validation of anti-inflammatory peptides from human parotid secretory protein. **J Dent Res.** v.84, n.2, p.149-153. Feb. 2005
- GHAFOURI, B; STÅHLBOM, B; TAGESSON, C; LINDAHL, M. Newly identified proteins in human nasal lavage fluid from non-smokers and smokers using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting. **Proteomics.** v.2, n.1, p.112-20. Jan. 2002
- HAMERSCHMIDT, R. et al. Comparison of turbinoplasty surgery efficacy in patients with and without allergic rhinitis. **Braz J Otorhinolaryngol.** v.82, n.2, p.131-139. Mar/Apr. 2016
- HOFFMANN, J. A. et al. Phylogenetic perspective in innate immunity. **Science.** v.284, p.1313-1318. 1999.
- JANEWAY, C. A; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol.** v.20, p.197-216. 2002.
- KIM, C. H. et al. Expression and regulation of PLUNC in human nasal epithelium. **Acta Otolaryngol.** v.126, v.10, p.1073-1078. Oct. 2006.
- LARSEN, K; MADSEN, L. B; BENDIXEN, C. Porcine SLPUNC1: Molecular cloning characterization and expression analysis. **Biochem Biophys Acta.** v.1727, n.3, p.220-226. Mar. 2005

- LECLAIR, E. E. Four BPI (bactericidal/permeability-increasing protein)-like genes expressed in the mouse nasal, oral, airway and digestive epithelia. **Biochem Soc Trans.** v.31: n.4, p.801-805. Aug. 2003.
- LECLAIR, E. E. et al. Genomic organization of the mouse PLUNC gene and expression in the developing airways and thymus. **Biochem Biophys Res Commun.** v.284, n.3, p.792-797. Jun. 2001
- LECLAIR, E. E. et al. Cloning and expression of a mouse member of the PLUNC protein family exclusively expressed in tongue epithelium. **Genomics.** v.83, n.4, p.658-666. Apr. 2004.
- LINDAHL, M; STÅHLBOM, B; TAGESSON, C. Identification of a new potential airway irritation marker, palate, lung nasal epithelium clone protein, in human lavage fluid with two-dimensional electrophoresis and matrix-assisted and laser desorption/ionization-time of flight. **Electrophoresis.** v.22, p.9, p.1795-1800. 2001.
- MELTZER, E. O. et al. Rhinosinusitis: establishing definitions for clinical research and patient care. **J Allergy Clin Immunol.** v.114(6 Suppl):155-212. Dec. 2004.
- MIN-MAN, W. et al. Differential proteomic analysis of nasal polyps, chronic sinusitis, and normal nasal mucosa tissues. **Otolaryngol Head Neck Surg.** v.141, n.3, p.364-368. Sep. 2009
- PASSALI, D. et al. PLUNC proteins positivity in patients with chronic rhinosinusitis: a case-control study. **Scientific World Journal.** v.15. Jul. 2014
- SESHADRI, S. et al. Reduced expression of antimicrobial PLUNC proteins in nasal polyp tissues of patients with chronic rhinosinusitis. **Allergy.** v.67, n.7, p.920-928. Jun. 2012
- SOLÉ D. et al. III Consenso Brasileiro sobre Rinites. **Brazilian Journal of Otolaryngology.** v.75, n.6. Nov/Dez. 2012. Disponível em: <http://www.aborlccf.org.br/consensos/Consenso_sobre_Rinite-SP-2014-08.pdf>. Acesso em: 28 de Set. 2016.
- SUNG, Y. K. et al. PLUNC, a member of the secretory gland protein family, is up-regulated in nasal respiratory epithelium after olfactory bulbectomy. **J Biol Chem.** v.277, n.15, p.12762-12769. Apr. 2002.
- TENOVOU, J. Antimicrobial function of human saliva – how important is it for oral health? **Acta Odontol Scand.** v.56, n.5, p.250-256. 1998.

- VARGAS, P. A. et al. Expression of PLUNC family members in benign and malignant salivary gland tumours. **Oral Dis.** v.14, n.7, p. 613-619. Oct. 2008.
- VITORINO, R. et al. Identification of human whole saliva protein components using proteomics. **Proteomics.** v.4 n.4, p.1109-1115. 2004.
- WEI, Y. et al. The antimicrobial protein short palate, lung, and nasal epithelium clone 1 (SPLUNC1) is differentially modulated in eosinophilic and noneosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **J Allergy Clin Immunol.** v.133, n.2, p.420-428. Feb. 2014.
- WEINBERG, A; KRISANAPROKORKIT, S; DALI, B. A. Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. **Crit Rev Oral Biol Med.** v.9, n.4, p.399-414. 1998.
- WESTON, W. M. et al. Differential display identification of plunc, a novel gene expressed in embryonic palate, nasal epithelium and adult lung. **J Biol Chem** v.274, n.19, p.13698-13703. May. 1999.
- WHEELER, T. T. et al. Bovine parotid secretory protein: structure, expression and relatedness to other BPI (bactericidal/permeability-increasing protein)-like proteins. **Biochem Soc Trans.** v. 31: (Pt 4), p.781-784. 2003.
- ZHOU, H. D. et al. Tissue distribution of the secretory protein, SPLUNC1, in the human fetus. **Histochem Cell Biol.** v.125, n.3, p.315-324. 2006.

APÊNDICE 01

UNIVERSIDADE DO SAGRADO
CORAÇÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da expressão das proteínas BPIF em glândulas mucosas de pacientes com sinusite

Pesquisador: Andréia Aparecida da Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 53011616.6.0000.5502

Instituição Proponente: Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Numero do Parecer: 1.411.078

Apresentação do Projeto:

Adequada

Objetivo da Pesquisa:

Analisar a expressão das proteínas BPIF em cornetos nasais de pacientes que foram submetidos a cirurgia ortognática de pacientes com diagnóstico de sinusite.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são praticamente inexistentes e os benefícios se relacionam a agregação de conhecimentos sobre o tema estudado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Projeto dispensa TCLE - análise laboratorial de material já incluído em blocos de parafina pertencentes ao laboratório.

Recomendações:

Não há

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Bairro: Rua Irmã Arminda Nº 10-50

CEP: 17.011-160

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)2107-7051

E-mail: prppg@usc.br

**UNIVERSIDADE DO SAGRADO
CORAÇÃO**



Continuação do Parecer: 1.411.078

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_659514.pdf	04/02/2016 18:04:22		Acelto
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Uso_de_biocos.docx	04/02/2016 18:04:01	Andréia Aparecida da Silva	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_TCLE.docx	04/02/2016 18:03:37	Andréia Aparecida da Silva	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa.docx	04/02/2016 17:51:03	Andréia Aparecida da Silva	Acelto
Cronograma	cronograma.docx	04/02/2016 17:50:45	Andréia Aparecida da Silva	Acelto
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	04/02/2016 17:39:44	Andréia Aparecida da Silva	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BAURU, 16 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
Marcos da Cunha Lopes Virmond
(Coordenador)

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Bairro: Rua Imã Arinda Nº 10-50 CEP: 17.011-160
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)2107-7051 E-mail: prpg@usc.br