

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Márcio Lorencini

“MODIFICAÇÕES TECIDUAIS E EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES
DE MATRIZ E DO INIBIDOR RECK NA PROGRESSÃO DA DOENÇA
PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS”

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de Mestre
em Genética e Biologia Molecular na área
de Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado
Co-orientador: Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

Campinas
2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

L886m	<p> Lorencini, Márcio Modificações teciduais e expressão de metaloproteinases de matriz e do inibidor Reck na progressão da doença periodontal induzida em ratos / Márcio Lorencini. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.</p> <p> Orientadora: Dagmar Ruth Stach-Machado. Co-orientador: Hernandes Faustino de Carvalho. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p> 1. Gengivite. 2. Doença periodontal. 3. Reck. 4. Metaloproteinase. I. Stach-Machado, Dagmar Ruth. II. Carvalho, Hernandes Faustino de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
--------------	--

Título em inglês: Tissue modifications and expression of matrix metalloproteinases and the inhibitor Reck in the progression of periodontal disease induced in rats.

Palavras-chave em inglês: Gingivitis; Periodontal disease; Reck; Metalloproteinases.

Área de concentração: Imunologia.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Dagmar Ruth Stach-Machado, Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro, Gustavo Pompermaier Garlet.

Data da defesa: 27/06/2006.

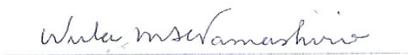
Campinas, 27 de junho de 2006.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro


Assinatura

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet


Assinatura

Prof. Dr. Fábio Trindade Maranhão Costa

Assinatura

Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior

Assinatura

*Quando a lógica da vida fechar os olhos e se deixar mesclar
Com o impulso da inteligência emotiva, sem receio e sem alardar
Estaremos diante da verdadeira ciência do homem modesto
Sem ressentimento, sem protesto
Só a consciência pura de um cientista que raciocina e sabe amar.*

Márcio Lorencini

Dedico este trabalho aos meus pais, que me apoiaram e incentivaram sempre.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pela perseverança nos momentos que exigiram mais força e dedicação.

Agradeço à minha família, pelo incentivo sempre presente em todos os momentos de minha vida. Ao apoio gigantesco de minha mãe e à educação sempre firme de meu pai, pessoas que batalharam muito para me ajudar a abrir todas as portas. Ao companheirismo de minha irmã, que sempre brigou para me defender embora sempre brigasse comigo! Ao meu sobrinho Lucas, que surgiu há pouco, mas já conquistou uma parcela merecida de minha afeição.

Agradeço muito à minha grande amiga-orientadora, Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado, sem a qual este trabalho não teria sido realizado. Pela paciência, apoio, incentivo, acolhimento, amizade e força. Por todas as oportunidades que tive nesses quase cinco anos de convivência. Pela vontade de me ver crescer e conquistar o meu espaço e, principalmente, pelos ensinamentos que me acompanharão até o fim de minha vida.

Agradeço ao meu co-orientador, Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho, também responsável pelo desenvolvimento deste trabalho. Pela amizade, oportunidade, puxões-de-orelha, confiança e auxílio. Por ter se tornado mais uma referência de carreira em minha formação.

Agradeço aos demais professores do Instituto de Biologia da UNICAMP, por colaborarem de forma essencial em toda a minha graduação e pós-graduação.

Agradeço aos Profs. participantes de minha banca, Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro e Dr. Gustavo Pompermaier Garlet, pela disposição em colaborar de forma bastante significativa para a conclusão deste trabalho. Pelas sugestões e dedicação dispensada.

Agradeço aos pesquisadores do centro APTA Citrus Sylvio Moreira, particularmente a Dra. Alessandra Alves e ao Prof. Dr. Marcos Antonio Machado, pelo altruísmo e pela oportunidade de realizar alguns testes descritos neste trabalho.

Agradeço à Juliete, minha companheira de dúvidas e indecisões no Mestrado. Pela amizade que construímos e pelos conhecimentos que adquirimos juntos. Pela disposição em me apoiar nas horas de dificuldade no laboratório e pelas risadas merecidas.

Agradeço às minhas estagiárias Clarissa e Érica, por terem participado comigo e colaborado na execução deste projeto. Por confiarem em mim e por me permitirem invadir um pouco de suas formações. Por terem sido grandes companheiras.

Agradeço ao José Raimundo e ao Luís Peroni pelo apoio desde o início de minha carreira científica, pela amizade e pela força. Pela paciência com o estagiário chato, pelas inúmeras dúvidas sanadas, pelos conselhos, pelas broncas e pela diversão.

Agradeço aos demais companheiros de laboratório (Cris, Marcel, Téo, Helene, Alexandre, Taize, Eliane, Manuel, Silvia, Fabiana, Helô, Esdras, Sheila) pela força, confiança e pelos momentos de descontração.

Agradeço àqueles que se preocuparam comigo e me apoiaram quando precisei, pela confiança e animação. À Taís e Priscilla, minhas quase irmãs que sempre me escutaram nos momentos de desabafo, que exigiam copos d'água, que gargalhavam com vontade e que curtiam me ver feliz. À Bárbara, por ser minha grande amiga e me ajudar em muitas coisas, desde conversas de bar até a elaboração de ensaios desta tese. Ao Túlio, um ótimo companheiro de quarto, pela paciência nos momentos de mau-humor, pelas risadas e pelo exemplo de dedicação e inteligência. Ao Clau, pela disposição de me aturar sempre, pela ajuda com as “dúvidas biológicas e estatísticas” e pelo companheirismo. À Paula, Robertinha, Lissioswalda, Shushana e outros amigos de graduação, pela disposição e paciência, além das inúmeras horas de divertimento. Aos companheiros de casa: Déa, Prizinha, Plínio, Jaú e Gabi, pela diversão de estarmos juntos, pelos jantares e momentos de discussão.

Agradeço aos meus companheiros de trabalho na empresa, particularmente à Sandra, Marcela, Fabíola (ou Kélen) e Jean, pela força para que conseguisse terminar bem meu Mestrado. Pela paciência e pelos novos ensinamentos. Pela oportunidade de crescer um pouco mais, conhecendo a outra face da pesquisa.

Agradeço à minha namorada Raquel, pela presença indispensável depois que nos conhecemos. Pelo apoio, pela imensa paciência, amizade, cumplicidade, carinho e dedicação. Pelo esforço em me ajudar na construção de meus objetivos pessoais.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo financiamento do projeto através de uma bolsa de auxílio de custos, sem a qual este trabalho definitivamente não poderia ser realizado.

Agradeço a todos por terem adquirido um significado em minha vida e por me fazerem ver uma ciência mais humana e criativa, que se destaca com a força do conhecimento e a consistência da amizade.

Índice

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Caracterização da doença periodontal	1
1.2. O papel da placa bacteriana	4
1.3. Modulação da resposta inflamatória e degradação de matriz extracelular	6
1.4. Atuação das metaloproteinases de matriz e seus inibidores	9
1.5. O gene RECK	12
1.6. Importância da regulação de MMPs na doença periodontal	13
2. OBJETIVO	15
3. CAPÍTULO 1	16
4. CAPÍTULO 2	36
5. CONCLUSÕES GERAIS	64
6. REFERÊNCIAS	66

RESUMO

A doença periodontal é a patologia crônica de maior incidência na dentição humana. A placa bacteriana é seu agente etiológico principal, embora uma resposta imune exacerbada seja apontada como fator preponderante para o agravamento das lesões. Já nos primeiros estágios da doença é possível notar uma grande degradação da matriz extracelular local, principalmente de fibras colágenas. Dessa forma, o envolvimento das metaloproteinases de matriz (MMPs), uma família de enzimas com atividade dependente de íons metálicos que degradam proteínas estruturais da matriz extracelular, tem sido amplamente estudado nesta patologia. Baseado nestas evidências, o objetivo deste projeto foi caracterizar as principais modificações teciduais associadas ao modelo de doença periodontal induzida em ratos com ligaduras durante três, cinco ou sete dias. Foi analisada a microbiota associada à progressão inicial da doença, a disposição de fibras colagênicas e reticulares no tecido gengival e o perfil de células inflamatórias migrantes. Também foi avaliada a expressão e atividade enzimática de MMP-2 e -9, além da expressão gênica de MMP-2, -7, -9 e -14, e do inibidor RECK. A indução da doença com ligaduras permitiu a formação de placa bacteriana caracterizada pela substituição de microorganismos Gram-positivos por Gram-negativos. O tecido gengival apresentou uma diminuição na área ocupada por fibras colagênicas, com a deposição de fibras mais espessas, características de um processo inicial de fibrose, aos sete dias de indução da resposta inflamatória. Não foram observadas alterações na disposição de fibras reticulares próximas à membrana basal do epitélio. Aos três e cinco dias de inflamação, respectivamente, foram observados picos de migração de neutrófilos e macrófagos. A MMP-2 apresentou um aumento crescente na atividade enzimática e expressão gênica até os sete dias de inflamação induzida, com a marcação de células epiteliais e fibroblastos na imunohistoquímica. A MMP-9 apresentou um pico na atividade enzimática aos três dias e um pico na expressão gênica aos cinco dias de inflamação, com a marcação imunohistoquímica de células epiteliais, fibroblastos e células inflamatórias migrantes para o sítio gengival. As MMPs-7 e -14, assim como o inibidor RECK, não apresentaram mudanças significativas em suas expressões gênicas. Os amplificadores derivados de RT-PCR para MMP-7 apresentaram um fragmento correspondente a um íntron, indicando um possível mecanismo de regulação relacionado ao processamento do RNA mensageiro. Podemos concluir que o modelo

de doença periodontal induzida por ligadura em ratos apresentou uma dinâmica bastante similar aos resultados já descritos para a evolução da doença no homem. A degradação de matriz extracelular observada foi coerente com o aumento na expressão e atividade enzimática de MMP-2 e -9, sugerindo que estas enzimas estejam relacionadas a este processo. Os resultados obtidos para a MMP-2 sugerem uma produção vinculada predominantemente a células próprias do tecido afetado pelo processo inflamatório. A MMP-9, no entanto, parece ter um aumento diretamente relacionado com a chegada de células inflamatórias no sítio gengival. Nossos estudos foram realizados com o intuito de elucidar os mecanismos moleculares da doença periodontal, buscando encontrar caminhos para o desenvolvimento de aplicações de potencial utilização diagnóstica ou terapêutica.

ABSTRACT

Periodontal disease is the major chronic disease affecting the human dentition. Bacterial plaque is its main etiological factor, although an exacerbated immune response is pointed preponderant factor to the aggravation of the lesions. In the early stages of disease there is a great degradation of the local extracellular matrix, mainly of the collagen fibers. That way, the involvement of matrix metalloproteinases (MMPs), a family of enzymes with activity depending on metallic ions that can degrade structural proteins of the extracellular matrix, it has been studied thoroughly in this pathology. Based on these evidences, the aim of this project was to characterize the main tissue modifications associated to the model of periodontal disease induced in rats with ligatures during three, five or seven days. It was analyzed the microbiota associated to the initial development of the disease, the arrangement of collagen and reticulin fibers in the gingival tissue and the migration of inflammatory cells. It was also evaluated the expression and enzymatic activity of MMP-2 and -9, besides the gene expression of MMP-2, -7, -9 and -14, and of the RECK inhibitor. The induction of disease using ligatures allowed the formation of bacterial plaque, characterized by substitution of Gram-positive for Gram-negative microorganisms. The gingival tissue presented a decrease in the area occupied by collagen fibers, with the formation of thicker fibers at seven days on induction of inflammatory response, usually found in fibrosis processes. Alterations were not observed for the organization of reticulin fibers close to the basement membrane of the epithelium. To the three and five days of inflammation, respectively, peaks of neutrophils and macrophages migration were observed. MMP-2 presented an increase in the enzymatic activity and gene expression until the seven days of induced inflammation, with the demarcation of epithelial cells and fibroblasts by immunohistochemistry. MMP-9 presented a peak of enzymatic activity at the third day of inflammation and a peak of gene expression at the fifth day, with the demarcation of epithelial cells, fibroblasts and migrating inflammatory cells to the gingival area. MMP-7 and -14, as well as the inhibitor RECK, did not present significant changes in their gene expressions. The amplified from RT-PCR for MMP-7 presented a fragment corresponding to an intron, indicating a possible regulation mechanism related to an alternative splicing of mRNA. The degradation of extracellular matrix was coherent with the increased gene expression and enzymatic activity of

MMP-2 and -9, suggesting that these enzymes are related to this process. The results for MMP-2 suggest that its production may be related to the resident cells from gingival tissue. In the other hand MMP-9 may be produced by migrating inflammatory cells. We conclude that this periodontal disease model showed similar dynamics to the human disease described in the literature, and it could be an important tool to understand the molecular events associated with the pathology and to support the development of diagnostic or therapeutic applications.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Caracterização da doença periodontal

A doença periodontal caracteriza um grupo de lesões nos tecidos que rodeiam e suportam os dentes em seus alvéolos, produzindo bolsas entre os dentes e os tecidos de sustentação (TODESCAN, 2001). O termo é bastante abrangente, envolvendo enfermidades que atingem os tecidos gengivais, os tecidos conjuntivos periodontais e o osso alveolar (SOCRANSKY, 1977). A formação das bolsas periodontais promove a perda de adesão entre dentes, periodonto e gengiva, induzindo a reabsorção óssea local, podendo até mesmo resultar em queda dentária (LINDHE, 1999) (**Figura 1**). Com prevalência mundialmente alta, a doença periodontal apresenta grande impacto nos programas de saúde oral. Trata-se de uma enfermidade que afeta de 5 a 30% da população adulta e, de acordo com TAANI (1997), constitui a doença crônica de maior incidência na dentição humana. A prevalência e severidade da doença aumentam com a idade, sendo que, por volta dos 45 anos, 97 a 100% dos indivíduos apresentam alguma forma de doença periodontal (NEWMAN *et al.*, 1978).

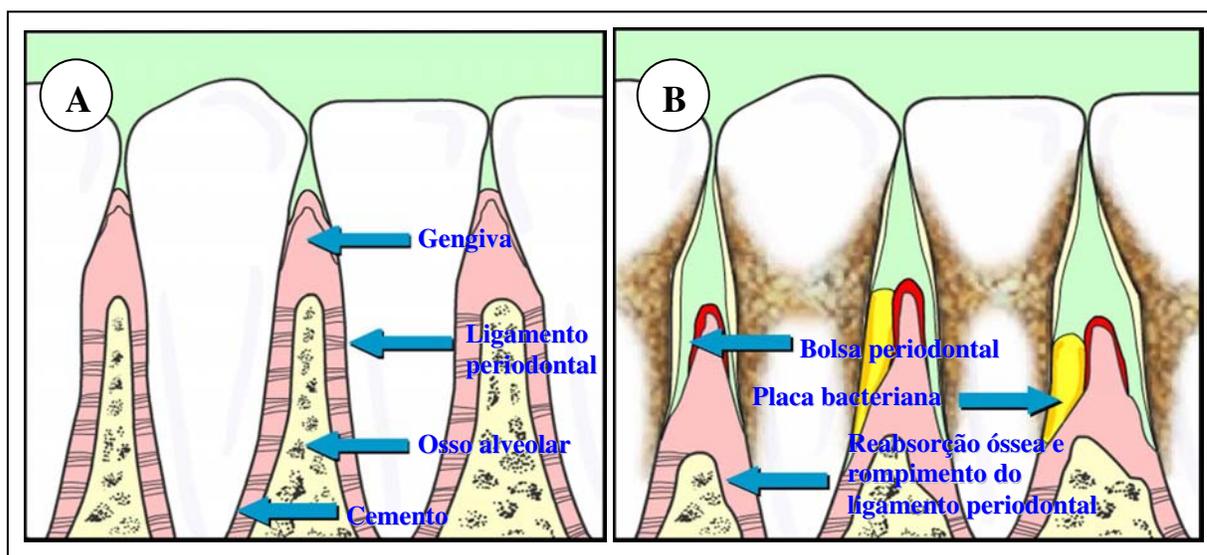


Figura 1. Diferenças entre perfil oral saudável e afetado pela doença periodontal. (A) Principais tecidos do periodonto e gengiva. (B) Modificações associadas ao desenvolvimento da doença periodontal. Adaptado de “http://www.arestin.com/shared_graphics/tooth_crosssec.gif”.

Atualmente, a placa bacteriana é considerada o agente etiológico principal da patologia, embora sua evolução não esteja relacionada apenas com a colonização da cavidade oral por microrganismos patogênicos. Outros fatores, como uma resposta imune exacerbada do paciente, contribuem para o agravamento das lesões. O acúmulo de células inflamatórias, como macrófagos e polimorfonucleares, além de linfócitos (principalmente linfócitos B) pode promover a degradação dos tecidos periodontais, formação de granulomas e cronificação da doença (MIYASAKI, 1991; COLEMAN, 2001; LAPPIN *et al.*, 2001).

A partir da década de 90, a doença periodontal passou a ser apontada como decorrente da junção de alguns elementos, entre eles a predisposição do paciente (falta de higiene oral, idade, componentes genéticos, alterações do sistema imunológico, alterações nos níveis hormonais e fatores como tabaco e diabetes) e a ação da microbiota oral (patogenicidade dos microrganismos como características específicas de adesão) (MICHALOWICZ, 1994; BASCONES-MARTÍNEZ & FIGUERO-RUIZ, 2004). Tais fatores podem afetar o metabolismo dos tecidos periodontais, alterando a função leucocitária ou a produção e a atuação dos anticorpos, o que pode resultar em um periodonto mais ou menos susceptível. Uma vez que a placa bacteriana se forma, muitas toxinas são liberadas, provocando uma reação inflamatória em cadeia, cujos produtos podem desencadear um conjunto de alterações teciduais, agrupadas em até quatro estágios, de acordo com PAGE & SCHROEDER (1976, 1982):

- *lesão inicial*: dilatação e aumento da permeabilidade vascular;
- *lesão precoce*: presença de um infiltrado inflamatório rico em linfócitos na região adjacente ao epitélio juncional (na união da gengiva ao dente) e destruição da rede de fibras colágenas;
- *lesão estabelecida*: plasmócitos predominantes no infiltrado inflamatório, com maior destruição de colágeno e uma proliferação do epitélio juncional na região do sulco gengival (entre o dente e a gengiva);
- *lesão avançada*: inclui todas as características da lesão estabelecida, com deslocamento do epitélio juncional, formação de bolsa e reabsorção óssea.

A expressão dos diferentes quadros de doença periodontal depende diretamente da interação entre fatores do hospedeiro, ambientais e dos agentes microbianos. Tais fatores podem afetar o metabolismo dos tecidos periodontais, alterando a função leucocitária ou a produção e a atuação dos anticorpos, o que pode resultar em um periodonto mais ou menos susceptível.

Fatores genéticos e um ambiente favorável podem determinar a susceptibilidade do indivíduo, a severidade do quadro clínico, a taxa de progressão da doença, a taxa de recuperação e o nível de resposta a terapias (TROMBELLI & TATAKIS, 2003). Algumas evidências de estudos epidemiológicos apontam para a importância de fatores genéticos na susceptibilidade ou resistência do paciente, incluindo o elevado índice de concordância em gêmeos monozigóticos e a associação com polimorfismos gênicos (KORNMAN *et al.*, 1997; MEISEL *et al.*, 2000; MICHALOWICZ *et al.*, 2000; BAKER & ROOPENIAN, 2002). No entanto, alguns fatores ambientais têm uma importância bastante significativa para o desenvolvimento da patologia, como o fumo, por exemplo, que tem sido indicado como um fator de prevalência e severidade para a doença periodontal (ARNO *et al.*, 1958; BERGSTROM, 1989; HABER *et al.*, 1993; STOLTENBERG *et al.*, 1993; GROSSI *et al.*, 1995; HEASMAN, 2006).

Com relação à avaliação clínica dos pacientes, a classificação das doenças periodontais é baseada, principalmente, nos tecidos afetados. Dentre as inúmeras subdivisões existentes, vale destacar a principal delas que inclui dois grandes módulos: a gengivite e a periodontite.

A gengivite caracteriza-se pelas modificações que afetam a gengiva e representa, de acordo com diversos autores, os primeiros estágios do desenvolvimento da doença periodontal. As primeiras manifestações desta inflamação gengival são alterações vasculares que consistem essencialmente na dilatação dos capilares e aumento do fluxo sanguíneo. A intensidade dos sinais e sintomas clínicos varia entre indivíduos ou mesmo entre sítios de uma mesma denteição. Dentre os principais sinais clínicos característicos da gengivite estão o sangramento e o aumento da sensibilidade das gengivas, além da perda de adesão entre o epitélio juncional e o dente, a formação de edemas e o surgimento de fibrose (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 1999). Quando não tratado adequadamente, um quadro de gengivite potencialmente pode resultar em periodontite, acometendo outros tecidos do periodonto, como osso alveolar e ligamento periodontal. Em muitos casos, a formação e o aumento da profundidade das bolsas periodontais acompanham o desenvolvimento da doença periodontal (BASCONES-MARTÍNEZ & FIGUERO-RUIZ, 2004). De qualquer forma, gengivite e periodontite induzidas por placa são certamente as mais frequentes de todas as formas de doença periodontal (LISTGARTEN, 1986; SIGUSCH *et al.*, 2001).

1.2. O papel da placa bacteriana

O envolvimento de microrganismos na etiologia, instalação e progressão da doença periodontal encontra-se bem estabelecido, sendo que desde a década de 1960, alguns estudos já indicavam a relevância da placa bacteriana para o início do desenvolvimento da patologia. (LÖE *et al.*, 1965; SLOTS, 1977; SOCRANSKY *et al.*, 1988; DAHLEN *et al.*, 1992; XIMENEZ-FYVIE *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2001). Neste aspecto, vale ressaltar o trabalho de LÖE e colaboradores (1965), que destacou a associação entre a gengivite experimental e o acúmulo de placa bacteriana durante os 21 dias de experimento. Entretanto, uma completa identificação de todos os agentes microbianos envolvidos com a doença periodontal ainda não está totalmente definida. Estima-se que aproximadamente 500 espécies diferentes de bactérias normalmente habitem a cavidade oral do homem, sendo a maioria comensais e uma pequena porção de patógenos oportunistas (MOORE & MOORE, 1994; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1994; PASTER *et al.*, 2001).

Segundo BLACK (2002), a placa é uma camada de microrganismos e matéria orgânica (dextrana, proteínas da saliva e minerais) que se forma continuamente na superfície dos dentes, iniciada pela adesão de proteínas ao esmalte. Ao se permitir o acúmulo da placa, pode haver o desenvolvimento excessivo de bactérias potencialmente virulentas, iniciando-se o processo de agressão ao hospedeiro. Em condições normais, as bactérias orais são predominantemente Gram-positivas aeróbias facultativas, como *Actinomyces viscosus* e *Streptococcus sanguis*, e capazes de formar comunidades em diferentes superfícies como o esmalte, cimento e células epiteliais, constituindo os chamados biofilmes (KOLENBRANDER, 2000). Esta adesão pode ocorrer, por exemplo, através de adesinas que interagem com receptores específicos na película dental. Além disso, outros mecanismos podem determinar a seletividade na colonização da película, como no caso das fímbrias, que auxiliam na aderência inicial de *Actinobacillus viscosus* (CARDOSO & GONÇALVES, 2002).

De uma maneira geral, os primeiros colonizadores do biofilme são capazes de suportar altas concentrações de oxigênio e resistir a vários mecanismos de remoção da cavidade oral como deglutição, mastigação, salivação, fluxo nasal e fluxo crevicular. Sua replicação permite a adesão de espécies bacterianas chamadas de colonizadores secundários, capazes de se ligar aos microrganismos anteriormente presentes. Nesta sucessão ecológica da placa bacteriana ocorre

uma transição do meio ambiente aeróbio, inicialmente caracterizado pela fixação de espécies Gram-positivas anaeróbias facultativas, para um meio altamente privado de oxigênio, com a predominância de microrganismos Gram-negativos anaeróbios (LISTGARTEN, 1986; SIGUSCH *et al.*, 2001). Com o aumento do número de camadas das placas de microrganismos, são criados gradientes atmosféricos e nutricionais, diminuindo o nível de oxigênio e criando as condições necessárias à sobrevivência dos microrganismos anaeróbios (SBORDONE & BORTOLAIA, 2003). Dentre as principais espécies de bactérias associadas à doença periodontal, é possível destacar algumas que costumam ser encontradas com maior frequência, tais como *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus* e *Fusobacterium nucleatum* (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1992).

Em 1988, SOCRANSKY e colaboradores relataram que as interações microbianas são importantes em diferentes condições periodontais, resultando em um estado saudável ou patológico. A composição da placa bacteriana pode permanecer estável devido a uma variedade de interações entre as espécies constituintes sem provocar danos aos tecidos periodontais (MARSH, 1994). Os fatores de virulência da placa bacteriana dependem da presença ou aumento de microrganismos específicos, capazes de produzir substâncias que levam à destruição dos tecidos do hospedeiro (LOESCHE & SYED, 1978). Além disso, na porção interna das bolsas periodontais, a localização ou distribuição dos patógenos pode variar de forma bastante significativa. NOIRI e colegas (2001), utilizando técnicas de imunohistoquímica, relataram a presença de diferentes espécies bacterianas em cada uma das regiões da bolsa. Foi encontrado, por exemplo, uma prevalência de *Prevotella nigrescens* aderida ao tecido epitelial na porção média da bolsa, *Fusobacterium nucleatum* e *Treponema denticola* em áreas de placa não aderida nas porções apical e mediana da bolsa, *Eikenella corrodens* em áreas de placa aderida ao dente nas porções apical e mediana da bolsa e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em áreas de placa não aderida na porção mediana da bolsa.

No entanto, apesar de necessária, apenas a microbiota bacteriana não é suficiente para que a doença periodontal ocorra. Alguns estudos indicam que a presença de uma placa bacteriana formada por microrganismos potencialmente patogênicos só pode provocar a enfermidade em hospedeiros susceptíveis. Deste modo, embora a presença de patógenos no periodonto seja um pré-requisito, a progressão da doença é dependente da resposta do hospedeiro aos microrganismos presentes no biofilme bacteriano. Em estado de plena saúde, há um equilíbrio

entre a virulência das bactérias e a resistência do hospedeiro. Quando esse equilíbrio é quebrado, por algum motivo como o aumento do potencial patogênico das bactérias ou a diminuição nas defesas do hospedeiro, surge então a patologia (TROMBELLI & TATAKIS, 2003).

O acúmulo da placa na superfície dental adjacente aos tecidos gengivais promove o contato das células do epitélio do sulco e do epitélio juncional com os produtos metabólicos, enzimas e os fatores de colonização das bactérias (LINDHE, 1999). Ao atuar sobre o tecido conjuntivo, as bactérias provocam reações inflamatórias no hospedeiro, traduzidas pelo acúmulo de células associado à ativação de processos de destruição periodontal. Alguns trabalhos sugerem que a progressão da doença se caracteriza por diferentes fases de repouso e destruição tecidual. Estes episódios de destruição, normalmente, surgem junto a mudanças na população de células do infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo local (GAMONAL *et al.*, 1999).

1.3. Modulação da resposta inflamatória e degradação de matriz extracelular

A resposta inflamatória tradicionalmente é conhecida como uma reação complexa contra agentes agressivos ao hospedeiro (micróbios ou células danificadas) que consiste da junção de mudanças vasculares, migração e ativação de leucócitos e mecanismos sistêmicos. Por definição, os processos inflamatórios envolvem etapas simultâneas de destruição e reparo. Portanto, embora seja tida como uma resposta fundamentalmente protetora, a inflamação pode também ser considerada como potencialmente deletéria. A resposta inflamatória se inicia com uma fase aguda, caracterizada como um processo rápido e relativamente curto de extravasamento de fluidos e migração de leucócitos (principalmente neutrófilos). Com a persistência da resposta e/ou dos agentes infecciosos, pode ocorrer a evolução para uma fase crônica que se estende por um longo período, associada com a infiltração de macrófagos e linfócitos, proliferação de vasos e fibrose (KANTARCI & VAN DYKE, 2005).

Nas doenças periodontais, um quadro tipicamente inflamatório se desenvolve. Já no início da inflamação, modificações quantitativas e qualitativas acometem os tecidos periodontais, especialmente a gengiva. No tecido gengival, as alterações já se destacam na primeira semana de progressão da doença, com grandes mudanças na matriz extracelular local. Com o passar do tempo e a permanência dos agentes infecciosos ou a manutenção de mediadores inflamatórios

secretados, os demais tecidos que compõem o periodonto também são afetados, com degradação de diversos componentes estruturais da matriz periodontal e que pode, portanto, promover grande perda de adesão dentária. Ao atingir os tecidos do periodonto, os leucócitos recrutados da corrente sanguínea juntamente com variados tipos celulares locais iniciam um processo de ativação que culmina com a secreção de diversas substâncias. Uma vez secretadas, estas substâncias remodelam a matriz extracelular local, permitindo a chegada de novas células capazes de eliminar os microorganismos componentes da placa bacteriana e extinguir o foco infeccioso. No entanto, como muitas vezes o agente infeccioso não é eliminado pela simples ativação da resposta, o processo inflamatório persiste e adquire características danosas ao hospedeiro (KANTARCI & VAN DYKE, 2005; BARTOLD & NARAYANAN, 2006). Algumas das bactérias consideradas importantes periodontopatógenos possuem, ainda, mecanismos que impedem a elaboração de uma resposta imunológica eficiente para a eliminação da placa bacteriana, levando a uma cronificação do perfil inflamatório desencadeado. No caso de *Porphyromonas gingivalis*, podemos destacar, dentre seus principais métodos evasivos, os seguintes:

- inibição da quimiotaxia de polimorfonucleares (MADIANOS *et al.*, 1997);
- inibição da expressão de IL-8 e ICAM-1 em células endoteliais (MADIANOS *et al.*, 1997);
- clivagem proteolítica de TNF- α (MEZYK-KOPEC *et al.*, 2005);
- diminuição de respostas imunológicas celulares (Th1) (YUN *et al.*, 2002);
- diminuição da expressão de moléculas co-estimulatórias em monócitos e células dendríticas (COHEN *et al.*, 2004).

Todos estes indícios levam a crer que, particularmente para *Porphyromonas gingivalis*, ocorre um desvio da rede de citocinas do hospedeiro, incapacitando-o de gerar uma resposta imunológica eficiente para a eliminação desta bactéria (FENG & WEINBERG, 2006). Ainda, mecanismos distintos podem ser encontrados em outras espécies de microorganismos para escapar da resposta imune. Um exemplo disso é a secreção de toxinas capazes de eliminar determinadas células imunológicas, como a leucotoxina-A secretada por *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, que promove a morte de monócitos através da ativação da caspase-1, ou a toxina “cytolethal distending” também produzida por *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (além de outras bactérias Gram-negativas), que induz apoptose em linfócitos T através da

ativação das caspases-2 e -7 (HENDERSON *et al.*, 2003; KELK *et al.*, 2003; OHARA *et al.*, 2004).

De acordo com NISHIHARA e KOSEKI (2004) uma das habilidades mais destacadas dos periodontopatógenos se refere exatamente à sua capacidade de destruir a organização da resposta imune, tornando o hospedeiro mais susceptível. Em consequência disso, já nos primeiros estágios das lesões periodontais é possível notar a ocorrência de alterações teciduais acentuadas, caracterizadas pelo elevado grau de destruição de fibras da matriz. Particularmente, a degradação das fibras colágenas tem sido amplamente divulgada em uma série de artigos científicos (PAGE & SCHROEDER, 1976; LISTGARTEN, 1986; SEGUIER *et al.*, 2000 e 2001; LIU *et al.*, 2001; EJEIL *et al.*, 2003).

Conforme já foi destacado, a degradação da matriz extracelular na doença periodontal decorre da liberação desbalanceada de uma série de substâncias, como quimiocinas e proteases, além de seus ativadores e inibidores, pelas próprias células residentes nas proximidades da infecção ou por células inflamatórias recrutadas para o local. De acordo com GRAVES & COCHRAN (2003), uma vez que o nível crítico da produção de citocinas pró-inflamatórias é atingido, uma resposta fisiológica pode se tornar patológica. Nessa revisão, os autores também destacam o aumento na produção de IL-1 e do TNF- α na destruição dos tecidos periodontais, salientando que ambos possuem um papel fundamental no desenvolvimento da doença, seja pela estimulação da apoptose de células produtoras da matriz extracelular ou pela indução da expressão de enzimas líticas.

Inúmeros trabalhos têm demonstrado a relação entre a progressão da doença periodontal e a expressão de citocinas nos sítios de inflamação, como as características da resposta imunológica celular (Th1), responsável pelos sinais de inflamação, recrutamento de polimorfonucleares, de células da linhagem macrofágica e de linfócitos citotóxicos, como IL-1, IFN- γ e TNF- α . As citocinas IL-1 e TNF- α , consideradas pró-inflamatórias, produzem efeitos pleiotrópicos, como a ativação de leucócitos inflamatórios, aumento da permeabilidade celular e indução da reabsorção óssea (GEIVELIS *et al.*, 1993; REINHARDT *et al.*, 1993; TSAI *et al.*, 1995; TOKORO *et al.*, 1996; HIROSE *et al.*, 1997). Já IFN- γ ativa macrófagos, que produzem mais citocinas pró-inflamatórias e realizam suas funções microbidas (UKAI *et al.*, 2001). Entretanto, estudos como o de LAPPIN e colaboradores (2001) comprovaram a expressão de mediadores da via humoral da resposta imune (Th2), sendo as células envolvidas nesta resposta

muito mais abundantes nas lesões periodontais. As citocinas IL-4, IL-5 e IL-6, por exemplo, estão envolvidas na ativação e proliferação de linfócitos B e, em última análise, na produção de IgG e IgA específicas aos microorganismos que causam a infecção. A IL-4 também é capaz de suprimir as funções fagocíticas dos macrófagos, demonstrando uma relação regulatória entre as respostas imunológicas celular e humoral (UKAI *et al.*, 2001).

Além disso, as células fagocitárias também são capazes de aumentar a expressão de enzimas produtoras de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, como o óxido nítrico (NO), amplamente citado como uma molécula de importância vital em inúmeros processos inflamatórios. A produção de NO associada à atuação de determinadas enzimas líticas está envolvida com a inativação de inibidores de proteínases, como o inibidor α_1 -proteínase, (OWEN & CAMPBELL, 1995). Dessa forma, muito embora o periodonto possua uma considerável capacidade de reparo, o desencadeamento de uma resposta imunológica desbalanceada atua como o principal elemento indutor da doença periodontal, degradando a matriz extracelular dos tecidos locais, suas células mantenedoras e moléculas de controle da inflamação iniciada.

1.4. Atuação das metaloproteinases de matriz e seus inibidores

De acordo com VAN DER ZEE e colaboradores (1997), a degradação de colágeno pode ocorrer por meio de duas vias que se diferenciam de acordo com as condições existentes no local. Uma via intracelular é ativada em condições fisiológicas, com a fagocitose de fibras colágenas e sua degradação no interior celular. O segundo mecanismo envolve a liberação e ativação de enzimas no meio extracelular, normalmente em condições patológicas. Nesse contexto, as endopeptidases são consideradas essenciais para os processos de degradação tecidual. Dentre elas, a família de enzimas denominadas metaloproteinases de matriz (MMPs) merece destaque, sendo caracterizada por uma ativação dependente de íons metálicos, normalmente zinco ou cálcio, e pela capacidade de degradação de proteínas estruturais da matriz extracelular (colágeno, elastina, laminina, fibronectina e proteoglicanos). As MMPs também são capazes de clivar moléculas dispostas na superfície das células, podendo regular o comportamento celular e influenciar, ainda, uma série de processos fisiológicos e patológicos, incluindo aspectos do desenvolvimento embrionário, morfogênese de tecidos, cicatrização de

feridas, doenças inflamatórias e câncer (PARKS & MECHAM, 1998; STERNLICHT & WERB, 2001).

De acordo com STERNLICHT e WERB (2001), as MMPs constituem uma família de enzimas identificadas em diversas espécies, encontradas desde organismos como as hidras até os seres humanos. No momento, pelo menos vinte e cinco MMPs foram descritas no grupo dos vertebrados, sendo estas divididas em cinco categorias principais, de acordo com a estrutura de seu domínio modular e sua conseqüente forma de atuação sobre substratos específicos:

- *colagenases*: MMP-1, -8, -13 e -18;
- *gelatinases*: MMP-2 e -9;
- *stromelisinases*: MMP-3, -10 e -11;
- *MMPs de membrana*: MMP-14, -15, -16, -17, -24 e -25;
- *MMPs que não se enquadram nos grupos anteriores*: MMP-7, -12, -19, -20, -21, -22, -23, -26, -27 e -28.

Para atuarem, as MMPs precisam ser ativadas apropriadamente em local e momento específicos. Assim, seu funcionamento é rigorosamente regulado, seja nos níveis transcricional, pós-transcricional ou protéico, com a participação de ativadores e inibidores (**Figura 2**). Devido à grande sobreposição das especificidades de MMPs por diferentes substratos, costuma-se assumir que a função biológica de cada uma delas é ditada por padrões de expressão diferencial. De fato, as diferenças na expressão temporal, espacial e induzível de uma MMP são freqüentemente associadas com seu papel diferenciado das demais. A expressão gênica das MMPs costuma ser regulada por numerosos fatores estimulantes ou inibitórios, além de haver indícios de regulação pós-transcricional através da estabilização ou processamento de moléculas de RNA mensageiro. No caso da MMP-13, -17 e -20, por exemplo, existe um mecanismo de poliadenilação alternativa que resulta na formação de múltiplos transcritos diferenciados entre si (ALEXANDER & WERB, 1991; PARKS & MECHAM, 1998; STERNLICHT & WERB, 2001). Embora muitas MMPs sejam secretadas constitutivamente após sua tradução, algumas situações particulares de controle da secreção existem. A liberação de MMP-12 de macrófagos, por exemplo, ocorre apenas em resposta à ativação de proteína quinase C ou frente à estimulação destas células com plasmina e trombina (RAZA *et al.*, 2000; STERNLICHT & WERB, 2001). Normalmente secretadas inativas, na forma de zimógenos, as MMPs precisam ser clivadas por outras proteases, como serina proteinases ou outras MMPs, ou passarem por um auto-

processamento para adquirir uma conformação ativa. Quanto aos seus inibidores, deve-se destacar um grupo de quatro proteínas contendo doze resíduos de cisteína em regiões conservadas, denominados inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Os TIMPs são expressos por uma grande variedade de tipos celulares e estão presentes em muitos tecidos e fluídos corporais. Eles são capazes de formar complexos não-covalentes com as MMPs, ligando-se de forma reversível em regiões altamente conservadas das mesmas, principalmente nos sítios de ligação das enzimas ao seu metal correspondente (GOMEZ *et al.*, 1997). Diferentes TIMPs se distinguem com relação à sua capacidade de se ligar às diferentes MMPs (WOESSNER & NAGASE, 2000).

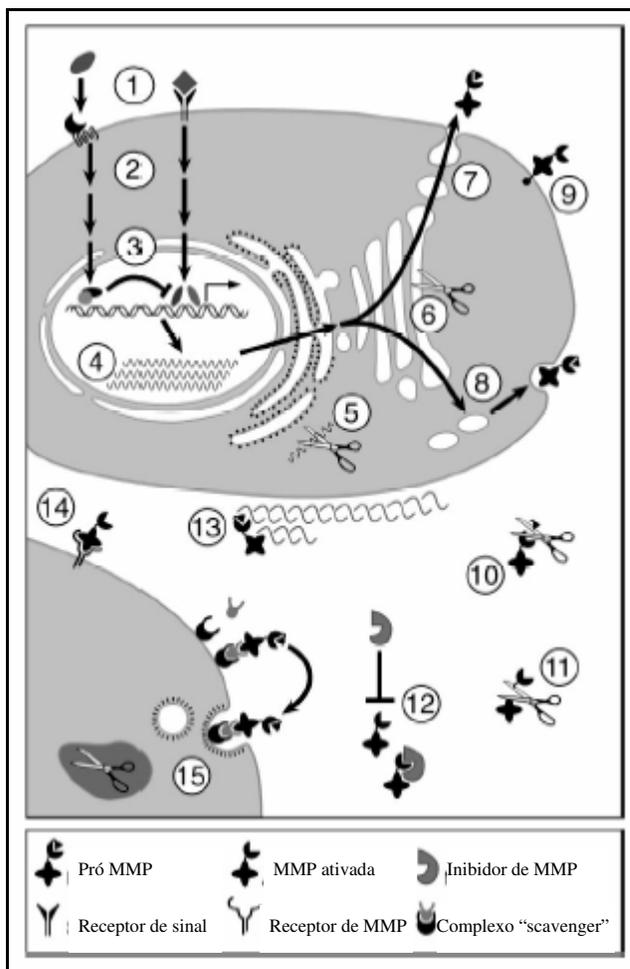


Figura 2. Mecanismos regulatórios das MMPs, que podem incluir: (1) sinais indutores ou repressores a partir do meio extracelular, (2) transdução de sinais intracelulares, (3) ativação ou repressão da expressão gênica, (4) processamento do RNA mensageiro, (5) degradação do RNA mensageiro, (6) ativação intracelular, (7) secreção constitutiva, (8) regulação da secreção, (9) expressão na superfície celular, (10) ativação proteolítica, (11) processamento ou inativação proteolítica, (12) inibição protéica, (13) localização na matriz extracelular, (14) localização na superfície celular e (15) endocitose e degradação intracelular. Adaptado de STERNLICHT e WERB, 2001.

1.5. O gene RECK

Em 1998, TAKAHASHI e colaboradores descreveram um novo inibidor da atividade de MMPs denominado RECK (“Reversion Inducing Cysteine-rich Protein with Kazal Motifs”). Trata-se de uma glicoproteína de 110 kDa, que se encontra normalmente associada à membrana plasmática das células através de uma âncora de glicosilfosfatidil inositol (GPI), e que contém três domínios semelhantes ao inibidor de serina-proteases, sendo o primeiro deles idêntico ao motivo Kazal (C-X₇-C-X₆-Y-X₃-C-X_{2,3}-C). O gene RECK é expresso em vários tecidos e órgãos humanos, mas sua expressão é baixa ou não detectável em diversas linhagens tumorais. Além disso, o RECK pode ser regulado negativamente por alguns oncogenes (como *fos*, *mos*, *myc*, *ras* e *src*) e, quando transfectado, é capaz de reduzir o potencial metastático de determinadas linhagens de fibrosarcoma e melanoma (TAKAHASHI *et al.*, 1998; SASAHARA *et al.*, 1999; WELM *et al.*, 2002). Todas essas evidências, aliadas a estudos que demonstram sua participação como inibidor da ativação de MMPs envolvidas na carcinogênese (como a MMP-2, -9 e -14), podem garantir a definição do gene RECK como um eficiente supressor tumoral (TAKAHASHI *et al.*, 1998; OH *et al.*, 2001; RHEE & COUSSENS, 2002) (**Figura 3**).

A maior diferença entre o RECK e os TIMPs está em suas respectivas localizações: o RECK se localiza na membrana plasmática das células, da mesma forma que algumas MMPs de membrana, enquanto que os TIMPs são secretados. A ancoragem do RECK à membrana plasmática é o que permite que ele atue na regulação eficaz de eventos proteolíticos locais, como o próprio processamento das MMPs (WERB, 1997). Enquanto a deficiência do gene RECK é letal para os embriões de camundongos, a deficiência dos genes de TIMP-1 e TIMP-2 tem pouco efeito durante o desenvolvimento, sugerindo mais uma diferença funcional entre as duas classes de moléculas (NOTHNICK *et al.*, 1997; CATERINA *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2000). Além disso, o fenótipo normal pode ser recuperado em camundongos duplamente mutantes para RECK pode se ocorrer uma mutação de MMP-2. Isso sugere que ambas as moléculas apresentam-se intimamente relacionadas no processo de desenvolvimento embrionário, confirmando a hipótese de que o RECK pode atuar como um elemento inibidor da atividade de MMPs (OH *et al.*, 2001).

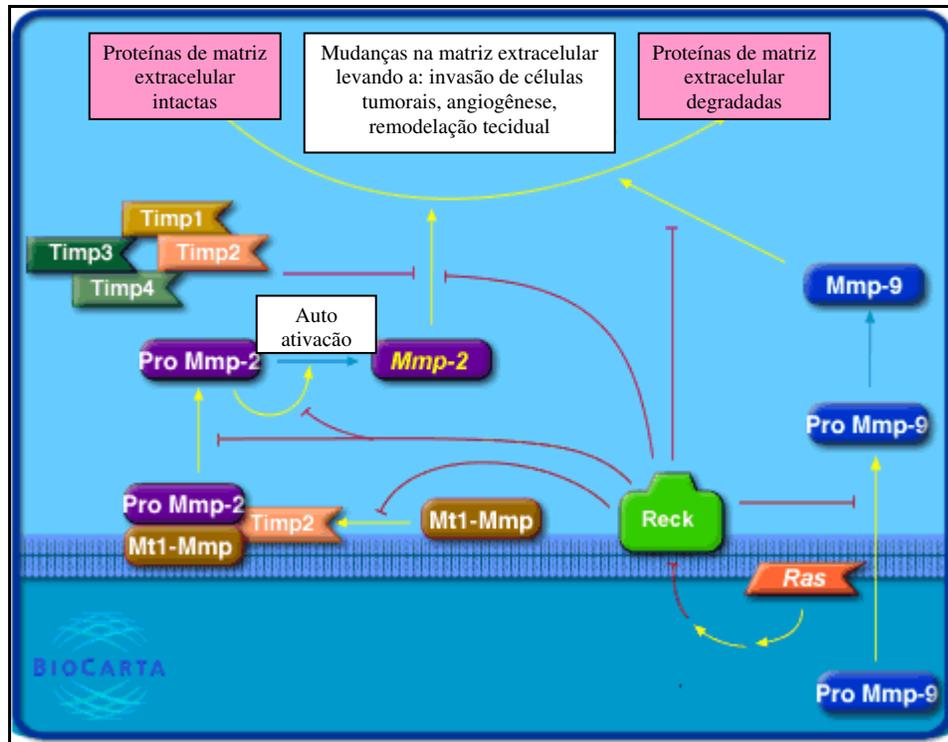


Figura 3. Ação do inibidor RECK sobre a atividade de MMPs. A proteína RECK encontra-se ancorada na membrana plasmática e atua inibindo a atividade de MMP-2, -9 e -14 (aqui destacada como Mt1-Mmp) em diversas etapas da via. Além disso, também é possível observar a ação regulatória do oncogene *ras* sobre RECK, inibindo sua atuação. Adaptado de “http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta/m_reckPathway”.

1.6. Importância da regulação de MMPs na doença periodontal

A presença de enzimas que degradam a matriz extracelular nos tecidos periodontais é estudada desde 1981 (WOLLEY & DAVIES, 1981). Atualmente, muitos estudos têm focado a expressão de MMPs específicas durante o desenvolvimento da doença periodontal, alguns deles também voltados para uma análise comparativa destas com seus respectivos TIMPs. SEGUIER e colaboradores (2001), em concordância com diversos grupos, demonstraram que o desequilíbrio entre MMPs e TIMPs é um dos fatores que lidera a degradação excessiva (ou patológica) da matriz extracelular na enfermidade. Além disso, vários estudos têm confirmado um aumento na expressão de MMPs na doença. MAKELA e colaboradores (1994) e TERVAHARTIALA e

colaboradores (2000), verificaram um aumento na expressão de MMP-2, -8, -9 e -13. Entretanto, muitos resultados permanecem contraditórios ao se comparar tecidos periodontais saudáveis e doentes, principalmente quando existe uma associação da doença com outros fatores agravantes. DAHAN e colaboradores (2001), baseados em uma análise semi-quantitativa da expressão de RNA mensageiro, não encontraram diferenças significativas na expressão dos genes de MMP-2 e -14 entre tecidos afetados ou não pela doença periodontal. KOMATSU e colaboradores (2001), em uma análise semelhante, observaram níveis de expressão aumentados dos genes de MMP-2 e -14 quando tecidos afetados pela doença periodontal foram comparados àqueles não afetados em pacientes com Síndrome de Down.

Pouco ainda é conhecido quanto à expressão localizada das MMPs *in vivo* (DAHAN *et al.*, 2001), embora existam análises da expressão de MMPs por tipos celulares específicos. Recentemente, NAESSE e colaboradores (2003) pesquisaram a expressão de MMPs e TIMPs em mastócitos de pacientes com a doença periodontal associada à presença do HIV (“Human Immunodeficiency Vírus”). Os resultados indicaram que os mastócitos de pacientes com a doença periodontal, somente com o HIV ou com ambos, apresentam uma expressão elevada das MMPs 1 e 8 e uma expressão reduzida de TIMP-2.

Dessa forma, considerando que a expressão diferencial de proteinases e seus inibidores possa servir como um marcador diagnóstico eficiente (KINANE, 1992) e levando-se em conta a falta de modelos experimentais associados às lesões desenvolvidas na doença periodontal (TODESCAN, 2001), novos estudos na área são de extrema importância para auxiliar na elucidação dessa patologia que, atualmente, representa a maior causa da perda de dentes em adultos e uma das mais frequentes doenças humanas (LINDHE, 1999). Além disso, ainda não foram realizados estudos sobre a expressão do gene RECK, um importante regulador da remodelagem da matriz extracelular (NODA, 2003) na progressão da doença periodontal em comparação com a expressão das MMPs por ele reguladas.

Por meio de caracterizações qualitativas e quantitativas da expressão das MMPs e do gene RECK, será possível encontrar fatores importantes relacionados à progressão e às vias de regulação da doença periodontal. A utilização de um modelo animal pode permitir a elucidação dos mecanismos moleculares que medeiam a patologia desenvolvida, buscando esclarecer processos biológicos e encontrar ferramentas de potencial utilização diagnóstica e/ou terapêutica.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as modificações na microbiota associada à placa bacteriana e alterações teciduais associadas ao desenvolvimento inicial da doença periodontal no modelo de doença induzida em ratos por ligadura de dentes. As análises referentes às modificações teciduais foram concentradas na gengiva, o primeiro tecido afetado pela doença periodontal, e basearam-se na avaliação de:

- variações na microbiota associada placa bacteriana;
- modificações morfológicas (análise de fibras reticulares próximas à membrana basal do epitélio, análise de área ocupada por fibras colagênicas, espessura das fibras colagênicas);
- perfil de células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos);
- padrão de atividade enzimática de MMP-2 e -9;
- imunolocalização de MMP-2 e -9;
- padrão de expressão gênica das MMP-2, -7, -9 e -14, e do inibidor RECK.

3. CAPÍTULO 1

Título do artigo:

Alterações iniciais no modelo de doença periodontal: dinâmica da microbiota e principais modificações teciduais.

Autores:

Márcio Lorencini¹, Juliete Aparecida Francisco da Silva¹, Clarissa Argentin Almeida¹,
Hernandes F. Carvalho² e Dagmar Ruth Stach-Machado¹.

Instituições envolvidas:

1. Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biologia – UNICAMP – Campinas – SP – Brasil
2. Departamento de Biologia Celular – Instituto de Biologia – UNICAMP – Campinas – SP – Brasil

Resumo

A doença periodontal é a patologia de maior incidência na dentição humana, afetando os tecidos do periodonto e provocando a perda de adesão dos dentes. A placa bacteriana é considerada seu agente etiológico principal, embora a evolução da doença esteja associada à progressão da resposta imunológica do hospedeiro. O primeiro tecido afetado com o surgimento da doença periodontal é a gengiva. No entanto, existem algumas dificuldades para estudar o avanço inicial da patologia devido à ausência de modelos que mimetizem eficientemente os estudos em humanos. Esse trabalho caracterizou a dinâmica da microbiota e as principais modificações teciduais associadas ao desenvolvimento inicial da doença periodontal em um modelo de ratos com ligaduras. Neste modelo encontramos as principais características observadas na doença periodontal humana, dentre elas a formação de uma placa bacteriana caracterizada pela substituição dos microrganismos Gram-positivos por Gram-negativos e a intensa remodelação das fibras de colágeno presentes na matriz extracelular.

Introdução

A doença periodontal caracteriza um grupo de lesões nos tecidos que rodeiam e suportam os dentes (TODESCAN, 2001). Trata-se de um termo bastante amplo, envolvendo enfermidades no tecido gengival, nos tecidos conjuntivos periodontais e no osso alveolar (SOCRANSKY, 1977). É classificada como a doença crônica de maior incidência na dentição humana e chega a afetar uma enorme parcela da população mundial (TAANI, 1997).

De uma forma abrangente, as doenças periodontais podem ser divididas em dois grupos principais: as gengivites e as periodontites. As gengivites surgem como uma inflamação típica com sintomas de dor, vermelhidão, inchaço e sangramento das gengivas. As periodontites, por sua vez, costumam decorrer do agravamento das condições não tratadas da gengivite, com o comprometimento de tecidos mais profundos (LISTGARTEN, 1986).

Atualmente, a placa bacteriana é considerada o agente etiológico principal da doença periodontal. Em condições normais, ela se deposita continuamente na superfície dos dentes, compondo um biofilme bacteriano de espécies e condições de cobertura características (BLACK,

2002; MADIANOS *et al.*, 2005). Como uma verdadeira comunidade, os microrganismos da placa possuem grande habilidade de auto-organização e resistência a perturbações ambientais (KOLENBRANDER, 2000). Quando não removida periodicamente, a placa pode agregar bactérias Gram-negativas anaeróbicas de grande patogenicidade, levando ao início de uma resposta inflamatória no periodonto (LISTGARTEN, 1986; SIGUSCH *et al.*, 2001).

Mas a evolução da doença periodontal não está relacionada apenas com a colonização da cavidade oral por microrganismos patogênicos. Inicialmente, a infecção por agentes microbianos resulta na disponibilização de elementos que podem causar destruição direta do periodonto. No entanto, outros fatores, como uma resposta imune exacerbada do hospedeiro, contribuem para o agravamento das lesões. O acúmulo de células inflamatórias pode promover a degradação dos tecidos periodontais, formação de granulomas e cronificação da doença. Uma vez iniciada a resposta inflamatória, diversas alterações acometem a arquitetura tecidual local, desencadeando um comprometimento acentuado de diversos componentes da matriz extracelular (COLEMAN, 2001; LAPPIN *et al.*, 2001).

Considerando o grande impacto desta enfermidade na saúde humana e levando em conta a caracterização pouco explorada de modelos animais para representá-la, este trabalho foi desenvolvido com o intuito de caracterizar o início da doença periodontal empregando o modelo de ligaduras dentais em ratos, por meio da análise da dinâmica populacional bacteriana envolvida e das principais modificações teciduais desencadeadas. Esperamos com isso compreender aspectos importantes referentes ao início da progressão da patologia, reforçando aqueles que já foram avaliados neste modelo animal, destacando-o como uma ferramenta importante de estudos envolvendo a doença periodontal.

Material e métodos

Obtenção e manutenção de animais

Foram utilizados vinte e quatro ratos (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar), machos, adultos, com dez a doze semanas de vida e peso aproximado de 120g, originários do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Grupos de seis animais foram acomodados em gaiolas de propileno e mantidos no biotério do Departamento de

Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, com padrão SPF (“Specific Pathogen Free”). Os animais foram mantidos em ambiente com ciclo claro-escuro de doze horas e tiveram água e alimentação granulada (Labina/Purina) *ad libitum*. Os procedimentos seguiram as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Grupos experimentais, indução da doença periodontal e morte dos animais

Os animais foram divididos em quatro grupos de seis indivíduos cada, de acordo com os tempos experimentais descritos a seguir.

A indução da doença periodontal foi efetuada sob anestesia com cloridrato de ketamina e xilasina, por meio da ligação de um fio de algodão número 10 amarrado ao redor dos primeiros molares inferiores bilateralmente, segundo o procedimento descrito por JOHNSON (1975). Os animais controle não tiveram ligaduras.

Os animais foram mortos após três, cinco e sete dias de indução da doença periodontal ou sem a inflamação induzida (controle) e os fragmentos de mucosa gengival adjacentes aos primeiros molares inferiores foram coletados para processamento segundo o protocolo adequado. Para os ensaios posteriores, a porção gengival analisada foi aquela localizada mais próxima ao epitélio oral, uma vez que algumas vezes a porção referente ao epitélio juncional e sulcular não foi recuperada nos fragmentos.

As ligaduras também foram coletadas para análise da microbiota associada. O par de linhas extraídas de cada animal foi mergulhado em 100µl de PBS (tampão fosfato salino) e congelado a -80°C até o dia de utilização para extração do DNA bacteriano.

Extração de DNA bacteriano das ligaduras

Para análise da microbiota associada à progressão da doença, foram utilizados dois protocolos de extração de DNA genômico bacteriano, adaptados de acordo com as instruções do Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega):

- *Protocolo 1*: para a extração de DNA de bactérias Gram-negativas;
- *Protocolo 2*: incluindo um tratamento prévio das amostras com lisozima, para a extração de DNA de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Para o Protocolo 1, as linhas de algodão imersas em PBS foram centrifugadas a 13000G por 2 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 600µl da solução de lise e incubado por cinco minutos a 80°C. As amostras foram tratadas com 3µl da solução de RNase por uma hora a 37°C e com 200µl da solução para precipitação de proteínas por dez minutos no gelo, antes de uma nova centrifugação a 13000G por três minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos cônicos contendo 600µl de isopropanol para precipitação do DNA. Após centrifugados a 13000G por dois minutos, os precipitados foram lavados com solução de etanol 70% e secos à temperatura ambiente por quinze minutos. O DNA obtido foi ressuspenso em 50µl de água deionizada e mantido a -20°C até o uso. No caso do Protocolo 2, foram adicionados 480µl de EDTA 50mM e 120µl de lisozima 10mg/ml e as amostras foram incubadas por uma hora a 37°C e centrifugadas a 13000G por dois minutos antes do tratamento com a solução de lise.

As amostras de DNA foram quantificadas no espectrofotômetro GeneQuant RNA/DNA Calculator. A concentração do DNA de bactérias Gram-positivas foi inferida a partir da somatória da concentração de DNA obtida no Protocolo 2 menos a concentração de DNA obtida no Protocolo 1.

Análise morfológica do tecido gengival saudável

Para a caracterização do tecido estudado e definição das áreas avaliadas, os fragmentos gengivais foram fixados em paraformaldeído 10% por doze horas, incluídos em historesina (Kendall) e processados para a obtenção de cortes de 4µm de espessura. Os cortes foram, então, corados com hematoxilina por cinco minutos e eosina por trinta segundos.

Análise da dinâmica de fibras colágenas no tecido conjuntivo e fibras reticulares próximas à membrana basal do epitélio

Para a análise das fibras reticulares próximas à membrana basal do epitélio e do colágeno fibrilar no tecido conjuntivo gengival, os cortes foram oxidados durante dois minutos com permanganato de potássio 1%, descorados rapidamente com ácido oxálico 3% e tratados durante um minuto com alúmen de ferro 1%. Após isso, foram imersos em solução de prata amoniacal por 2 dois minutos, formol 10% por três minutos, cloreto de ouro 2% por dois minutos, hipossulfito de sódio por dois minutos e ácido pícrico por dois minutos. Todos os passos foram executados à temperatura ambiente (VILAMAIOR *et al.*, 2000).

Para avaliação da distribuição espacial das fibras de colágeno no tecido conjuntivo, foi utilizada uma ocular graduada (aumento de dez vezes), contendo um retículo de integração quadrilátero com cem pontos, acoplada ao microscópio de luz (Olympus) com uma objetiva de cem vezes. Foram contados os pontos do retículo totalmente preenchidos por fibras colagênicas em quinze campos distintos do tecido conjuntivo de cada animal. A partir desses valores foram calculadas as porcentagens de área ocupada com colágeno no tecido conjuntivo dos diferentes grupos experimentais.

Para avaliar a organização das fibras de colágeno nos diferentes tempos experimentais, os cortes foram corados com solução de Sirius Red 0,05% em ácido pícrico por trinta minutos e posterior contracoloração com hematoxilina por cinco minutos. Esta metodologia permite distinguir as fibras com maior compacidade, coradas na tonalidade rosa-avermelhada, daquelas de menor compacidade, coradas na tonalidade azul-esverdeada.

Análise estatística dos resultados

Os resultados foram testados por ANOVA (*a priori*) e Tukey (*a posteriori*), considerando significativamente distintos valores de $p \leq 0,05$ e utilizando o programa SYSTAT 10.

Resultados e discussão

Dinâmica da microbiota

O método de indução da doença periodontal por meio de ligadura favoreceu a formação de placa bacteriana, evidenciada pela quantificação do DNA de microorganismos associados. As concentrações de DNA obtidas em animais com ligadura foram maiores que em animais sem ligadura. Dessa forma, podemos inferir que esse método representa um modelo experimental eficiente de indução da doença periodontal, promovendo a formação do pré-requisito essencial para a evolução da patologia: a placa bacteriana.

A quantificação do DNA obtido está representada na **Figura 1**, que demonstra a dinâmica das populações de bactérias presentes na placa. É possível notar no gráfico que o desenvolvimento da doença é acompanhado por um aumento significativo da microbiota. Inicialmente, a concentração de microorganismos Gram-positivos é maior que Gram-negativos.

Já no terceiro dia após a ligadura, entretanto, podemos observar um aumento significativo nas concentrações de DNA bacteriano de ambas as populações. Entre três e cinco dias de indução da resposta inflamatória, a população de Gram-positivas diminui drasticamente e a população de Gram-negativas se estabiliza. Entre cinco e sete dias de inflamação não há mais mudanças em ambas as populações.

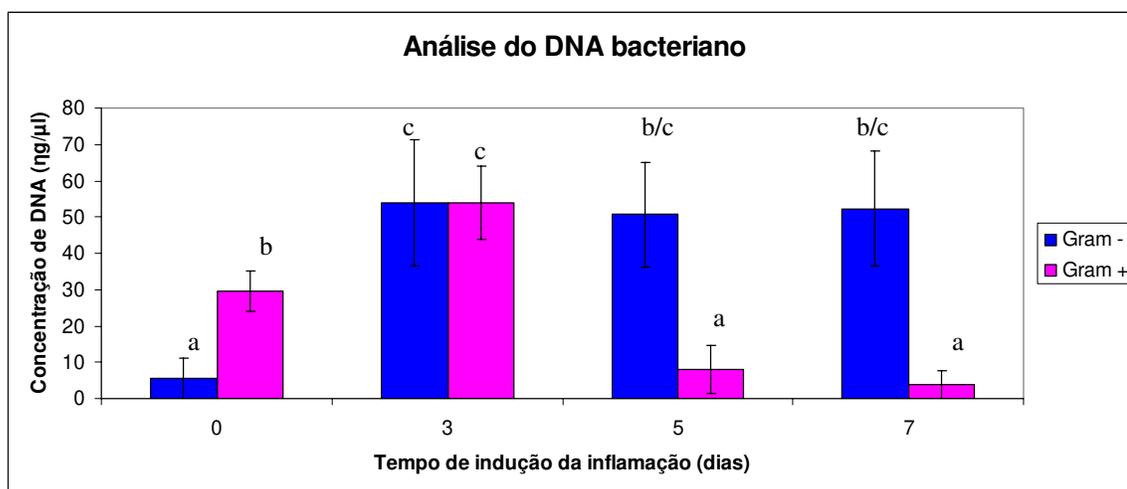


Figura 1. Análise das concentrações de DNA bacteriano ao longo do desenvolvimento da doença periodontal. Letras diferentes representam valores diferentes ($p \leq 0,05$; Tukey).

De acordo com KOLENBRANDER (2000), em condições normais, algumas bactérias formam comunidades em diferentes superfícies da cavidade oral, como esmalte, cimento e epitélio. Essas comunidades representam locais de grandes interações físicas entre centenas de espécies de microrganismos presentes na cavidade oral. Embora praticamente todos os indivíduos apresentem uma placa bacteriana dental, em indivíduos saudáveis sua composição bacteriana é simples, com poucas camadas celulares (de uma a vinte) e predominância de cocos Gram-positivos, além de alguns representantes Gram-negativos aeróbios ou aeróbios facultativos. Esses primeiros colonizadores da placa bacteriana são capazes de suportar altas concentrações de oxigênio e resistir a mecanismos de remoção como deglutição, mastigação, salivagem ou fluxo nasal, sendo sua multiplicação essencial para a adesão de outras espécies bacterianas, chamadas de colonizadores secundários. Em situações que favoreçam o acúmulo de placa, como ausência de escovação ou presença de um componente facilitador da adesão bacteriana, como a ligadura utilizada em nosso modelo, ocorre um aumento do número de

camadas de células bacterianas, levando à formação de gradientes atmosféricos e nutricionais, com uma diminuição no nível de oxigênio e maior sobrevivência de microrganismos anaeróbios (SBORDONE & BORTOLAIA, 2003).

Os colonizadores tardios da placa bacteriana geralmente são descritos como microrganismos do tipo Gram-negativos anaeróbios (SOCRANSKY *et al.*, 1998). O aumento significativo destes últimos é um dos marcadores iniciais da gengivite, com a formação de uma placa composta por várias camadas de células (cem a trezentas) arranjadas de acordo com seu metabolismo e tolerância (LISTGARDEN & HELLDEN, 1978). Essas comunidades microbianas constituem unidades funcionais que possuem grande capacidade de promover uma ação destrutiva no hospedeiro, causando danos à cavidade oral e desencadeando a doença periodontal (KOLENBRANDER, 2000).

Nossos resultados confirmam os dados descritos na literatura em humanos (LISTGARDEN & HELLDEN, 1978; BRADSHAW *et al.*, 1998; SOCRANSKY *et al.*, 1998; KOLENBRANDER, 2000; SBODORNE & BORTOLAIA, 2003), indicando que o modelo animal deste trabalho pode servir como uma boa referência para estudos relacionados à dinâmica bacteriana associada à doença periodontal. No entanto, também devemos atentar para uma outra peculiaridade referente aos resultados obtidos neste estudo: nos dois últimos períodos de infecção estudados (cinco e sete dias), a quantidade total de DNA extraído não se altera significativamente, sugerindo que a evolução da placa bacteriana esteja relacionada a mudanças qualitativas e não quantitativas na população de microrganismos. Segundo KOLENBRANDER (2000), a colonização de superfícies orais por bactérias é um problema de espaço e tempo. O espaço disponível muda a cada acréscimo na comunidade, com a multiplicação de colonizadores ou a inclusão de novos habitantes. Baseado nas necessidades de cada organismo da comunidade, o espaço disponível representa um fator limitante para o crescimento contínuo da placa bacteriana. A partir de um dado momento, podemos pensar na ocorrência de um equilíbrio entre os microorganismos presentes e os novos que se agregam à comunidade já formada, com um tamanho populacional constante e sem modificações bruscas no número de indivíduos.

Caracterização morfológica do tecido gengival

A gengiva é formada pela mucosa que circunda os dentes, unindo-se ao cimento e processo alveolar. A **Figura 2** apresenta uma gengiva saudável de ratos.

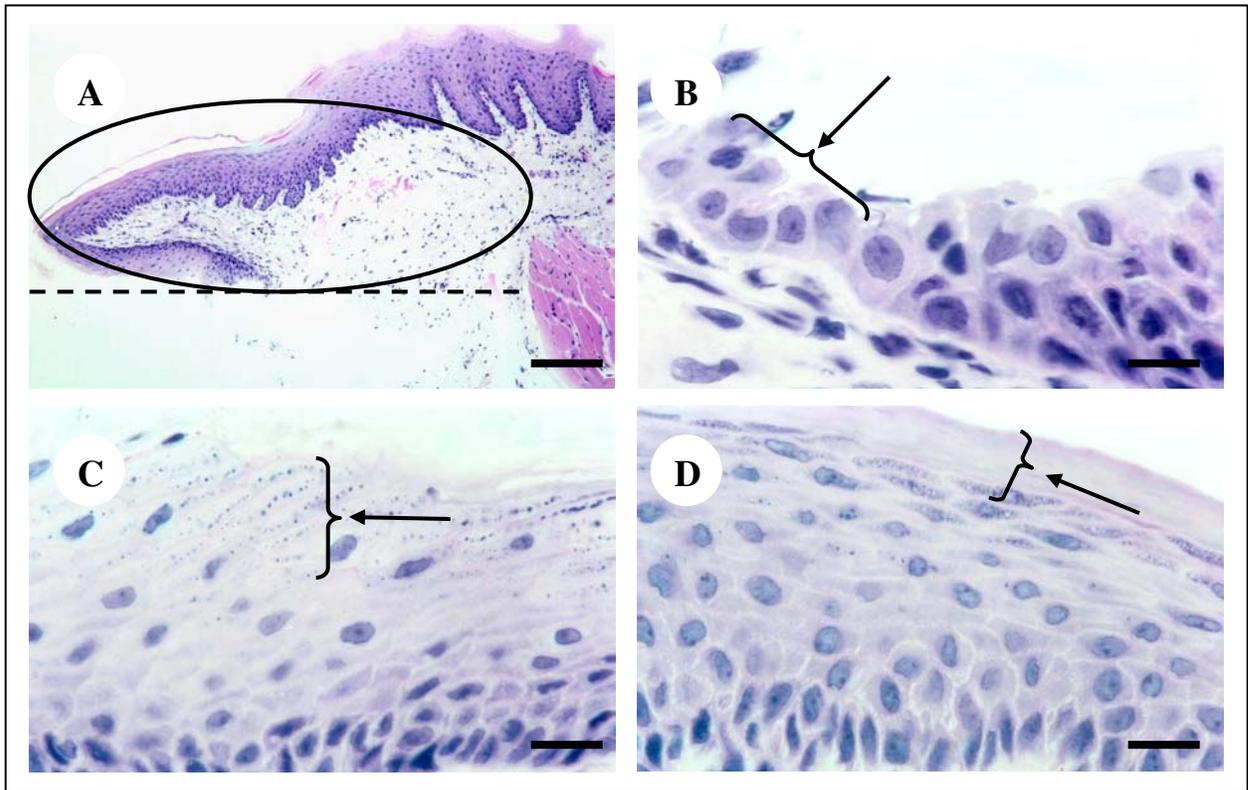


Figura 2. Análise estrutural do tecido gengival de ratos saudáveis, sem indução da doença periodontal. Coloração com hematoxilina e eosina. Em **A**, a barra representa 100µm. Em **B**, **C** e **D**, as barras representam 10µm. (**A**) Visão geral dos cortes histológicos de fragmentos gengivais adjacentes aos primeiros molares inferiores. A área delimitada contém a gengiva contendo as três diferentes porções de epitélios. A linha tracejada representa a região de inserção do dente. (**B**) Epitélio juncional com células de formato prismático e núcleos maiores (seta). (**C**) Epitélio sulcular com camada de células caracterizada pelo processo de paraqueratinização (seta). (**D**) Epitélio oral com camada queratinizada (seta).

É possível observar em detalhes a organização das três principais regiões do epitélio gengival:

- 1) *Epitélio juncional*: estratificado e não-queratinizado, contínuo ao epitélio sulcular. Possui duas camadas basais e tem uma menor quantidade de junções intercelulares, sendo mais permeável à passagem de produtos bacterianos para o tecido conjuntivo e de células do tecido conjuntivo para o sulco;
- 2) *Epitélio sulcular*: estratificado, pavimentoso e paraqueratinizado, contínuo ao epitélio oral revestindo a borda lateral do sulco gengival. Compartilha das demais características do

epitélio oral, exceto pela presença de células com queratinização incompleta (paraqueratinização);

- 3) *Epitélio oral*: estratificado, pavimentoso e queratinizado, apresenta quatro camadas celulares distintas (basal, espinhosa, granular e cornificada). É projetado principalmente para proteção contra injúrias mecânicas durante a mastigação, sendo sua resistência derivada de uma grande quantidade de junções intercelulares, principalmente desmossomos.

Na maioria dos fragmentos obtidos em nossos experimentos, foi possível identificar os epitélios sulcular e oral. A porção referente ao epitélio juncional muitas vezes foi perdida na extração gengival, principalmente nas situações experimentais em que os animais tiveram a aplicação de ligaduras, ou seja, aos três, cinco e sete dias de inflamação induzida. Contrariamente, nos animais controle foi possível encontrar frequentemente um epitélio juncional íntegro. Este achado nos leva a acreditar que o desenvolvimento de um perfil inflamatório seja responsável por alterações teciduais que resultam em uma maior fragilidade estrutural do epitélio juncional, uma vez que esta região está localizada em contato com a ligadura e, portanto, sofre a ação direta das bactérias aglomeradas junto ao fio de algodão e de seus produtos metabólicos liberados.

Modificações de matriz extracelular

A matriz extracelular é a substância fundamental do tecido conjuntivo, rica em proteoglicanas, proteínas e glicoproteínas, responsável pela sustentação dos tecidos e manutenção de suas características físicas. De acordo com CHAMMAS (1998), os diferentes elementos da matriz interagem de maneira complexa, sendo que os processos de remodelação são intrincadas cadeias bioquímicas, baseados no balanço entre síntese e degradação, além de serem regulados em diferentes níveis. O estroma intersticial encontra-se em contínuo “turnover” e distúrbios deste processo normal podem levar a uma série de alterações teciduais. Quando a síntese predomina sobre a degradação, quadros de acúmulo de matriz extracelular são observados, identificados em uma série de lesões inflamatórias (PAGE *et al.*, 1978; FRIES *et al.*, 1994; ATUCCI *et al.*, 2006; HERNANDEZ-PANDO *et al.*, 2006; NIKOLAIDIS *et al.*, 2006; YUCA *et al.*, 2006).

Por meio da técnica de impregnação com prata, avaliamos a disposição das fibras reticulares na membrana basal do epitélio. No entanto, não observamos diferenças significativas até os sete dias de indução da resposta inflamatória, sendo que as fibras se mantiveram íntegras da mesma forma que aquelas observadas no tecido controle (sem ligaduras). O resultado desta análise pode ser acompanhado na **Figura 3**.

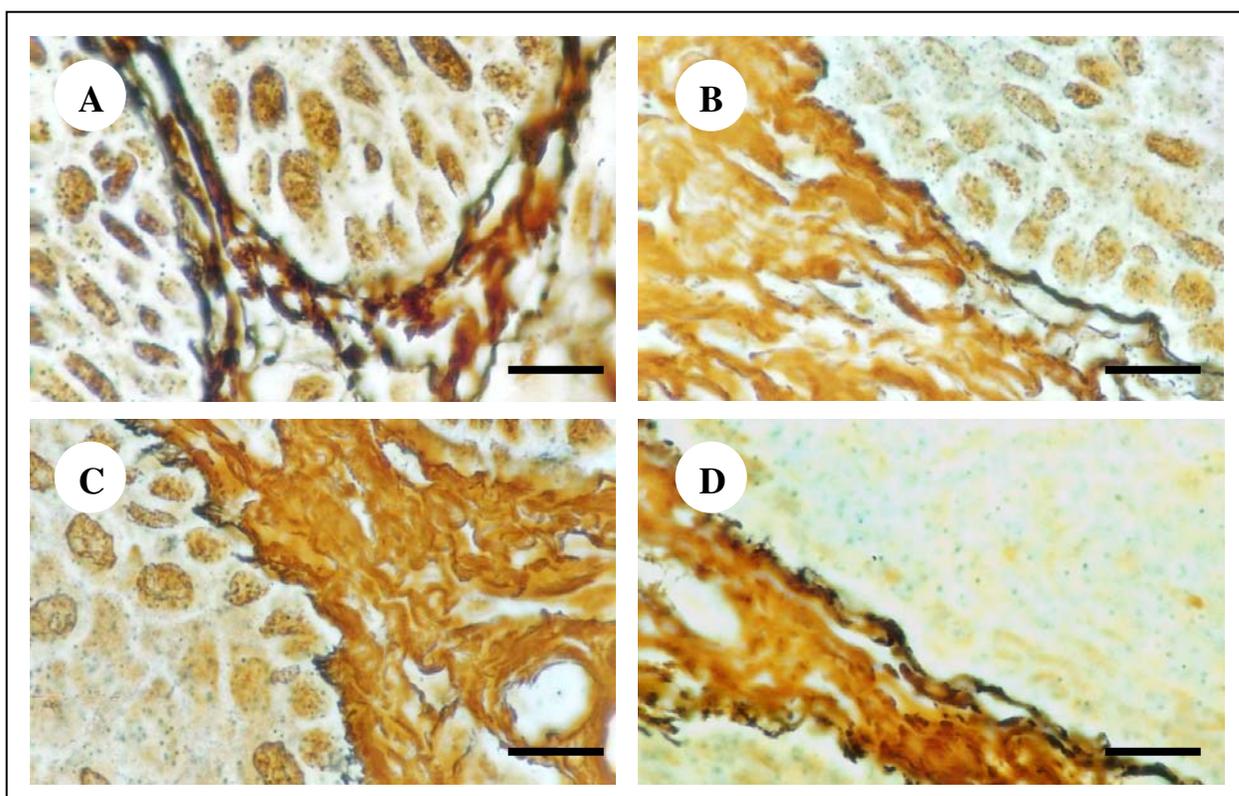


Figura 3. Dinâmica das fibras reticulares na membrana basal do epitélio oral gengival. As fibras reticulares correspondem aos filamentos negros em contato com o epitélio. Impregnação com prata. Barras representam 200 μ m. (A), (B), (C) e (D) Microscopia óptica de zero, três, cinco e sete dias de inflamação, respectivamente.

Além disso, com a mesma técnica também observamos a dinâmica do colágeno fibrilar no tecido conjuntivo, composto principalmente por colágeno tipo I. Para avaliar a distribuição espacial das fibras e determinar a área tecidual ocupada pelas mesmas, foi realizada uma contagem de campos ocupados por fibras com o auxílio de uma ocular reticulada. Os cortes avaliados estão apresentados na **Figura 4** e o resultado da análise dos respectivos dias de indução da doença periodontal pode ser visto na **Figura 5**.

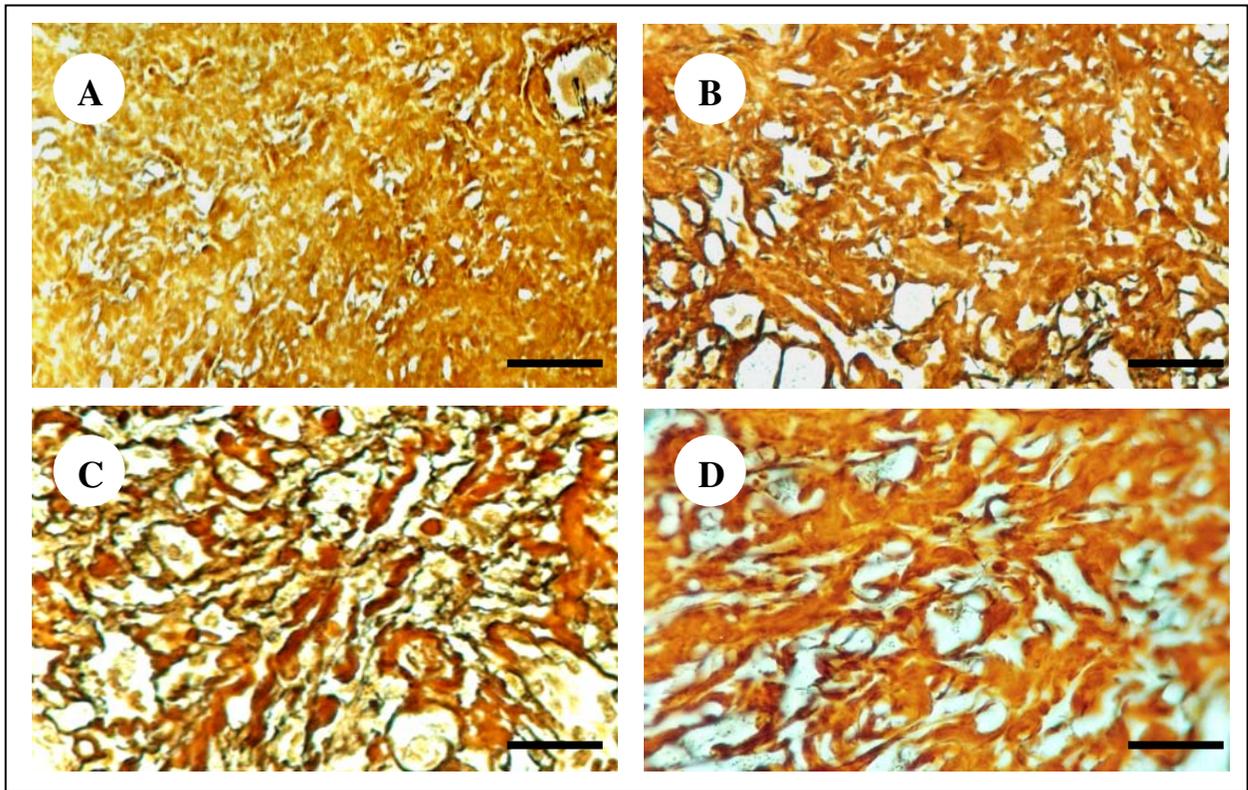


Figura 4. Dinâmica das fibras colagênicas no tecido conjuntivo gengival. Impregnação com prata. Barras representam 120 μ m. (A), (B), (C) e (D) Microscopia óptica de zero, três, cinco e sete dias de inflamação, respectivamente.

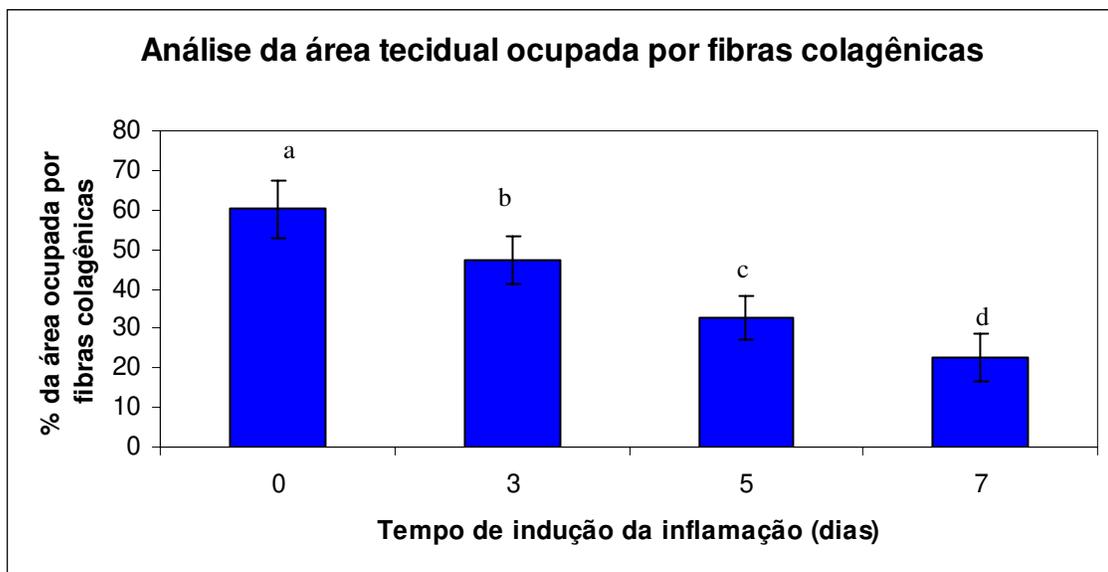


Figura 5. Análise da área tecidual ocupada por fibras colagênicas no tecido conjuntivo gengival. Letras diferentes representam valores diferentes ($p \leq 0,05$; Tukey).

A análise dos dados mostra uma diminuição crescente na área do tecido conjuntivo gengival ocupado por fibras colagênicas, particularmente do tipo I, já que estas representam a maior parte do colágeno fibrilar. Essa diferença chega a atingir um valor de 35% entre tecido controle e o tecido com sete dias de inflamação induzida, indicando a ocorrência de um intenso processo de remodelação da matriz extracelular tecidual acompanhando os primeiros dias do desenvolvimento da doença periodontal. De acordo com um trabalho realizado em humanos por EJEIL e colaboradores (2003), comparando pacientes com gengiva saudável e com inflamação gengival branda, moderada ou severa, foi encontrada uma diminuição significativa entre os grupos experimentais testados, com uma redução de aproximadamente 20% na área ocupada por fibras colagênicas entre os dois grupos extremos (controle e inflamação severa). Além disso, a porcentagem da área ocupada por colágeno no tecido controle foi semelhante àquela considerada em nosso modelo, com um valor de 50% a 60%, também concordando com o trabalho de GOGLY e colaboradores (1997). De acordo com PAYNE e colaboradores (1975), a perda de colágeno na resposta inflamatória gengival, entre três e quatro dias, usando um modelo de doença periodontal induzida em humanos, pode atingir até 70%.

Dessa forma, podemos supor que o modelo de ligadura aqui estudado nos forneça indícios de um processo inflamatório bastante acentuado, com uma redução significativa de fibras colagênicas na gengiva aos sete dias de indução. Isso nos parece totalmente plausível, principalmente se levarmos em conta os dados indicados por outros trabalhos desenvolvidos com o modelo da ligadura em ratos, demonstrando uma significativa reabsorção do osso alveolar já aos sete dias de indução inflamatória (HOLZHAUSEN *et al.*, 2004). Além disso, de acordo com JOHNSON (1975), que desenvolveu a metodologia originalmente, os animais podem ter uma perda dentária aos quarenta e cinco dias de indução da patologia. Todos estes indícios mostram que o modelo estudado neste trabalho realmente possa ser utilizado como uma ferramenta prática e relativamente rápida para estudos relacionados à doença periodontal.

As imagens derivadas da análise de microscopia óptica mostram que aos sete dias de indução da resposta inflamatória há a formação de fibras colagênicas mais densas e organizadas de uma forma bastante diferenciada do tecido sadio. Para verificarmos se ocorre de fato diferenciação na espessura e compacidade das fibras de colágeno ao longo da indução da resposta inflamatória, utilizamos a técnica de coloração com Sirius Red. Os resultados obtidos a partir desta análise podem ser observados na **Figura 6**.

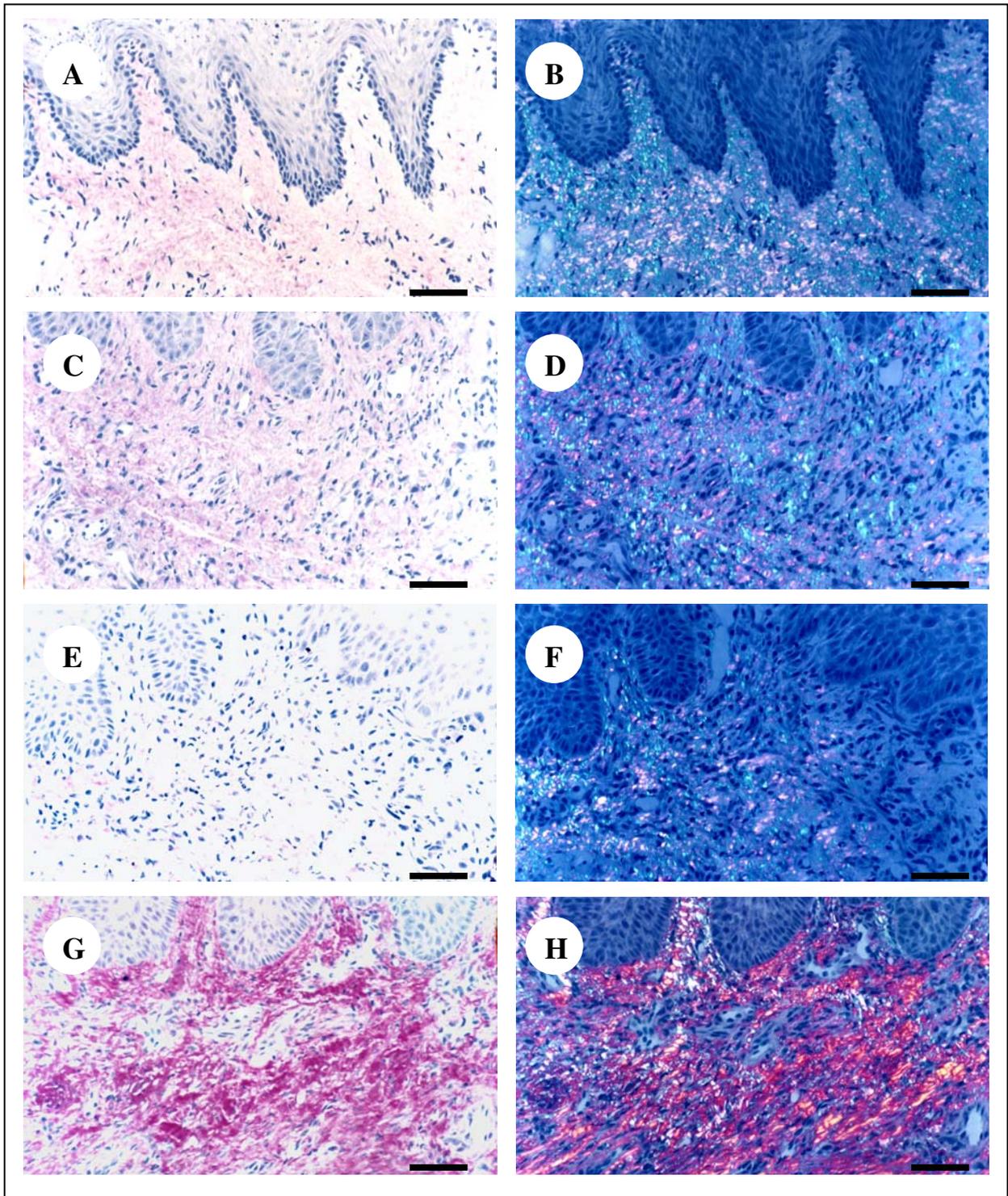


Figura 6. Modificações associadas às fibras de colágeno na derme gengival. Coloração com Sirius Red e hematoxilina. Barras representam 25µm. (A), (C), (E) e (G) Microscopia de luz de zero, três, cinco e sete dias de inflamação. (B), (D), (F) e (H) Microscopia de polarização de zero, três, cinco e sete dias de inflamação.

A dinâmica das fibras colagênicas no tecido conjuntivo observada na técnica de Sirius Red foi semelhante aos resultados analisados na impregnação com prata. Nos animais controle, as fibras de colágeno apresentam uma disposição ordenada com um entrelaçamento entre aquelas de maior espessura (coloração rósea-avermelhada) e de menor espessura (coloração azul-esverdeada). Com o início da inflamação, no terceiro dia, verificamos maior espaçamento entre as fibras, sendo que aos cinco dias de inflamação tal característica se torna ainda mais acentuada com uma significativa perda na quantidade de fibras delgadas e espessas. Já aos sete dias de indução da resposta inflamatória, entretanto, notamos uma reposição de fibras de maior espessura, com orientação diferente daquela encontrada na ausência do processo inflamatório.

Assim, ao analisarmos em conjunto os dados da técnica de coloração com Sirius Red da avaliação da área ocupada pelas fibras colagênicas, percebemos que apesar do aumento na quantidade de fibras mais espessas, há uma diminuição na distribuição homogênea de colágeno pelo tecido conjuntivo gengival como um todo. Diversos trabalhos sugerem a ocorrência de uma significativa perda de colágeno com o avanço do processo inflamatório associado à doença periodontal (ELEY & COX, 1998; SEGUIER *et al.*, 2000; EJEIL *et al.*, 2003). No entanto, outros estudos também apontam para a ocorrência de um espessamento de fibras na primeira semana da patologia. De acordo com a revisão de BARTOLD e NARAYANAN (2000), simultaneamente à destruição de colágeno pode ocorrer um reparo frustrado da matriz extracelular. Assim, nos parece que os resultados de nosso trabalho sugerem uma hipótese baseada no rearranjo de fibras colagênicas na matriz extracelular do periodonto com o surgimento da doença periodontal. Esse processo se caracteriza pela formação de fibras mais densas e espessadas entre si, com uma redução significativa na área ocupada por colágeno fibrilar no tecido conjuntivo gengival.

De acordo com HÄKKINEN e colaboradores (2000), com o desenvolvimento da resposta inflamatória, um processo de cicatrização pode ser iniciado e a organização da matriz extracelular local é consideravelmente modificada. Esta reorganização tecidual é dependente de uma série de fatores, dentre eles a ativação e a proliferação de fibroblastos. Nesse processo, os fibroblastos são expostos a uma grande variedade de estímulos simultâneos, incluindo moléculas da própria matriz extracelular e fatores de crescimento solúveis. Além disso, as próprias proteínas da matriz extracelular podem ser moduladas por modificações proteolíticas ou podem ter sua estrutura alterada em função de mudanças nas forças tensoras locais. A secreção de

diversos componentes durante a resposta inflamatória pode afetar drasticamente a produção de moléculas da matriz extracelular. Um aumento na produção de colágeno, por exemplo, pode estar intimamente associada a uma alta taxa de secreção de TGF- β .

Conclusões

O modelo de indução da doença periodontal através de ligaduras demonstrou-se eficiente em promover a formação da placa bacteriana e desencadear, conseqüentemente, o início da patologia. A dinâmica das populações bacterianas no início da doença reforçam o modelo animal empregado no desenvolvimento do presente trabalho. Além disso, as modificações no tecido gengival caracterizam-se por uma dinâmica bastante evidente de degradação de colágeno, com um espessamento de fibras colagênicas aos sete dias de indução da doença. Tais alterações podem ser decorrentes de mudanças na produção de elementos relacionados diretamente com a manutenção e/ou renovação de elementos da matriz extracelular, como por exemplo as metalproteinases de matriz (MMPs) ou citocinas.

As alterações aqui descritas, portanto, reforçam a idéia de que é possível utilizar um modelo animal relativamente simples para estudar a evolução da doença periodontal. O modelo de ligadura dispensa a necessidade de se manter microrganismos vivos em cultura para posterior inoculação e também possibilita o início da doença de uma forma bastante próxima do que ocorre naturalmente: a formação de placa parte de uma sucessão de populações bacterianas iniciada com colonizadores primários (bactérias Gram-positivas) e concretizada pelo estabelecimento de outros colonizadores finais (bactérias Gram-negativas).

As alterações destacadas para o tecido gengival nos sugerem a ocorrência de um processo bastante dinâmico de remodelação, cuja definição poderá representar o estabelecimento de uma patologia mais severa em tempos de inflamação posteriores. Além disso, a elucidação de etapas características do início da doença periodontal pode nos ajudar a explicar o desenvolvimento de quadros posteriores mais críticos, favorecendo assim o melhor entendimento do processo inflamatório associado a esta patologia tão importante e representativa.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer a Ms. Monique Ribeiro Tiba, do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, pela ajuda na extração de DNA bacteriano. Ao Prof. Dr. Paulo P. Joazeiro, do Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, e ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, do Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, pelo auxílio com as técnicas de coloração com Picrossirius Red e impregnação com prata, respectivamente.

Referências bibliográficas

- ATTUCCI, S.; GAUTHIER, A.; KORKMAZ, B.; DELEPINE, P.; FERRER-DINMARTINO, M.; SAUDUBRAY, F.; DIOT, P. & GAUTHIER, F. (2006) EPI-hNE4, a proteolysis-resistant inhibitor of human neutrophil elastase and potential anti-inflammatory drug for treating cystic fibrosis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *in press*.
- BARTOLD, P. M. & NARAYANAN, A. S. (2006) Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontology* 2000, 40: 29-49.
- BLACK, J. G. (2002) *Microbiologia: Fundamentos e perspectivas. Doenças orais e gastrointestinais. Quarta Edição.* Editora Guanabara-Koogan.
- BRADSHAW, D. J.; MARSH, P. D.; WATSON, G. K. & ALLISON, C. (1998) Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infection and Immunity*, 66: 4726-4732.
- CHAMMAS, R. (1998) Aspectos fisiopatológicos da disseminação de sarcomas. *Acta Oncológica Brasileira*, 18: 25-31.
- COLEMAN, J. W. (2001) Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, 1: 1397-1406.

- EJEIL, A.-L.; GAULTIER, F.; IGONDJO-TCHEN, S.; SENNI, K.; PELLAT, B.; GODEAU, G. & GOGLY, B. (2003) Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression? *Journal of Periodontology*, 74: 196-201.
- ELEY, B. M. & COX, S. W. (1998) Advances in periodontal diagnosis. 6. Proteolytic and hydrolytic enzymes of inflammatory cell origin. *British Dental Journal*, 184: 268-71.
- FRIES, K. M.; BLIEDEN, T.; LOONEY, R. J.; SEMPOWISKI, G. D.; SILVEIRA, M. R.; WILLIS, R. A. & PHIPPS, R. P. (1994) Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 72: 283-292.
- GOGLY, G.; GODEAU, G.; GLBERT, S.; LEGRAND, J. M.; KUT, C.; PELLAT, B. & GOLDBERG, M. (1997) Morphometric analysis of collagen and elastic fibres in normal skin and gingiva in relation to age. *Clinical Oral Investigation*, 1: 147-152.
- HÄKKINEN, L.; UITTO, V. J. & LARJAVA, H. (2000) Cell biology of gingival wound healing. *Periodontology 2000*, 24: 127-152.
- HERNANDEZ-PANDO, R.; OROZCO-ESTEVEZ, H.; MALDONADO, H. A.; AGUILAR-LEON, D.; VILCHIS-LANDEROS, M. M.; MATA-ESPINOSA, D. A.; MENDOZA, V. & LOPEZ-CASILLAS, F. (2006) A combination of a transforming growth factor-beta antagonist and an inhibitor of cyclooxygenase is an effective treatment for murine pulmonary tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology*, 144: 264-272.
- HOLZHAUSEN, M.; GARCIA, D. F.; PEPATO, M. T. & MARCANTONIO, E. JR. (2004) The influence of short-term diabetes mellitus and insulin therapy on alveolar bone loss in rats. *Journal of Periodontal Research*, 39:188-193.
- JOHNSON, I. H. (1975) Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *Journal of Periodontal Research*, 10: 332-345.
- KOLENBRANDER, P. E. (2000) Oral microbial communities: biofilms, interactions and genetic systems. *Annual Review of Microbiology*, 54: 413-437.
- LAPPIN, D. F.; MACLEOD, C. P.; KERR, A.; MICHELL, T. & KINANR, D. (2001) Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. *Clinical and Experimental Immunology*, 123: 294-300.
- LISTGARTEN, M. A. (1986) Pathogenesis of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 13: 418-425.

- LISTGARDEN, M. A.; HELLDEN, L. (1978) Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in human. *Journal of Clinical Periodontology*, 5: 115-132.
- MADIANOS, P. N.; BOBETSIS, Y. A. & KINANE, D. F. (2005) Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *Journal of Clinical Periodontology*, 32:57-71.
- NIKOLAIDIS, N.; KOUNTOURAS, J.; GIOULEME, O.; TZAROU, V.; CHATZIZISI, O.; PATSIAOURA, K.; PAPAGEORGIU, A.; LEONTSINI, M.; EUGENIDIS, N. & ZAMBOULIS, C. (2006) Colchicine treatment of liver fibrosis. *Hepatogastroenterology*, 53: 281-285.
- PAGE, R. C.; ENGEL, L. D.; NARAYANAN, A. S. & CLAGETT, J. A. (1978) Chronic inflammatory gingival and periodontal disease. *JAMA: the Journal of the American Medical Association*, 240: 545-550.
- PAYNE, W. A.; PAGE, R. C.; OLVIGIE, A. L.; HALL, W. B. (1975) Histopathologic features of the initial and early stages of experimental gingivitis in man. *Journal of Periodontal Research*, 10: 51-64.
- SEGUIER, S.; GODEAU, G. & BROUSSE, N. (2000) Collagen fibers and inflammatory cells in healthy and diseased human gingival tissues: a comparative and quantitative study by immunochemistry and automated image analysis. *Journal of Periodontology*, 71: 1079-1085.
- SIGUSCH, B.; EICK, S.; PFISTER, W.; KLINGER, G. & GLOCKMAN, E. (2001) Altered chemotactic behavior of crevicular PNM in different forms of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 28: 162-167.
- SBORDONE; L.; BORTOLAIA, C. (2003) Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clinical Oral Investigation*, 7: 181-188.
- SOCRANSKY, S. S. (1977) Microbiology of periodontal disease. Present status and future considerations. *Journal of Periodontology*, 48: 497-504.
- SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; SMITH, C. & KENT, R. L. JR. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25: 134-144.

- TAANI, D. S. (1997) Association between cigarette smoking and periodontal health. *Quintessence International*, 28: 535-539.
- TODESCAN, J. H. (2001) Doença Periodontal. Conceitos e classificações. Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda.
- VILAMAIOR, P. S.; FELISBINO, S. L.; TABOGA, S. R. & CARVALHO, H. F. (2000) Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. *Prostate*, 45: 253-258.
- YUCA, K.; CANKAYA, H.; BAYRAM, I.; OZBEK, H. & KIRIS, M. (2006) Local irritant effects of topical oral sprays on oral mucosa in mice. *Advances in Therapy*, 23: 98-106.

4. CAPÍTULO 2

Título do artigo:

Mudanças na expressão de MMPs e migração de células inflamatórias na gengivite experimental induzida por ligadura em ratos.

Autores:

Márcio Lorencini¹, Juliete Aparecida Francisco da Silva¹, Cristiane Lucia Rodriguez de la Hoz², Hernandes F. Carvalho³ e Dagmar Ruth Stach-Machado¹.

Instituições envolvidas:

1. Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biologia – UNICAMP – Campinas – SP – Brasil
2. Departamento de Fisiologia e Biofísica – Instituto de Biologia – UNICAMP – Campinas – SP – Brasil
3. Departamento de Biologia Celular – Instituto de Biologia – UNICAMP – Campinas – SP – Brasil

Resumo

A atividade das metaloproteinases de matriz (MMPs), uma família de enzimas dependentes da presença de cátions bivalentes, tem sido associada às modificações teciduais desencadeadas no início de respostas inflamatórias. Um novo inibidor da atividade destas enzimas conhecido como RECK tem sido descrito em trabalhos relacionados ao desenvolvimento tumoral. No caso das doenças periodontais, uma grande desorganização de elementos de matriz extracelular é o fator responsável pela perda de adesão dos elementos do periodonto ao dente. Particularmente na gengiva, o processo inflamatório iniciado promove a degradação de elementos essenciais para a manutenção do tecido, principalmente fibras colagênicas, logo nos primeiros dias da doença. Estudos sugerem uma diminuição de até 35% da área ocupada por fibras colagênicas na gengiva na primeira semana de indução da doença periodontal. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão gênica de MMP-2, -7, -9, -14 e RECK, assim como a atividade de MMP-2 e -9 no desenvolvimento inicial da doença periodontal induzida através de ligadura em dentes de ratos. Os resultados indicam uma manutenção nos níveis de expressão gênica de MMP-14 e RECK. Há um aumento crescente na expressão gênica de MMP-2 até os sete dias de inflamação induzida, assim como um aumento em sua atividade avaliada por zimografia. A imunohistoquímica nos indica que esta MMP deve ser produzida por células residentes do sítio inflamatório, como células epiteliais e fibroblastos. No caso da MMP-9, encontramos um pico de expressão gênica aos cinco dias de inflamação e um pico de atividade aos três dias. Tais picos são totalmente coerentes com a análise de migração de macrófagos e neutrófilos, respectivamente. Os dados de imunohistoquímica demonstram que esta MMP parece ser produzida por células residentes e também por células que migraram para o foco da inflamação, confirmando os ensaios anteriores. Para a MMP-7, foi encontrado um íntron no amplificado da PCR, sugerindo um possível mecanismo de controle baseado no processamento alternativo do RNA mensageiro. Dessa forma, sugerimos que a acentuada taxa de “turnover” de fibras colagênicas na matriz extracelular de quadros de gengivite possa estar intimamente relacionada à produção de MMP-2 e -9. Além disso, podemos concluir que a resposta inflamatória do hospedeiro representa um dos fatores mais significativos para o avanço da doença periodontal.

Introdução

A doença periodontal representa um grupo de patologias com elevada incidência na dentição humana, que são responsáveis pela perda de adesão dos tecidos periodontais ao dente (TAANI, 1997; LINDHE, 1999). Dentre as principais modificações relacionadas a tal grupo de enfermidades é possível observar uma acentuada degradação de elementos teciduais desencadeada pela resposta imunológica do hospedeiro frente à presença da placa bacteriana, considerada o principal agente etiológico da doença (PAPAPANOU, 1989). Associada a esta degradação encontra-se a ativação de um grupo de enzimas denominadas metaloproteinases de matriz (MMPs). Juntamente com outros elementos, como óxido nítrico, quimiocinas e diversas proteases, as MMPs acarretam uma elevada taxa de remodelação tecidual caracterizada pela acentuada desorganização estrutural do tecido inflamado (REYNOLDS *et al.*, 1994; VAN DER ZEE *et al.*, 1997; OZMERIC, 2004).

As MMPs pertencem, em vertebrados, a uma família de aproximadamente 25 enzimas com atividade proteolítica dependente de cátions bivalentes, principalmente zinco e cálcio. São enzimas que podem ser encontradas na forma secretada ou ancoradas à membrana plasmática das células, normalmente produzidas em uma configuração inativa (na forma zimógeno) e dependentes de uma clivagem de seu pró-domínio para aquisição de atividade catalítica completa. As MMPs são amplamente encontradas regulando diversos processos inflamatórios ou de reparo tecidual, sendo, portanto, apontadas como representantes de um dos primeiros passos associados à evolução do sistema imunológico nos organismos (STERNLICHT & WERB, 2001; PARKS *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de processos inflamatórios compreende uma série de respostas celulares dependentes da integração de informações sequenciais como detecção de injúria ou presença de microrganismos, acúmulo e intervenção de células que eliminam os microrganismos e as células infectadas no hospedeiro, e o reparo de tecidos que são danificados pelos traumas iniciais ou pela resposta do hospedeiro. De acordo com uma classificação das respostas inflamatórias desenvolvida por NATHAN (2002), diversas categorias de doenças apresentam um aumento da expressão de membros da família das MMPs, justificando sua categorização como importantes marcadores inflamatórios. Juntamente com este aumento, também costuma-se observar uma redução na expressão de moléculas inibidoras de MMPs. O gene RECK é um

destes componentes inibidores, descrito como importante regulador da atividade de MMP-2, -9 e -14 em processos de desenvolvimento tumoral (TAKAHASHI *et al.*, 1998; SASAHARA *et al.*, 1999; OH *et al.*, 2001; RHEE & COUSSENS, 2002; WELM *et al.*, 2002).

Particularmente no caso das doenças periodontais, alguns microrganismos como *Porphyromonas gingivalis* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* são capazes de produzir colagenases próprias que danificam as fibras do tecido conjuntivo do hospedeiro. No entanto, acredita-se que tais enzimas tenham um papel secundário na degradação de colágeno associada ao desenvolvimento da doença, sendo que tal efeito deve-se à atividade de enzimas produzidas por células do próprio indivíduo afetado (SODEK & OVERALL, 1992). As evidências para o papel das MMPs na destruição do periodonto são fortes e têm sido suportadas por inúmeros achados, incluindo a produção de níveis elevados de colagenases por tecidos gengivais afetados em cultura, a detecção de colagenases ativas em maior quantidade que as inativas no fluído de bolsas periodontais adjacentes à tecidos gengivais inflamados, e a presença de RNAs mensageiros de MMPs em células obtidas de lesões periodontais (FULLMER & GIBSON, 1966; GOLUB *et al.*, 1985 e 1990; LEE *et al.*, 1995; RYAN & GOLUB, 2000).

Como descrito por BIRKEDAL-HANSEN (1993) cada um dos diferentes tipos de células encontradas nos tecidos periodontais é capaz de produzir uma bateria de diferentes MMPs quando estimulado efetivamente por elementos como citocinas, derivados do ácido aracdônico e fatores de crescimento. Células localizadas no sítio inflamatório, como fibroblastos gengivais ou do ligamento periodontal, já foram descritas como secretoras de algumas colagenases. Além disso, células inflamatórias que migram para o tecido afetado, como neutrófilos e macrófagos, podem produzir uma grande variedade de MMPs (SORSA *et al.*, 1988; GOLUB *et al.*, 1995). As células epiteliais, por sua vez, podem produzir uma grande quantidade destas enzimas, promovendo a extensão do epitélio juncional e a consequente perda de adesão do tecido conectivo (UITTO *et al.*, 1994).

Dessa forma, considerando a importância da atividade de MMPs na evolução do quadro inflamatório associado à doença periodontal e levando em conta a elevada degradação de fibras, principalmente colagênicas, nos tecidos afetados, este trabalho buscou evidenciar a dinâmica da expressão de MMP-2, -7, -9, -14 e do elemento inibidor RECK, bem como a localização e atividade enzimática de MMP-2 e -9 no desenvolvimento inicial da doença periodontal induzida com ligadura em dentes de ratos. A escolha destas MMPs foi baseada na regulação das mesmas

por RECK, com exceção de MMP-7, uma matrilisina com atividade associada à progressão de diversas respostas inflamatórias. Além disso, também avaliamos o perfil de migração de células inflamatórias, particularmente neutrófilos e macrófagos, para o sítio de infecção induzida. Baseados em estudos prévios desenvolvidos por nosso grupo, que demonstraram que durante a primeira semana da resposta inflamatória já é possível observar uma redução significativa na área ocupada pelas fibras de colágeno no tecido gengival, esperamos elucidar um pouco mais o início do desenvolvimento desta patologia tão importante, que afeta uma parcela considerável da população mundial.

Material e métodos

Obtenção e manutenção de animais

Foram utilizados sessenta ratos (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar), machos, adultos, (com dez a doze semanas de vida e peso aproximado de 120g), originários do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Grupos de seis animais foram acomodados em gaiolas de propileno e mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, com padrão SPF (“Specific Pathogen Free”). Os animais foram mantidos em ambiente com ciclo claro-escuro de doze horas e tiveram água e alimentação granulada (Labina/Purina) *ad libitum*. Os procedimentos seguiram as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Grupos experimentais, indução da doença periodontal e morte dos animais

Para cada protocolo, os animais foram divididos em quatro grupos de cinco indivíduos cada, de acordo com os tempos experimentais descritos a seguir. Foram considerados três protocolos no total: extração de RNA, extração protéica e técnicas de análise morfológica (metade dos materiais para inclusão em historesina e metade para congelamento). Assim, foram utilizados sessenta animais no total.

A indução da doença periodontal foi efetuada sob anestesia com cloridrato de ketamina e xilasina, por meio da ligação de um fio de algodão número 10 amarrado ao redor dos primeiros molares inferiores bilateralmente, segundo o procedimento descrito por JOHNSON (1975). Os animais controle não tiveram ligaduras.

Os animais foram mortos após três, cinco e sete dias de indução da doença periodontal ou sem a inflamação induzida (controle) e os fragmentos de mucosa gengival adjacentes aos primeiros molares inferiores foram coletados para processamento segundo o protocolo adequado.

Desenho de oligonucleotídeos iniciadores sintéticos

Os oligonucleotídeos iniciadores sintéticos (“primers”) específicos para cada um dos genes estudados: MMP-2, -7, -9, -4, RECK e β -actina (usado como controle endógeno da reação por não ter sua expressão alterada com a doença periodontal), foram desenhados com auxílio do programa Gene Runner e do programa acoplado ao sistema ABI Prism 7000 Sequence Detection (Amersham Bioscience). As seqüências dos RNAs mensageiros utilizados foram obtidas no “site” do NCBI. Os amplificadores esperados de cada reação possuíam o mesmo tamanho: 151 pares de bases. Os “primers” desenhados, bem como os números de acesso das respectivas seqüências de RNA mensageiros utilizadas como base, estão indicados na **Tabela 1**.

Tabela 1. “Primers” desenhados.

Gene	“Primer” direto (5’-3’)	“Primer” reverso (5’-3’)	Acesso (NCBI)
β-actina	tctctgtggcatccatgaaacta	ccagggcagtaatctcctctctg	NM_031144.2
MMP-2	tgcgcttttctcgaatccat	aagtgagaatctcccccaacac	NM_031054.1
MMP-7	aagtggcattcccagaactgtca	ctgcagtcccccaactaacc	NM_012864.1
MMP-9	tctctgggcgcaaaatgtg	atacgttcccggctgatcag	NM_031055.1
MMP-14	ctgtcccgataagcccaga	gggtatccgtccatcacttg	NM_031056.1
RECK	agaggtcaggctttaaaccacttg	gaacggaagcatggctaacac	XM_233371.3

Extração de RNA total, transcrição reversa e PCR em tempo real

O RNA total do tecido foi extraído com o “kit” RNeasy Mini (Qiagen). Após quantificação no espectrofotômetro GeneQuant RNA/DNA Calculator e verificação da

integridade das moléculas em gel de agarose 1,5%, a transcrição reversa foi efetuada utilizando 50ng de RNA total de cada amostra, seguindo o protocolo do “kit” M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Após quantificação do cDNA obtido no espectrofotômetro GeneQuant RNA/DNA Calculator, as reações de PCR em tempo real foram realizadas com o sistema ABI Prism 7000 Sequence Detection e o “kit” SYBR Green PCR Master Mix (Amersham Bioscience). O ensaio foi realizado com um volume final de 25µl por reação, cada uma contendo: 150ng de cDNA, 10pmols de primer, 12,5µl de SYBR Green e o restante de água. As condições básicas da reação foram 40 ciclos de quinze segundos a 95°C para denaturação, um minuto a 60°C para anelamento e um minuto a 75°C de extensão, seguido de mais dez minutos a 75°C no final dos quarenta ciclos para extensão final.

Antes dos ensaios de avaliação da expressão gênica, foram construídas curvas de calibração para cada par de “primers” a partir de diluições seriadas de uma amostra de cDNA. Assim, foi assegurado que todos os pares de “primers” utilizados nestes experimentos apresentaram uma eficiência maior que 90%. O protocolo adotado para esta padronização prévia e os cálculos utilizados podem ser conferidos no boletim da Applied Biosystems (1997).

A avaliação da expressão gênica nos tempos experimentais incluídos neste estudo foram baseadas no método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, também descrito no boletim da Applied Biosystems (1997). Neste procedimento, os dados representam mudanças da expressão gênica com relação ao tecido controle (sem indução da doença periodontal), todos normalizados com o controle endógeno (β -actina). Os resultados do PCR em tempo real foram apresentados como valores de Ct, definido como o número de ciclos em que se começa a detectar a presença de produtos da reação. Assim, quanto maior o valor de Ct, menor a expressão de um gene em determinada amostra. A partir de então, foi calculado o valor de ΔCt através da soma: (Ct do gene alvo na amostra) – (Ct do controle endógeno na mesma amostra). O $\Delta\Delta Ct$, por sua vez, foi calculado a partir dos valores de ΔCt para um mesmo gene em amostras distintas: (ΔCt de um tempo experimental) – (ΔCt do tecido controle). A variação na expressão gênica, ou “fold increase”, foi expresso pelo valor de $2^{\Delta\Delta Ct}$. A partir disso utilizamos os seguintes parâmetros limites (HU *et al.*, 2006):

- aumentos significativos na expressão gênica foram identificados por “fold increase” $\geq 2,0$;
- ausências de alteração na expressão gênica foram identificadas por $0,5001 \geq$ “fold increase” $\geq 1,9999$;

- diminuições significativas na expressão gênica foram identificadas por “fold increase” $\leq 0,5$.

Seqüenciamento dos fragmentos amplificados

Para confirmar a especificidade do ensaio de PCR em tempo real foi realizado o seqüenciamento dos fragmentos amplificados. Para isso, realizamos PCR tradicional, utilizando as mesmas condições descritas para PCR em tempo real, com o “kit” contendo Taq polimerase (Invitrogen), com análise dos amplificados em gel de agarose 2%. Os produtos destas reações foram encaminhados ao Laboratório de Neurociências, da Faculdade de Medicina da USP. A partir de então, foi realizada uma precipitação do DNA presente nas amostras com isopropanol 75% e etanol 70%. Os amplificados resultantes deste processo foram aplicados no seqüenciador ABI 3100 (Applied Biosystems), utilizando-se o reagente Big Dye (Invitrogen) e os mesmos “primers” descritos neste trabalho para as PCRs em tempo real, porém em reações isoladas para os “primers” diretos e o reversos. O pareamento das seqüências obtidas foi realizado com auxílio do programa BLASTn, disponível no “site” do NCBI.

Zimografia

A extração das proteínas dos fragmentos gengivais foi realizada em tampão contendo 50mM Tris-HCl pH 7.4, 0,2M NaCl, 0,1% Triton, 10mM CaCl₂ and 1% de coquetel inibidor de proteases (Sigma), com o auxílio de um triturador Polytron, da Kinematika. A quantificação protéica total foi realizada de acordo com BRADFORD (1976), utilizando uma curva padrão de BSA.

A zimografia para análise da atividade de MMP-2 e -9 foi realizada em gel de poliacrilamida 7,5% contendo gelatina 0,1%. Foram aplicados 70 μ g de proteína por amostra no gel. Após eletroforese, o gel foi lavado à temperatura ambiente com 2.5% Triton X-100, incubado “overnight” em tampão 50mM Tris-HCl, pH 7.4 contendo 0.1 M NaCl e 0.03% de azida sódica, a 37°C. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue (Sigma). As bandas correspondentes à atividade gelatinolítica foram observadas após lavagem com solução contendo metanol 30% e de ácido acético 10%. Os géis foram avaliados pela densitometria das bandas com o programa Science Image.

Contagem de neutrófilos

Os fragmentos gengivais foram fixados em paraformaldeído 10% por doze horas, incluídos em historesina e processados para a obtenção de cortes de 4µm de espessura. Os cortes foram, então, corados com hematoxilina por cinco minutos e eosina por trinta segundos, e lavados em água corrente após cada etapa.

Para contagem das células foi utilizada uma ocular com aumento de dez vezes, acoplada ao microscópio de luz (Olympus) com uma objetiva de cem vezes. Foram contadas os neutrófilos em quinze campos distintos do tecido conjuntivo de cinco lâminas distintas. A partir desses valores foram realizados os testes estatísticos.

Contagem de macrófagos

Os fragmentos removidos foram imersos em meio Tissue Tek, mergulhados em nitrogênio líquido, armazenados em congelador a -80°C e processado em criostato Microm (modelo HM505E) para obtenção de cortes com 7µm de espessura.

Foi utilizado o anticorpo primário de camundongo anti-CD163 (ou anti-ED2, um marcador da linhagem macrofágica) e o anticorpo secundário de cabra anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com peroxidase, ambos da Serotec. Os cortes foram fixados com paraformaldeído 4% por dez minutos no gelo. O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado com 3% de H₂O₂ por quinze minutos à temperatura ambiente e o bloqueio dos sítios inespecíficos com PBS contendo 3% de soro albumina bovina (BSA, da Sigma) por uma hora à temperatura ambiente. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário diluído 1:200 em PBS contendo 3% BSA, “overnight” a 4°C, e após lavagem, com o anticorpo secundário diluído 1:500 em PBS contendo 3% de BSA, por duas horas à temperatura ambiente. Finalmente, foram incubados em solução de revelação por cinco minutos à temperatura ambiente, contendo 0,05% de diaminobenzidina (DAB da Sigma) e 0,003% de H₂O₂. A reação foi bloqueada com água destilada e a contracoloração foi feita com verde de metila por dez minutos à temperatura ambiente.

Para contagem das células foi utilizada uma ocular com aumento de dez vezes, acoplada ao microscópio de luz (Olympus) com uma objetiva de cem vezes. Foram contadas os neutrófilos em quinze campos distintos do tecido conjuntivo de cinco lâminas distintas. A partir desses valores foram realizados os testes estatísticos.

Imunohistoquímica para MMP-2 e -9

Os fragmentos removidos foram imersos em meio Tissue Tek, mergulhados em nitrogênio líquido, armazenados em congelador a -80°C e processado em criostato Microm (modelo HM505E) para obtenção de cortes com 7µm de espessura.

Foram utilizados os anticorpos primários de coelho anti-MMP-2 e anti-MMP-9, ambos da Chemicon, e o anticorpo secundário de cabra anti-imunoglobulina de coelho conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), da Sigma. Os cortes foram fixados com paraformaldeído 4% por dez minutos no gelo. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com a solução de bloqueio da Pierce por uma hora à temperatura ambiente. Os cortes foram incubados separadamente com os anticorpos primários diluídos 1:100 solução de bloqueio (Pierce), “overnight” a 4°C, e após lavagem, com o anticorpo secundário diluído 1:40 solução de bloqueio (Pierce), por duas horas à temperatura ambiente. Os núcleos das células foram contracorados com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, da Sigma), e as lâminas foram montadas em glicerol/PBS (3:1) contendo 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octane (DABCO, da Sigma), como protetor da fluorescência. A imunomarcação foi observada em microscópio Nikon (modelo 50i) equipado com lâmpadas de mercúrio e de halogênio, e as imagens, adquiridas em vídeo-câmara Nikon (modelo DNX 1200F). Os controles da reação foram realizados omitindo-se os anticorpos primários.

Análise estatística dos resultados

Os resultados foram testados por ANOVA (*a priori*) e Tukey (*a posteriori*), considerando significativamente distintos valores de $p \leq 0,050$ e utilizando o programa SYSTAT 10.

Resultados e discussão

Análise da expressão gênica de MMP-2, -7, -9, -14 e RECK

Os resultados das análises de RT-PCR em tempo real estão indicados na **Figura 1**.

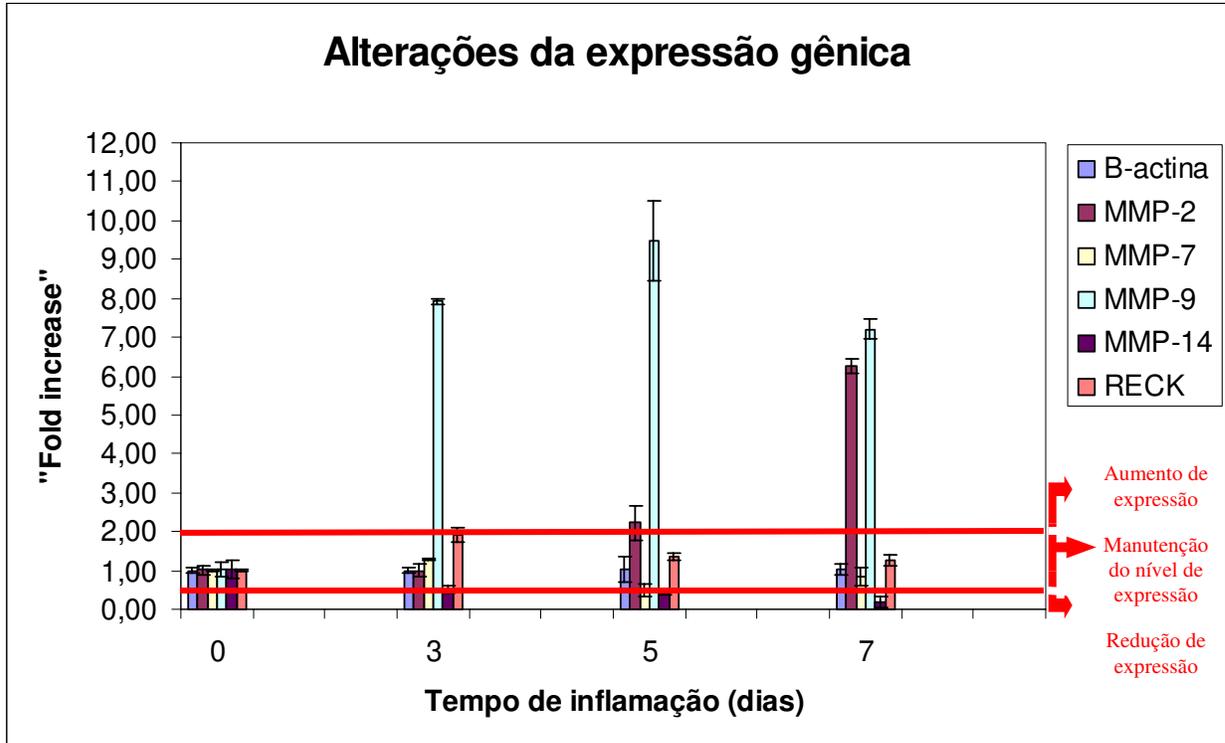


Figura 1. RT-PCR em tempo real. Alterações no padrão de expressão gênica (“fold increase”) de MMP-2, -7, -9, -14 e RECK no tecido periodontal, relativas ao tecido sem inflamação (zero dias de ligadura). O gene β -actina foi utilizado como controle endógeno do experimento.

Entre os tempos experimentais avaliados, podemos notar que não houve alteração na expressão de MMP-7, -14 e RECK. No entanto, há um aumento na expressão de MMP-2 a partir de cinco dias de inflamação induzida. Essa expressão aumenta ainda mais aos sete dias de resposta inflamatória, com um nível aproximadamente seis vezes maior que nos tecidos controle. Com relação à MMP-9, há um aumento abrupto de expressão gênica aos três dias de indução inflamatória, com um pico aos cinco dias (aproximadamente dez vezes mais que no tecido controle) e uma queda aos sete dias. Os dados referentes à expressão de β -actina demonstraram-se coerentes com o esperado, uma vez que tal gene foi selecionado como um controle endógeno justamente por esperar-se que o mesmo não sofre alteração de expressão ao longo das situações experimentais abordadas, nesse caso, com o desenvolvimento da resposta inflamatória.

A ausência de mudanças para os genes MMP-7, MMP-14 e RECK, sugere que estes não apresentam atividade associada à doença periodontal, ao menos no período estudado. No caso do RECK, a manutenção do nível de expressão pode indicar que o mesmo não apresenta papel

regulatório das demais MMPs expressas na patologia, ao menos durante os dias de indução relatados neste trabalho. No entanto, antes de descartar o RECK como elemento inibidor das MMPs no tecido gengival inflamado devemos pensar em estudos para avaliar seu papel na recuperação tecidual se o estímulo inflamatório (no caso a placa bacteriana) fosse removido. É possível que a expressão de RECK seja aumentada com a cessão do estímulo, promovendo uma diminuição da atividade das MMPs cuja expressão foi ampliada e, conseqüentemente, promovendo uma recuperação da gengiva após o término da resposta inflamatória.

No experimento deste trabalho, a construção de curvas de dissociação após o término das reações foi importante, dado que o sistema de detecção em tempo real das amplificações utiliza um corante com afinidade por duplas-fitas de DNA: o SYBR Green. De acordo com os resultados, concluímos que todos os pares de “primers” utilizados em nossos experimentos possibilitaram a obtenção de produtos de reações compostos por apenas um tipo de amplificado.

Ainda com a finalidade de certificar a especificidade das reações, realizamos o seqüenciamento de ambas as fitas de cada um dos amplificados obtidos. Para todos os genes avaliados neste trabalho, exceto MMP-7, foi confirmada a especificidade dos amplificados, considerando um pareamento mínimo de 93% entre as fitas seqüenciadas e a seqüências do “site” do NCBI que foram utilizadas para a construção dos “primers” (**Tabela 2**).

Tabela 2. Resultados de seqüenciamento dos amplificados gênicos pareados com seqüências depositadas no NCBI.

Seqüência	Número de bases seqüenciadas	% de identidade	Acesso (NCBI)
β-actina direto	82	100	NM_031144.2
β-actina reverso	93	100	NM_031144.2
MMP-2 direto	94	93	NM_031054.1
MMP-2 reverso	82	93	NM_031054.1
MMP-9 direto	115	99	NM_031055.1
MMP-9 reverso	96	97	NM_031055.1
MMP-14 direto	107	100	NM_031054.1
MMP-14 reverso	94	100	NM_031054.1
RECK direto	81	100	NM_031055.1
RECK reverso	76	98	NM_031055.1

No caso da MMP-7, encontramos um amplificado seqüenciado que apresentava pareamento com o RNA mensageiro correspondente apenas em suas extremidades. Ao compararmos sua seqüência com àquela depositada no NCBI como correspondente ao DNA genômico da MMP-7, encontramos um pareamento de 100% e percebemos que a porção não pareável das fitas seqüenciadas com o RNA mensageiro representava um íntron. Em uma primeira análise, poderíamos pensar que o ocorrido correspondia a uma contaminação da amostra com DNA genômico. No entanto, essa possibilidade foi descartada, já que a amostra de cDNA utilizada para as reações com todos os demais genes foi a mesma e, se houvesse contaminação, poderíamos evidênciá-la em praticamente todas as reações. Dessa forma, podemos pensar em um provável evento de “splicing” alternativo, de acordo com o qual uma porção correspondente a um íntron deixa de ser clivada do RNA mensageiro primário de MMP-7, podendo afetar a atividade protéica ou até mesmo inviabilizando a tradução.

Análise da atividade de MMP-2 e -9

A zimografia utilizando gelatina como substrato indicou mudanças na atividade de MMP-2 e -9, no decorrer da resposta inflamatória. Houve aumento na atividade de MMP-2 até sete dias de inflamação e, para a MMP-9, houve aumento abrupto aos três dias de inflamação, com queda até sete dias (**Figuras 2 e 3**).

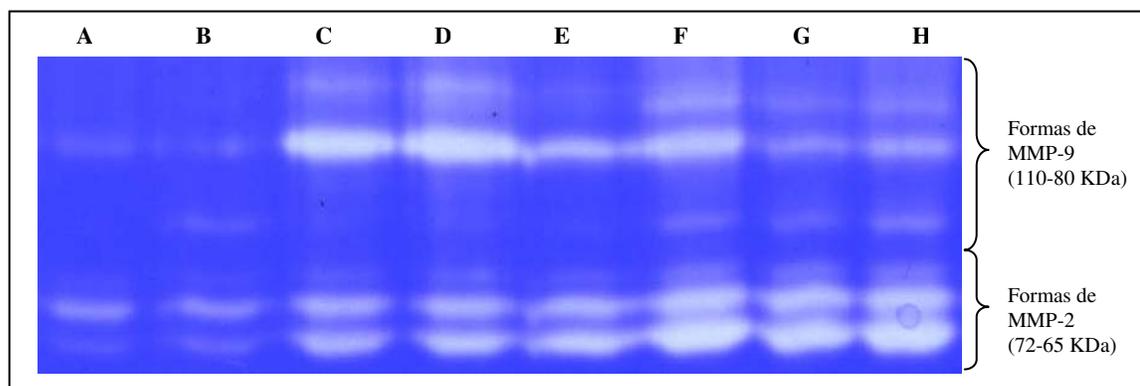


Figura 2. Zimograma em gel contendo gelatina para análise de atividade de MMP-2 e -9 extraídas do tecido gengival. As letras acima da coluna representam: (A e B) animais controle e com (C e D) três dias, (E e F) cinco dias ou (G e H) sete dias de inflamação.

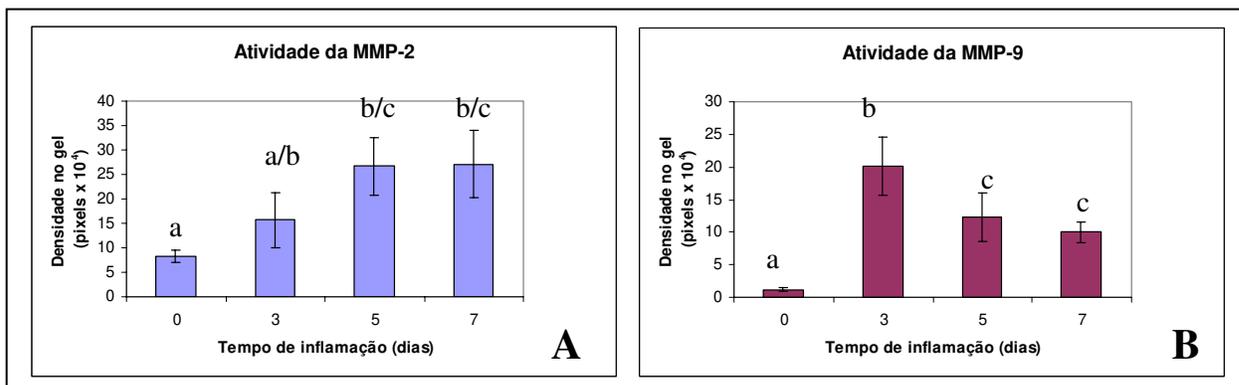


Figura 3. Análise da atividade de MMP-2 (A) e MMP-9 (B) no tecido gengival com os diferentes tempos de indução da doença periodontal. Letras diferentes representam valores diferentes ($p \leq 0,05$; Tukey).

De acordo com BIRKEDAL-HANSEN (1993), a MMP-2 é a metaloproteinase mais abundante da matriz extracelular, sendo secretada por fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, macrófagos, osteoblastos e condrócitos, além de presente no plasma sanguíneo. Quanto a MMP-9, sua produção é mais associada a leucócitos polimorfonucleares. Além disso, a MMP-2 é secretada logo após sua síntese e a MMP-9 é armazenada em grânulos e secretada somente após estímulo. Assim, é provável que o aumento na atividade desta enzima observada nos períodos de doença induzida esteja relacionado à inflamação resultante da ligadura (SOUZA *et al.*, 1999).

Os resultados encontrados complementam a expressão do RNA mensageiro para as MMPs. No caso da MMP-9, vemos um pico de atividade enzimática aos três dias de inflamação e um pico de expressão gênica aos cinco dias. Mas como podemos explicar um fenômeno de expressão protéica anterior a um fenômeno de expressão gênica? Para responder a esta pergunta, atentamos para dois detalhes importantes: 1) a proteína MMP-9 pode ter sido trazida já pronta para o sítio inflamatório juntamente com células migrantes e 2) as células que estão secretando MMP-9 não são necessariamente as mesmas que estão transcrevendo seu RNA mensageiro.

Contagem de neutrófilos e macrófagos

Para avaliar o influxo de células que acomete o tecido gengival durante o desenvolvimento da resposta inflamatória, realizamos a contagem de neutrófilos e macrófagos (Figuras 4 e 5).

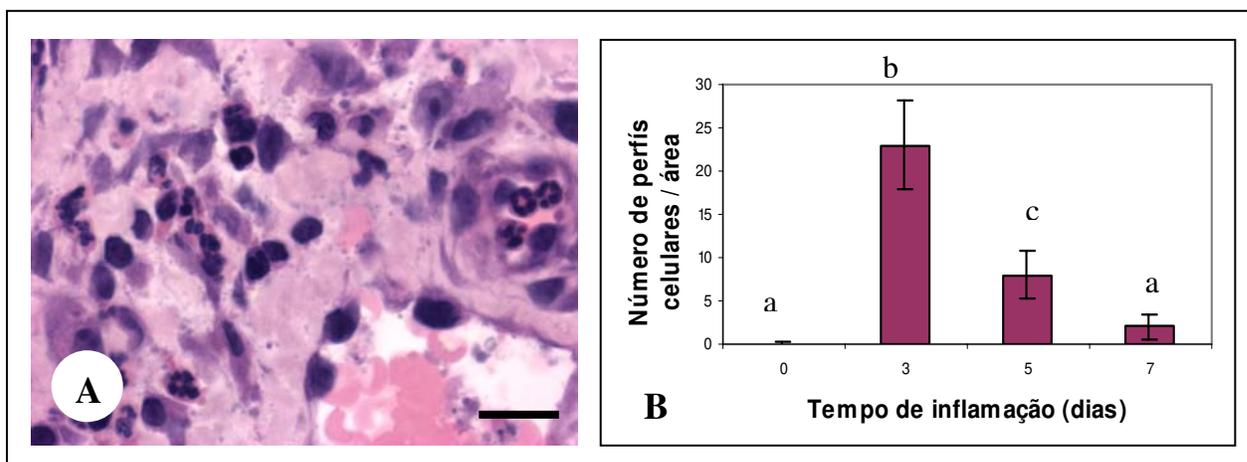


Figura 4. (A) Neutrófilos no infiltrado inflamatório do tecido acometido pela doença periodontal. Coloração com hematoxilina e eosina. Barra representa 15μm. (B) Cinética da infiltração de neutrófilos. A área de contagem representa aproximadamente 0,2mm², em um microscópio de luz com aumento final de 1000X. Letras diferentes representam valores diferentes ($p \leq 0,05$; Tukey).

Há um pico de neutrófilos aos três dias após a indução da doença, seguido por uma significativa redução no número dessas células nos demais tempos experimentais. Como já era de se esperar, os neutrófilos parecem formar a primeira linha de defesa contra a agressão ao hospedeiro. Encontradas na circulação periférica, estas células são as primeiras a atingir o local de inflamação e compreendem cerca de 50% a 70% do total da população de leucócitos. Uma vez que atingem o sítio inflamatório, os neutrófilos liberam uma série de elementos armazenados em seus grânulos pré-produzidos, incluindo diversas proteases como algumas MMPs (KOBAYASHI *et al.*, 2005).

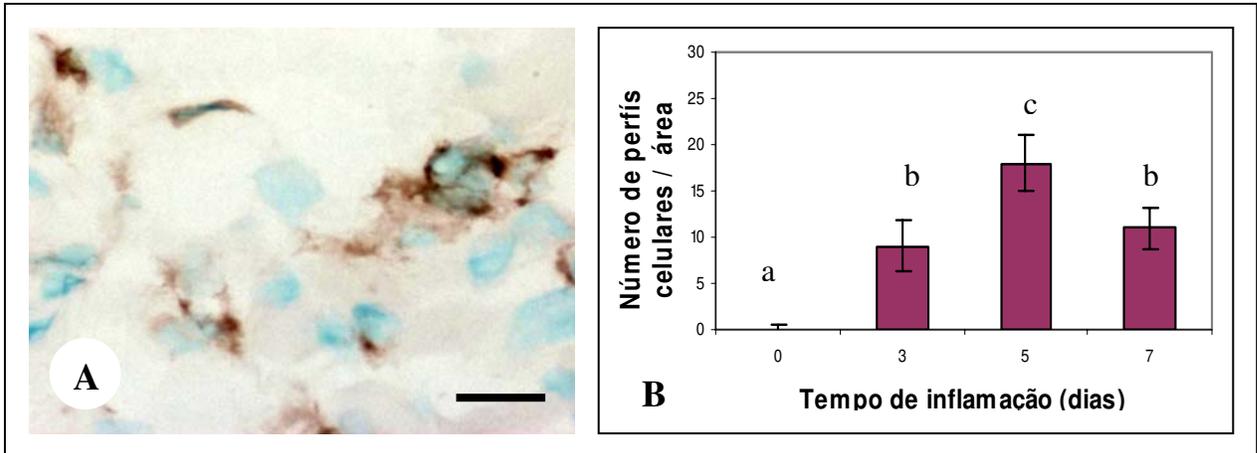


Figura 5. (A) Macrófagos no infiltrado inflamatório do tecido acometido pela doença periodontal. Imunocitoquímica e contracoloração com verde de metila. Barra representa 15 μ m. (B) Cinética da infiltração de macrófagos. Cada área de contagem representa aproximadamente 0,2 mm², em um microscópio de luz com aumento final de 1000X. Letras diferentes representam valores diferentes ($p \leq 0,05$; Tukey).

No caso dos macrófagos, o pico de migração surge em cinco dias após indução, com a permanência dessas células ainda no sétimo dia. Os macrófagos são células capazes de responder a diversos sinais no sítio inflamatório, ativando a expressão gênica de vários componentes como citocinas ou proteases (SCHUPPAN & RUHL, 1994). Podemos pensar que uma remodelagem no tecido gengival, como já avaliamos em outros trabalhos, pode ser decorrente da liberação de tais elementos por macrófagos recrutados para o sítio inflamatório.

Quando comparamos os dados de expressão gênica e atividade protéica com os dados de migração de células inflamatórias, podemos perceber uma sobreposição de determinados eventos, tais como:

- MMP-2 apresenta um aumento contínuo na expressão gênica e na protéica até os sete dias de indução da inflamação, indicando que sua produção deve estar vinculada a células residentes no tecido gengival;
- o pico de expressão gênica para MMP-9 ocorre no mesmo período que o perfil de migração de macrófagos, indicando que estas células possam ser uma fonte em potencial para esta enzima;

- o pico de atividade protéica para MMP-9 ocorre no mesmo período que o perfil de migração de neutrófilos, indicando que estas células possam ser um fonte em potencial para esta enzima a partir de seus grânulos pré-formados.

Imunolocalização de MMP-2 e -9

Para avaliar a produção de MMP-2 e -9 por populações celulares específicas, realizamos um ensaio de imunomarcção (**Figuras 6 e 7**). A MMP-2 apresentou marcação da camada basal do epitélio e de células do tecido conjuntivo, mais acentuada aos cinco e sete dias. As células marcadas na matriz extracelular do tecido afetado apresentaram uma morfologia distinta da observada no tecido sadio, com um formato arredondado e menos fusiforme, indicando que a expressão de MMP-2 possa estar relacionada com um aumento na atividade de fibroblastos, que adquirem um citoplasma mais volumoso. A MMP-9 revelou a marcação de células epiteliais basais, células do tecido conjuntivo e células no interior dos vasos sanguíneos. Estas últimas apresentaram uma marcação mais acentuada e foram encontradas em maior quantidade nos tecidos referentes a três e cinco dias de indução da resposta inflamatória, fortalecendo a hipótese de que a MMP-9 é trazida ao sítio inflamatório no interior de células como neutrófilos migrantes.

Tais resultados se mostraram coerentes com os experimentos de análise de migração de neutrófilos e macrófagos, sugerindo uma relação estreita entre a chegada de leucócitos ao local da inflamação e a produção e/ou secreção de MMP-2 e -9, com o conseqüente avanço da doença periodontal no tecido gengival.

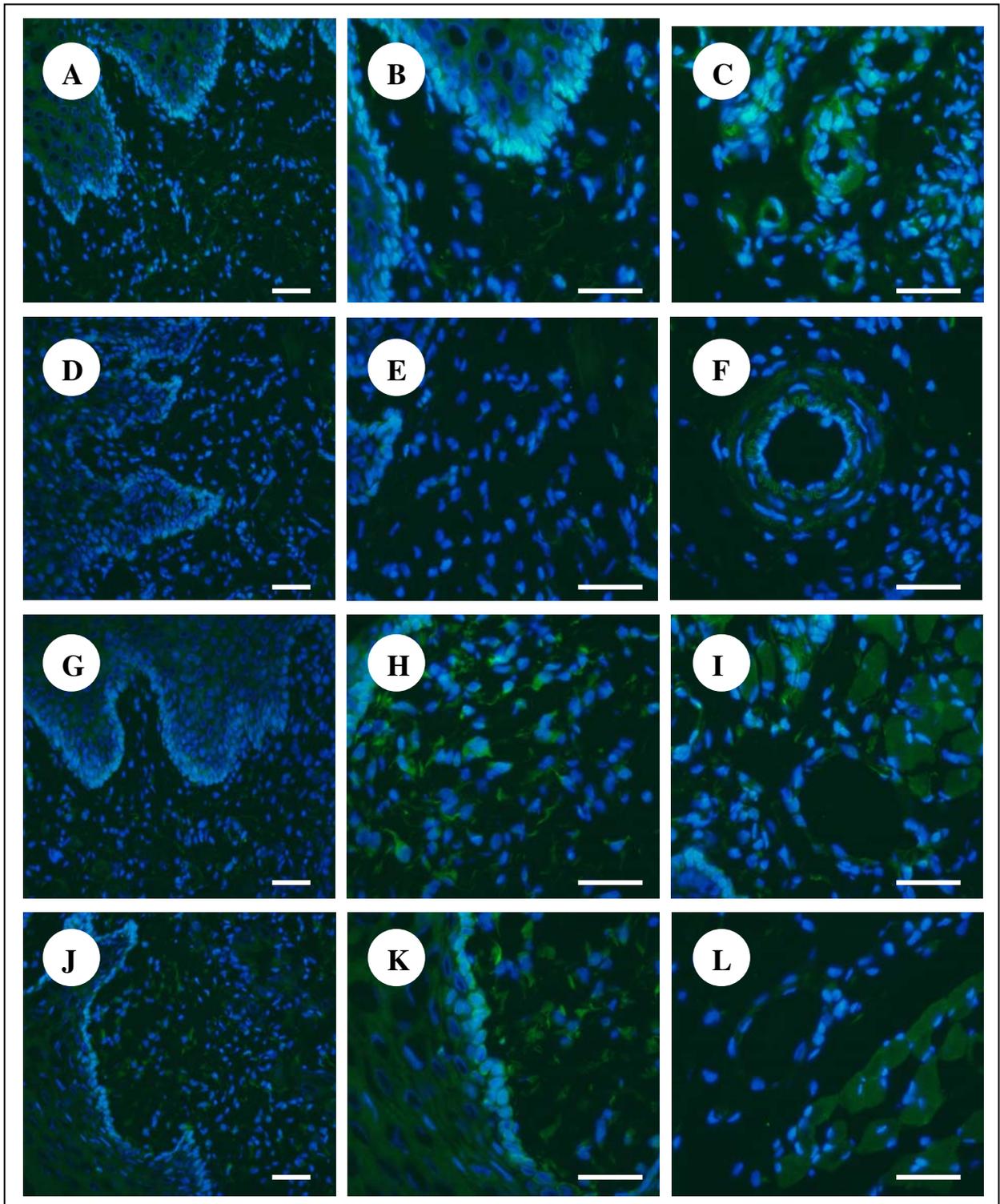


Figura 6. Imunohistoquímica para MMP-2 no tecido gengival. Barras representam 25 μ m. Os tempos de inflamação são: (A, B e C) zero dias, (D, E, e F) três dias, (G, H e I) cinco dias e (J, K e L) sete dias. Em cada tempo temos visão geral do tecido (A, D, G e J), região de tecido conjuntivo próxima ao epitélio oral (B, E, H e K) e detalhe de vaso sanguíneo (C, F, I e L).

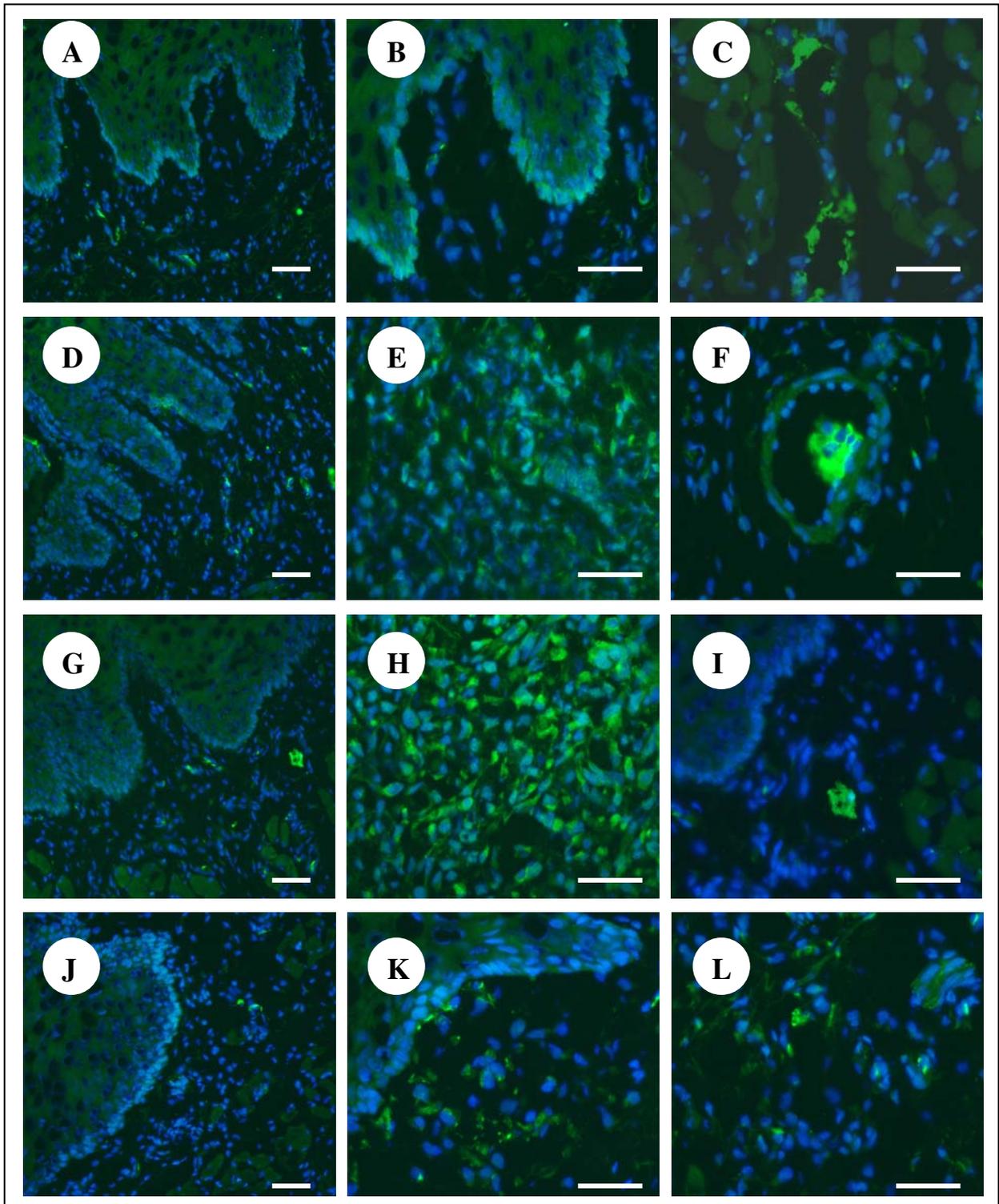


Figura 7. Imunohistoquímica para MMP-9 no tecido gengival. Barras representam 25 μ m. Os tempos de inflamação são: (A, B e C) zero dias, (D, E, e F) três dias, (G, H e I) cinco dias e (J, K e L) sete dias. Em cada tempo temos visão geral do tecido (A, D, G e J), região de tecido conjuntivo próxima ao epitélio oral (B, E, H e K) e detalhe de vaso sanguíneo (C, F, I e L).

Conclusões

Os resultados deste trabalho indicam o envolvimento de MMP-2 e -9 nas modificações iniciais associadas à doença periodontal. De acordo com outros grupos de pesquisa e experimentos desenvolvidos em nosso laboratório, a gengiva passa por algumas modificações morfológicas caracterizadas pela degradação de componentes da matriz extracelular local. Dentre estas modificações, a mais marcante é a diminuição na área ocupada por fibras colagênicas, cuja redução pode atingir valores de até 70% entre três e quatro dias a partir da resposta inflamatória instalada (PAYNE *et al.*, 1975).

Nossos resultados indicam que a MMP-7 e -14, e o gene RECK não estão envolvidos no processo inicial de progressão da doença periodontal induzida no modelo animal abordado neste trabalho. Novos testes devem ser realizados para averiguar a expressão protéica destes componentes no mesmo modelo com o intuito de confirmar tal hipótese. No caso do gene RECK, deveríamos realizar experimentos para avaliar o comportamento do mesmo após a eliminação do agente causador da inflamação, buscando verificar se o gene não possui algum papel relevante no processo de recuperação tecidual.

Os amplificadores de MMP-7 apresentaram um íntron em sua composição. Assim, considerando que tal reação não tenha sido derivada de uma contaminação com DNA genômico (dadas as evidências para os demais genes), novos estudos deverão ser desenvolvidos para verificar a possibilidade de ocorrência de um fenômeno de “splicing” alternativo, talvez associado diretamente a um mecanismo de controle da expressão desta proteinase no desenvolvimento inicial da doença periodontal. Esta idéia é apoiada pela revisão de STERNLICHT & WERB (2001), descrevendo as diversas etapas de regulação das MMPs, incluindo o processamento diferencial de RNAs mensageiros.

A expressão de MMP-2 e -9 revelou um perfil bastante coerente com o avanço e a dinâmica do processo inflamatório. A MMP-2 foi encontrada com um aumento crescente em relação à expressão gênica e protéica até os sete dias de indução da doença periodontal. Aliando-se tal fato aos resultados de imunohistoquímica para esta enzima, concluímos que sua principal origem provém de células epiteliais e fibroblastos, embora o aumento de marcação no tecido conjuntivo gengival a partir dos cinco dias de indução, nos leve a acreditar que macrófagos também possam estar associados a produção de MMP-2. Para a MMP-9, encontramos uma

relação bastante sugestiva entre a migração de neutrófilos e macrófagos para o sítio inflamatório e os níveis de expressão gênica e atividade protéica, indicando que estas células possam ser responsáveis por sua produção e secreção. A expressão gênica de MMP-9 foi similar à curva de migração de macrófagos (com pico aos cinco dias de indução da doença), indicando que tais células possam se tornar ativadas e passar a expressar o gene desta proteinase a partir dos sinais inflamatórios produzidos no local.

Particularmente no caso dos neutrófilos, diversos trabalhos relatam o armazenamento de proteases no interior de grânulos presentes no citoplasma celular. A degradação de matriz extracelular pelas proteinases derivadas de neutrófilos representam um papel fundamental para o desenvolvimento de processos normais deste tipo celular, como penetração em barreiras teciduais, remoção de restos teciduais e remodelação tecidual (OWEN & CAMPBELL, 1995). Como os neutrófilos maduros normalmente não sintetizam proteinases, essas proteínas encontram-se armazenadas em seus grânulos citoplasmáticos que foram formados em diferentes estágios da diferenciação celular (GRANELLI-PEPERNO *et al.*, 1977; TAKAHASHI *et al.*, 1988; HANSON *et al.*, 1990; STURROCK *et al.*, 1992). Assim, a síntese de elementos como algumas MMPs parece ocorrer completamente em precursores da medula óssea dos neutrófilos. A MMP-9 é uma destas enzimas, que permanece armazenada como proenzima em pequenas vesículas até a ativação celular, quando decorre sua rápida liberação no meio extracelular (DEWALD *et al.*, 1982; HASTY *et al.*, 1986; BOXER & SMOLEN, 1988; MURPHY & DOCHERTY, 1992). Nossos resultados sugerem que o aumento abrupto na atividade detectada para MMP-9 tecidual possa ser decorrente da chegada de neutrófilos e sua posterior degranulação, logo aos três dias de resposta inflamatória.

Dessa forma, considerando o fato de que pouco ainda é conhecido sobre a localização das MMPs *in vivo* e levando em conta a diversidade de resultados obtidos a partir de técnicas variadas de análise (DAHAN *et al.*, 2001), além da pouca disposição de modelos animais relacionados à doença periodontal (TODESCAN, 2001), esperamos que nossos resultados sirvam como suporte para a compreensão dos mecanismos moleculares relacionados ao desenvolvimento inicial da doença periodontal. Além disso, sugerimos que uma avaliação completa do efeito das MMPs na progressão da doença deve ser estudada abrangendo outros componentes como inibidores e moléculas auxiliares no processo de ativação enzimática.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer aos pesquisadores do centro APTA Citrus Sylvio Moreira, Dra. Alessandra Alves e ao Prof. Dr. Marcos Antonio Machado pelo auxílio nos experimentos de RT-PCR em tempo real. Agradecemos também às pesquisadoras Bárbara Fonseca Nogueira e à Profa. Dra. Elida Paula Benquique Ojopi, do Departamento de Psiquiatria, Faculdade de Medicina, USP, pela colaboração no seqüenciamento dos amplificadores de PCR.

Referências bibliográficas

- APPLIED BIOSYSTEMS (1997) Relative quantitation of gene expression. User bulletin No. 2.
- BOXER, L. A. & SMOLEN, J. E. (1988) Neutrophil granule constituents and their release in health and disease. *Hematology/Oncology Clinics of North América*, 2: 101-134.
- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method of quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- BIRKEDAL-HANSEN, H. (1993) Role of matrix metalloproteinases in human periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 64: 474-484.
- DAHAN, M.; NAWROCKI, B.; ELKAÏM, R.; SOELL, M. BOLCATO-BELLEMIN, A.-L.; BIREMBAUT, P. & TENEMBAUM, H. (2001) Expression of matrix metalloproteinases in healthy and diseased human gingiva. *Journal of Clinical Periodontology*, 28: 128-136.
- DEWALD, B.; BRETZ, U. & BAGGILINI, M. (1982) Release of gelatinase from a novel secretory compartment of human neutrophils. *Journal of Clinical Investigation*, 70: 518-525.
- FULLMER, H. & GIBSON, W. (1966) Collagenolytic activity of gingivae of man. *Nature*, 209: 728-729.
- GOLUB, L; WOLFF, M.; LEE, H.; MCNAMARA, T.; RAMAMURTHY, N.; ZAMBON, J. & CIANCIO, S. (1985) Further evidence that tetracyclines inhibit collagenase activity in human crevicular fluid and from other mammalian sources. *Journal of Periodontal Research*, 20: 12-23.

- GOLUB, L.; CIANCIO, S.; RAMAMURTHY, N.; LEUNG, M. & MCNAMARA, T. (1990) Low dose doxycycline therapy: effect on gingival and crevicular fluid collagenase activity in humans. *Journal of Periodontal Research*, 25: 321-330.
- GOLUB, L.; SORSA, T.; LEE, H. M.; CIANCIO, S.; SORBI, D. & RAMAMURTHY, N. (1995) Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. *Journal of Clinical Periodontology*, 21: 1-9.
- GRANELLI-PEPERNO, A.; VASSALLI, J.-D. & REICH, E. (1977) Secretion of plasminogen activator by human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 146: 1693-1706.
- HANSON, R. B.; CONNOLLY, N. L.; BURNETT, D.; CAMPBELL, E. J.; SENIOR, R. M. & LEY, T. J. (1990) Developmental regulation of the human cathepsin G gene in myelocytic cells. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 1524-1530.
- HASTY, K. A.; HIBBS, M. S.; KANG, A. H. & MAINARDI, C. L. (1986) Secreted forms of human neutrophil collagenase. *Journal of Biological Chemistry*, 261: 5645-5650.
- HU, N.; QIAN, L.; HU, Y.; SHOU, J.-Z.; WANG, C.; GIFFEN, C.; WANG, Q.-H.; WANG, Y.; GOLDESTEN, A. M.; EMMERT-BUCK, M. & TAYLOR, P. R. (2006) Quantitative real-time RT-PCR validation of differential mRNA expression of SPARC, FADD, Fascin, COL7A1, CK4, TGM3, ECM1, PPL and EVPL in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, 6: 33.
- JOHNSON, I. H. (1975) Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *Journal of Periodontal Research*, 10: 332-345.
- KOBAYASHI, S. D.; VOYICH, J. M.; BURLAK, C. & DELEO, F. R. (2005) Neutrophils in the innate immune response. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 53: 505-517.
- LEE, W.; AITKEN, S.; SODEK, J. & MCCULLOCH, C. (1995) Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 30: 23-33.
- LINDHE, J. (1999) *Tratado de periodontologia clínica e implantologia oral*. Terceira edição. Editora Guanabara Koogan.

- MURPHY, G. & DOCHERTY, A. J. P. (1992) The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 7: 120-125.
- NATHAN, C. (2002) Points of control in inflammation. *Nature*, 420: 846-852.
- OH, J.; TAKAHASHI, R.; KONDO, S.; MIZOGUCHI, A.; ADACHI, E.; SASAHARA, R. M.; NISHIMURA, S.; IMAMURA, Y.; KITAYAMA, H.; ALEXANDER, D. B.; IDE, C.; HORAN, T. P.; ARAKAWA, T.; YOSHIDA, H.; NISHIKAWA, S.-I.; ITOH, Y.; SEIKI, M.; ITOHARA, S.; TAKAHASHI, C. & NODA, M. (2001) The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell*, 107: 789-800.
- OWEN, C. A. & CAMPBELL, E. J. (1995) Neutrophil proteinases and matrix degradation. The cell biology of pericellular proteolysis. *Seminars in Cell Biology*, 6: 367-376.
- OZMERIC, N. (2004) Advances in periodontal disease markers. *Clinica Chimica Acta – International Journal of Clinical Chemistry*, 343: 1-16.
- PAPAPANOU, P. N.; WENNSTRÖM, J. L. & GRÖNDAHL, K. (1989) A ten-year retrospective study of periodontal disease progression. *Journal of Clinical Periodontology*, 16: 403-411.
- PARKS, W. C.; WILSON, C. L. & LOPEZ-BOADO, Y. S. (2004) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Reviews – Immunology*, 4: 617-629.
- PAYNE, W. A.; PAGE, R. C.; OLVIGIE, A. L.; HALL, W. B. (1975) Histopathologic features of the initial and early stages of experimental gingivitis in man. *Journal of Periodontal Research*, 10: 51-64.
- REYNOLDS, J. J.; HEMBRY, R. M. & MEIKLE, M. C. (1994) Connective tissue degradation in health and periodontal disease and the roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors. *Advances in Dental Research*, 8: 312-319
- RHEE, J.-S. & COUSSENS, L. M. (2002) RECKing MMP function: implications for cancer development. *TRENDS in Cell Biology*, 12: 209-211.
- RYAN, M. E. & GOLUB, L. M. (2000) Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy. *Periodontology 2000*, 24: 226-238.
- SASAHARA, R. M.; TAKAHASHI, C. & NODA, M. (1999) Involvement of the Sp1 site in the *rās*-mediated downregulation of the RECK metastasis suppressor gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 264: 668-675.

- SODEK, J. & OVERALL, C. (1992) Matrix metalloproteinases in periodontal tissue remodelling. *Matrix, Suppl*: 352-362.
- SORSA, T.; UITTO, V. J.; SUOMOLAINEN, M.; VAUHKONEN, M. & LINDY, S. (1988) Comparison of interstitial collagenases from human gingiva, sulcular fluid and polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Periodontal Research*, 23: 386-393.
- SOUZA, A. P.; TREVILATTO, P. C.; ZAIA, A. A.; LINE, S. R. P. (1999) Análise bioquímica das metaloproteases da matriz extracelular durante atrofia experimental das glândulas salivares submandibulares em ratos. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo*, 13: 135-139.
- STERNLICHT, M. D. & WERB, Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17: 463-516.
- STURROCK, A. B.; FRANKLIN, K. F.; RAO, G.; MARSHALL, B. C.; REBENTISCH, M. B.; LEMONS, R. S. & HOIDAL, J. R. (1992) Structure, chromosomal assignment and expression of the gene for proteinase-3. The Wagener's granulomatosis autoantigen. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 21193-21199.
- TAANI, D. S. (1997) Association between cigarette smoking and periodontal health. *Quintessence International*, 28: 535-539.
- TAKAHASHI, C.; SHENG, Z.; HORAN, T. P.; KITAYAMA, H.; MAKI, M.; HITOMI, K.; KITAURA, Y.; TAKAI, S.; SASAHARA, R. M.; HORIMOTO, A.; IKAWA, Y.; RATZKIN, B. J.; ARAKAWA, T. & NODA, M. (1998) Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America*, 95: 13221-13226.
- TAKAHASHI, H.; NUKIWA, T.; BASSET, P. & CRYSTAL, R. G. (1988) Myelomonocytic cell lineage expression of the neutrophil elastase gene. *Journal of Biological Chemistry*, 263: 2543-2547.
- TODESCAN, J. H. (2001) *Doença Periodontal. Conceitos e classificações*. Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda.
- UITTO, V. J.; FIRTH, J.; NIP, L. & GOLUB, L. (1994) Doxycycline and chemically modified tetracyclines inhibit gelatinase A (MMP-2) gene expression in human skin keratinocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 732: 140-151.

VAN DER ZEE, E.; EVERTS, V. & BEERTSEN, W. (1997) Cytokines modulate routes of collagen breakdown. Review with special emphasis on mechanisms of collagen degradation in the periodontum and the burst hypothesis of periodontal disease progression. *Journal of Clinical Periodontology*, 24: 297-305.

WELM, B.; MOTT, J. & WERB, Z. (2002) Developmental biology: vasculogenesis is a wreck without RECK. *Current Biology*, 12: 209-211.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados do presente trabalho nos permitiram chegar às seguintes conclusões, baseadas nos ensaios de indução da doença periodontal em ratos, nos primeiros estágios da reação inflamatória no tecido gengival:

- 1) A microbiota bacteriana associada à doença apresentou uma dinâmica característica de formação da placa bacteriana, com a substituição de microrganismos Gram-positivos normalmente encontrados na cavidade oral por Gram-negativos.
- 2) Não foram observadas modificações na camada de fibras reticulares junta à membrana basal do epitélio até os sete dias de inflamação induzida.
- 3) A área ocupada pelas fibras de colágeno fibrilar no tecido conjuntivo gengival apresentou uma redução de até 35% aos sete dias de inflamação induzida.
- 4) Apesar da redução na área ocupada pelas fibras colagênicas e da visível diminuição das mesmas com o avanço da resposta inflamatória, foi observado um aumento na quantidade de fibras mais espessas (de maior calibre).
- 5) Tanto a MMP-2 quanto a MMP-9 apresentaram modificações significativas ao longo da evolução da doença nos tempos experimentais estudados, afirmando a hipótese de que as mesmas estejam relacionadas com o intenso processo de remodelação da matriz extracelular que acomete o tecido gengival.
- 6) A análise do perfil de células inflamatórias migrantes para o sítio gengival, particularmente neutrófilos e macrófagos, juntamente com a imunomarcagem tecidual de MMP-2 e -9 e a avaliação da expressão gênica e atividade das mesmas nos levam a indicar alguns de seus potenciais produtores. A MMP-2 parece estar sendo secretada por células locais do tecido gengival avaliado, como células epiteliais e fibroblastos, além de

macrófagos recém-recrutados. A MMP-9 parece estar mais associada às células inflamatórias, sendo trazida em grandes quantidades aos três dias de inflamação dentro dos grânulos pré-sintetizados de neutrófilos e produzida posteriormente pelos macrófagos ativados no sítio.

- 7) A expressão gênica de MMP-7 e -14, e de RECK não sofreram alterações ao longo dos tempos inflamatórios estudados.
- 8) A presença de um fragmento idêntico a um íntron no amplificado derivado da PCR para MMP-7 nos sugerem que tal enzima possa ter sua produção regulada por um mecanismo de controle baseado no processamento alternativo do RNA mensageiro respectivo.
- 9) O modelo animal estudado neste trabalho apresentou características relevantes e bastante coerentes com as descrições de mudanças associadas à doença periodontal encontradas na literatura, inclusive no que se refere a casos em humanos. Estas evidências indicam que o modelo de ligadura em ratos pode ser utilizado como uma ferramenta eficiente de análises da progressão da doença periodontal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, C. M. & WERB, Z. (1991) Extracellular matrix degradation. In Cell Biology of Extracellular matrix (Edited by Hay, E. D.). Second Edition. Plenum Press.
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY (1999) International workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology*, 4: 8-38.
- ARNO, A.; WAERHAUG, J.; LOVDAL, A. & SCHEI, O (1958) Incidence of gingivitis as related to sex, occupation, tobacco consumption, toothbrushing, and age. *Oral Surgery, Oral Medicin and Oral Pathology*, 11: 587-595.
- BARTOLD, P. M. & NARAYANAN, A. S. (2006) Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontology 2000*, 40: 29-49.
- BASCONES-MARTÍNEZ, A. & FIGUERO-RUIZ, E. (2004) Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 9: 92-107.
- BAKER, P. J. & ROOPENIAN, D. C. (2002) Genetic susceptibility to chronic periodontal disease. *Microbes and Infection*, 4: 1157-1167.
- BERGSTROM, J. (1989) Cigarette smoking as risk factor in chronic periodontal disease. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 7: 245-247.
- BLACK, J. G. (2002) *Microbiologia: Fundamentos e perspectivas. Doenças orais e gastrointestinais. Quarta Edição.* Editora Guanabara-Koogan.
- CARDOSO, R. J. A. & GONÇALVES, E. A. N. (2002) *Periodontia, cirurgia para implantes, cirurgia e anestesiologia. Volume 5.* Editora Artes Médicas.
- CATERINA, J. J.; YAMADA, S.; CATERINA, N. C.; LONGENECKER, G.; HOLMBACK, K.; SHI, J.; YERMOVSKY, A. E.; ENGLER, J. A. & BIRKEDAL-HANSEN, H. (2000) Inactivation mutation of the mouse tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) gene alters proMMP-2 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 26416-26422.
- COHEN, N.; MORISSET, J. & EMILIE, D. (2004) Induction of tolerance by *Porphyromonas gingivalis* on APCS: a mechanism implicated in periodontal infection. *Journal of Dental Research*, 83: 429-433.
- COLEMAN, J. W. (2001) Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, 1: 1397-1406.

- DAHAN, M.; NAWROCKI, B.; ELKAÏM, R.; SOELL, M. BOLCATO-BELLEMIN, A.-L.; BIREMBAUT, P. & TENEMBAUM, H. (2001) Expression of matrix metalloproteinases in healthy and diseased human gingiva. *Journal of Clinical Periodontology*, 28: 128-136.
- DAHLEN, G.; MANJI, F.; BAEUM, V. & FEJERSKOV, O. (1992) Putative periodontopathogens in “diseased” and “non-diseased” persons exhibiting poor buccal hygiene. *Journal of Clinical Periodontology*, 19: 35-42.
- EJEIL, A.-L.; GAULTIER, F.; IGONDJO-TCHEN, S.; SENNI, K.; PELLAT, B.; GODEAU, G. & GOGLY, B. (2003) Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression? *Journal of Periodontology*, 74: 196-201.
- FENG, Z. & WEINBERG, A. (2006) Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontology 2000*, 40: 50-76.
- GAMONAL, J.; BASCONES, A. & SILVA, A. (1999) Las quimioquinas en la patogénesis de la periodontitis. *Avances in Periodoncia*, 11: 89-95.
- GEIVELIS, M.; TURNER, D. W.; PEDERSON, E. D. & LAMBERTS, B. L. (1993) Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 64: 980-983.
- GOMEZ, D. E.; ALONSO, D. F.; YOSHIJI, H. & THORGEIRSSON, U. P. (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *European Journal of Cell Biology*, 74: 111-122.
- GRAVES, D. T. & COCHRAN, D. (2003) The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology*, 74: 391-401.
- GROSSI, S. G.; GENCO, R. J.; MACHTEI, E. E.; HO, A. W.; KOCH, G.; DUNFORD, R.; ZAMBON, J. J. & HAUSMANN, E. (1995) Assessment of risk for periodontal disease. Risk indicators for alveolar bone loss. *Journal of Periodontology*, 66: 23-29.
- HABER, J.; WATTLES, J.; CROWLEY, M.; MANDELL, R.; JOSHIPURA, K. & KENT, R. L. (1993) Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *Journal of Periodontology*, 64: 16-23.
- HEASMAN, L.; STACEY, F.; PRESHAW, P. M.; MCCRACKEN, G. I.; HEPBURN, S. & HEASMAN, P. A. (2006) The effect of smoking on periodontal treatment response: a review of clinical evidence. *Journal of Clinical Periodontology*, 33: 241-253.

- HENDERSON, B.; NAIR, S. P.; WARD, J. M. & WILSON, M. (2003) Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Annual Review of Microbiology, 57: 29-55.
- HIROSE, K.; ISOGAI, E.; MIURA, H. & UEDA, I. (1997) Levels of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae and inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid from adult human subjects. Microbiology and Immunology, 41: 21-26.
- KANTARCI, A. & VAN DYKE, T. E. (2005) Resolution of inflammation in periodontitis. Journal of Periodontology, 76: 2168-2174.
- KELK, P.; JOHANSSON, A.; CLAEISSON, R.; HANSTROM, L. & KALFAS, S. (2003) Caspase 1 involvement in human monocyte lysis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. Infection and Immunity, 71: 4448-4455.
- KINANI, D. F. (1992) Metalloproteinases in the pathogenesis of periodontal diseases. Current Opinion in Dentistry, 2: 25-32.
- KOLENBRANDER, P. E. (2000) Oral microbial communities: biofilms, interactions and genetic systems. Annual Review of Microbiology, 54: 413-437.
- KOMATSU, T.; KUBOTA, E. & SAKAI, N. (2001) Enhancement of matrix metalloproteinase (MMP)-2 activity in gingival tissue and cultured fibroblasts from Down's syndrome patients. Oral Diseases, 7: 45-55.
- KORNMAN, K. S.; CRANE, A.; WANG, H. Y.; DI GIOVINE, F. S.; NEWMAN, M. G.; PIRK, F. W.; WILSON, T. G.; HIGGINBOTTOM, F. L. & DUFF, G. W. (1997) The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. Journal of Clinical Periodontology, 24: 72-77.
- LAPPIN, D. F.; MACLEOD, C. P.; KERR, A.; MICHELL, T. & KINANR, D. (2001) Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. Clinical and Experimental Immunology, 123: 294-300.
- LINDHE, J. (1999) Tratado de periodontologia clínica e implantologia oral. Terceira edição. Editora Guanabara Koogan.
- LISTGARTEN, M. A. (1986) Pathogenesis of periodontitis. Journal of Clinical Periodontology, 13: 418-425.

- LIU, R. K.; CAO, C. F.; MENG, H. X. & GAO, Y. (2001) Polymorphonuclear neutrophils and their mediators in gingival tissues from generalized aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology*, 72: 1545-1553.
- LÖE, H.; THEILADE, E. & JENSEN, S. B. (1965) Experimental gingivitis in man. *Journal of Periodontology*, 36: 177-187.
- LOESCHE, W. J. & SYED, S. A. (1978) Bacteriology of human experimental gingivitis: effect of plaque and gingivitis score. *Infection and Immunity*, 21: 830-839.
- MADIANOS, P. N.; PAPAPANOU, P. N. & SANDROS, J. (1997) *Porphyromonas gingivalis* infection of oral epithelium inhibits neutrophil transepithelial migration. *Infection and Immunity*, 65: 3983-3990.
- MAKELA, M.; SALO, T.; UITTO, V. J. & LARVAJA, H. (1994) Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *Journal of Dental Research*, 73: 1397-1406.
- MARSH, P. D. (1994) Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Advances in Dental Research*, 8: 263-271.
- MEISEL, P.; TIMM, R.; SAWAF, H.; FANGHANEL, J.; SIEGMUND, W. & KOCHER, T. (2000) Polymorphism of the N-acetyltransferase (NAT2), smoking and the potential risk of periodontal disease. *Archives of Toxicology*, 74: 343-348.
- MEZYK-KOPEC, R.; BZOWSKA, M.; POTEMPA, J.; BZOWSKA, M.; JURA, N.; SROKA, A.; BLACK, R. A. & BERETA, J. (2005) Inactivation of membrane tumor necrosis factor alpha by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity*, 73: 1506-1514.
- MIYASAKI, K. T. (1991) The neutrophil mechanism of controlling periodontal bacteria. *Journal of Periodontology*, 62: 761-774.
- MICHALOWICZ, B. S. (1994) Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 65:479-488.
- MICHALOWICZ, B. S.; DIEHL, S. R.; GUNSOLLEY, J. C. SPARKS, B. S.; BROOKS, C. N.; KOERTGE, T. E.; CALIFANO, J. V.; BURMEISTER, J. A. & SCHENKEIN, H. A. (2000) Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *Journal of Periodontology*, 71: 1699-1707.

- MOORE, W. E. C. & MOORE, L. V. H. (1994) The bacteria of periodontal diseases. *Periodontology*, 5: 66-77.
- MOREIRA, A. N.; CANIGGIA, L. F.; FERREIRA, R. C.; VERONICA, C.; ALONSO, C. & PIOVANO, S. (2001) Effect of supragingival plaque control on subgingival microflora and periodontal tissues. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, 15: 119-126.
- NAESSE, E. P.; SCHEURS, O.; HELGELAND, K. & STEINSVOLL, S. (2003) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival mast cells in persons with and without human immunodeficiency virus infection. *Journal of Periodontal Research*, 38: 575-582.
- NEWMAN, M. G.; GRINENCO, V.; WEINER, M.; ANGEL, I.; KARGE, H. & NISENGARD, R. (1978) Predominant microbiota associated with periodontal health in the aged. *Journal of Periodontology*, 49: 553-559.
- NISHIHARA, T. & KOSEKI, T. (2004) Microbial etiology of periodontitis. *Periodontology* 2000, 36: 14-26.
- NODA, M.; OH, J.; TAKAHASHI, R.; KONDO, S.; KITAYAMA, H. & TAKAHASHI, C. (2003) RECK: a novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. *Cancer Metastasis Reviews*, 22: 167-175.
- NOIRI, Y.; LI, L. & EBISU, S. (2001) The localization of periodontal-disease-associated bacteria in human periodontal pockets. *Journal of Dental Research*, 80: 1930-1934.
- NOTHNICK, W. B.; SOLOWAY, P. & CURRY, T. E. JR (1997) Assessment of the role of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) during the periovulatory period in female mice lacking a functional TIMP-1 gene. *Biology of Reproduction*, 56: 1181-1188.
- OH, J.; TAKAHASHI, R.; KONDO, S.; MIZOGUCHI, A.; ADACHI, E.; SASAHARA, R. M.; NISHIMURA, S.; IMAMURA, Y.; KITAYAMA, H.; ALEXANDER, D. B.; IDE, C.; HORAN, T. P.; ARAKAWA, T.; YOSHIDA, H.; NISHIKAWA, S.-I.; ITOH, Y.; SEIKI, M.; ITOHARA, S.; TAKAHASHI, C. & NODA, M. (2001) The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell*, 107: 789-800.
- OHARA, M.; HAYASHI, T.; KUSUNOKI, Y.; MIYAUCHI, M.; TAKATA, T. & SUGAI, M. (2004) Caspase-2 and caspase-7 are involved in cytolethal distending toxin-induced apoptosis in Jurkat and MOLT-4 T-cell lines. *Infection and Immunity*, 72: 871-879.

- OWEN, C. A. & CAMPBELL, E. J. (1995) Neutrophil proteinases and matrix degradation. The cell biology of pericellular proteolysis. *Seminars in Cell Biology*, 6: 367-376.
- PAGE, R. C. & SCHROEDER, H. E. (1976) Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory Investigation*, 33: 235-249.
- PAGE, R. C. & SCHROEDER, H. E. (1982) Periodontitis in man and other animals. A comparative review. Basel. S. Karger.
- PARKS, W. C. & MECHAM, R. P. (1998) Matrix metalloproteinases. Academic Press.
- PASTER, B. J.; BOCHES, S. K.; GALVIN, J. L.; ERICSON, R. E.; LAU, C. N. & LEVANOS, V. A.; SAHASRABUDHE, A. & DEWHIRST, F. E. (2001) Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of Bacteriology*, 183: 3770- 3783.
- RAZA, S. L.; NEHRING, L. C.; SHAPIRO, S. D. & CORNELIUS, L. A. (2000) Proteinase-activated receptor-1regulation of macrophage elastase (MMP-12) secretion by serine proteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 41243-41250.
- REINHARDT, R. A.; MASADA, M. P.; KALDAHL, W. B.; DUBOIS, L. M.; KORNMAN, K. S.; CHOI, J. I.; KALKWARF, K. L. & ALLISON, A. C. (1993) Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 20: 225-231.
- RHEE, J.-S. & COUSSENS, L. M. (2002) RECKing MMP function: implications for cancer development. *TRENDS in Cell Biology*, 12: 209-211.
- SASAHARA, R. M.; TAKAHASHI, C. & NODA, M. (1999) Involvement of the Sp1 site in the rās-mediated downregulation of the RECK metastasis suppressor gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 264: 668-675.
- SBORDONE, L. & BORTOLAIA, C (2003) Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clinical Oral Investigarion*, 7: 181-188.
- SEGUIER, S.; GODEAU, G. & BROUSSE, N. (2000) Collagen fibers and inflammatory cells in healthy and diseased human gingival tissues: a comparative and quantitative study by immunochemistry and automated image analysis. *Journal of Periodontology*, 71: 1079-1085.
- SEGUIER, S.; GOGLY, B.; BODINEAU, A.; GODEAU, G. & BROUSSE, N. (2001) Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix

- metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue?
Journal of Periodontology, 72: 1398-1406.
- SIGUSCH, B.; EICK, S.; PFISTER, W.; KLINGER, G. & GLOCKMAN, E. (2001) Altered chemotactic behavior of crevicular PNM in different forms of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 28: 162-167.
- SLOTS, J. (1977) Microflora in the healthy gingival sulcus in man. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 85: 247-254.
- SOCRANSKY, S. S. (1977) Microbiology of periodontal disease. Present status and future considerations. *Journal of Periodontology*, 48: 497-504.
- SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; DZINK, J. L. & HILLMAN, J. D. (1988) Associations between microbial species in subgingival plaque samples. *Oral Microbiology and Immunology*, 3: 1-7.
- SOCRANSKY, S. S. & HAFFAJEE, A. D. (1992) The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *Journal of Periodontology*, 63: 322-327.
- SOCRANSKY, S. S. & HAFFAJEE, A. D. (1994) Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontology*, 5: 7-25.
- STERNLICHT, M. D. & WERB, Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17: 463-516.
- STOLTENBERG, J. L.; OSBORN, J. B.; PIHLSTROM, B. L.; HERZBERG, M. C.; AEPPLI, D. M.; WOLFF, L. F. & FISCHER, G. E. (1993) Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status. *Journal of Periodontology*, 64: 1225-1230.
- TAANI, D. S. (1997) Association between cigarette smoking and periodontal health. *Quintessence International*, 28: 535-539.
- TAKAHASHI, C.; SHENG, Z.; HORAN, T. P.; KITAYAMA, H.; MAKI, M.; HITOMI, K.; KITAURA, Y.; TAKAI, S.; SASAHARA, R. M.; HORIMOTO, A.; IKAWA, Y.; RATZKIN, B. J.; ARAKAWA, T. & NODA, M. (1998) Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America*, 95: 13221-13226.
- TERVAHARTIALA, T; PIRILA, E.; CEPONIS, A.; MAISI, P.; SALO, T.; TUTER, G; KALLIO, P.; TORNWALL, J.; SRINIVAS, R.; KONTTINEN, Y. T. & SORSA, T. (2000) The in

- vivo expression of collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2, -8, -13 and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. *Journal of Dental Research*, 79: 1969-1977.
- TODESCAN, J. H. (2001) *Doença Periodontal. Conceitos e classificações*. Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda.
- TOKORO, Y; YAMAMOTO, T. & HARA, K. (1996) IL-1 beta mRNA as the predominant inflammatory cytokine transcript: correlation with inflammatory cell infiltration into human gingiva. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 25: 225-231.
- TROMBELLI, L. & TATAKIS, D. N. (2003) Periodontal diseases: current and future indications for local antimicrobial therapy. *Oral Disease*, 9: 11-15.
- TSAI, C. C.; HO, Y. P. & CHEN, C. C. (1995) Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *Journal of Periodontology*, 66: 852-859.
- UKAI, T.; MORI, Y.; ONOYAMA, M. & HARA, Y. (2001) Immunohistological study of interferon-gamma- and interleukin-4-bearing cells in human periodontitis gingiva. *Archives of Oral Biology*, 46: 901-908.
- VAN DER ZEE, E.; EVERTS, V. & BEETERSON, W. (1997) Cytokines modulate routes of collagen breakdown. Review with special emphasis on mechanisms of collagen degradation in the periodontium and the burst hypothesis of periodontal disease progression. *Journal of Clinical Periodontology*, 24: 297-305.
- WANG, Z.; JUTTERMANN, R. & SOLOWAY, P. D. (2000) TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 26411-26415.
- WELM, B.; MOTT, J. & WERB, Z. (2002) Developmental biology: vasculogenesis is a wreck without RECK. *Current Biology*, 12: 209-211.
- WERB, Z. (1997) ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell*, 91: 439-442.
- WILSON, M. J.; WEIGHTMEN, A. J. & WADE, W. G. (1997) Applications of molecular ecology in the characterisation of uncultured microorganisms associated with human disease. *Rev. Med. Microbiol.*, 8: 91-101.
- WOESSNER, J. F. & NAGASE, H. (2000) *Matrix metalloproteinases and TIMPs*. Oxford University Press.

WOLLEY, D. E. & DAVIES, R. M. (1981) Immunolocalization of collagenase in periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, 16: 292-297.

XIMENES-FYVIE, L. A.; HAJAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. (2000) Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 27: 648-657.

YUN, P. L.; DECARLO, A. A.; COLLYER, C. & HUNTER, N. (2002) Modulation of an interleukin-12 and gamma interferon synergistic feedback regulatory cycle of T-cell and monocyte cocultures by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in the absence or presence of cysteine proteinases. *Infection and Immunity*, 70: 5695-5705.

http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta/m_reckPathway

http://www.arestin.com/shared_graphics/tooth_crosssec.gif