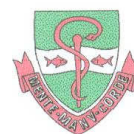




UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Trabalho de Conclusão de Curso

Aluno(a): LARISSA LOPES RODRIGUES
Orientador(a): MARCELO ROCHA MARQUES

Ano de Conclusão do Curso: 2011



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



**Estudo da atividade total de gelatinases no tecido gengival
e no plasma, durante a evolução de doença periodontal
experimental em ratos**

Larissa Lopes Rodrigues

Piracicaba
2011

LARISSA LOPES RODRIGUES

Estudo da atividade total de gelatinases no tecido gengival e no plasma, durante a evolução de doença periodontal experimental em ratos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Odontologia da
Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP

Orientador: Dr. Marcelo Rocha Marques

Piracicaba
2011

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

R618e Rodrigues, Larissa Lopes, 1989-
Estudo da atividade total de gelatinases no tecido gengival e no plasma, durante a evolução de doença periodontal experimental em ratos / Larissa Lopes Rodrigues. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Marcelo Rocha Marques.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Periodontite. 2. Metaloproteinases da matriz. I. Marques, Marcelo Rocha, 1976- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Dedico este trabalho ao meu orientador, Marcelo Rocha Marques. Sua paciência e dedicação, suas principais qualidades, foram essenciais para a finalização deste trabalho. Seus ensinamentos e sua personalidade estarão sempre na minha memória.

Agradecimentos à FAPESP, pelo apoio financeiro. À minha mãe e minha irmã, por sempre estarem ao meu lado me apoiando.

RESUMO

As metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) coletivamente são capazes de promover remodelação do tecido conjuntivo e o excesso da atividade de tais proteinases, tem sido relatada na degradação tecidual em doenças inflamatórias. A atividade excessiva das MMPs, em particular as do grupo das gelatinases, no tecido gengival e no fluido crevicular, evidenciaram a participação destas enzimas na destruição tecidual da periodontite. Este estudo investigou por meio de um modelo de indução de doença periodontal, a dinâmica da atividade total de gelatinases presentes no tecido gengival e no plasma circulante. Para este estudo, foi utilizado um modelo de indução da doença em ratos por meio da colocação de ligadura de algodão ao redor dos primeiros molares inferiores. Foram realizados testes com as gengivas, mandíbulas e sangue coletados dos animais após sacrifício. As gengivas foram submetidas a testes para detectar a atividade de mieloperoxidase (MPO) e de gelatinases. As mandíbulas foram processadas e digitalizadas por meio de uma lupa acoplada a uma câmera digital, e através de um programa analisador de imagens foram feitas medidas de perda óssea. O sangue coletado foi centrifugado, o plasma foi separado e submetido a testes para detecção da atividade total de gelatinases. Os resultados obtidos demonstraram que há um aumento da expressão de gelatinases não só nas gengivas no sítio com periodontite, como também no plasma circulante. O conhecimento de um modelo experimental reproduzível é de suma importância tanto para novas análises sobre implicações sistêmicas da doença periodontal, como para monitorar testes de novas abordagens terapêuticas que visem o controle da expressão e atividade de gelatinases a nível sistêmico.

Palavras-chave: periodontite; metaloproteinases da matriz, proteinases.

ABSTRACT

Matrix metalloproteinases (MMPs) participate of the connective tissue remodeling and also are related to tissue degradation in inflammatory diseases such as periodontitis. Increased of the MMP activity, in particular of the gelatinases, have been found in gingival crevicular fluid and gingival tissue during periodontal disease. This study investigated the dynamics of the total activity of gelatinases present in the gingival tissue and plasma in a model of induction of periodontal disease. Periodontal disease was induced by the placement of a cotton ligatures around the mandibular first molars. The gingival tissue, mandibles and blood were collected from animals after sacrifice. The gingival tissues were tested to detect the activity of myeloperoxidase (MPO) and gelatinases. The mandibles were processed, digital photographs were taken, and submitted to a single examiner who performed the morphometrical evaluation of alveolar bone loss using linear method. Blood samples were collected and centrifuged to separate the plasma, and it was subjected to testing for the total activity of gelatinases. The results demonstrated that there is an increasing of the expression of gelatinases not only in gingival tissue in site with periodontitis, but also in circulating plasma. The knowledge of a reproducible experimental model is very important to understand the systemic implications cause by periodontal disease, and to monitor testing of new therapeutic approaches that aim the control of expression and activity of gelatinases at the level systemic.

Key words: Matrix metalloproteinases; periodontitis, peptide hydrolases.

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	08
2.0 REVISÃO DE LITERATURA.....	09
2.1 Doença Periodontal.....	09
2.2 Metaloproteinases da matriz (MMPs) e doença periodonta.....	11
3.0 PROPOSIÇÃO.....	13
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1 Indução de periodontite.....	14
4.2 Medição da perda óssea alveolar.....	14
4.3 Ensaio fluorimétrico para medir a atividade total de gelatinases.....	15
4.4 Ensaio para quantificação de mieloperoxidase no tecido gengival.....	15
5.0 RESULTADOS.....	17
5.1 Perda óssea alveolar.....	17
5.2 Ensaio fluorimétrico da atividade de gelatinase total.....	17
5.3 Ensaio para quantificação de mieloperoxidase.....	19
6.0 DISCUSSÃO.....	20
7.0 CONCLUSÃO.....	23

1.0 Introdução

As metaloproteinases da matriz (MMP) constituem uma família de enzimas proteolíticas que participam da remodelação do tecido conjuntivo. Comumente o aumento da atividade de MMPs, em particular as do grupo das collagenases e gelatinases, no tecido gengival e no fluido crevicular, tem sido relacionada com a degradação tecidual em doenças como a periodontite.

Modelos animais de indução de periodontite, especialmente em roedores, têm sido amplamente usados tanto para o entendimento de sua etiopatogenia como para testar novas terapias de tratamento desta doença (Rovin *et al.*, 1966; Sanavi *et al.*, 1985; Koide *et al.*, 1995; Marques *et al.*, 2005; Garlet *et al.*, 2006; Garcia de Aquino *et al.*, 2009). Dentre os modelos mais comumente utilizados para induzir doença periodontal tem-se: indução de periodontite por meio de ligadura de algodão em molares de ratos, monoinfecção por meio de *A. actinomycetemcomitans* ou *P. gingivalis* em camundongos, e injeções de LPS também em camundongos. Certamente a utilização de diferentes animais para o estudo da doença periodontal possibilita que cada vez mais haja uma aproximação da simulação dos eventos que ocorrem durante o desenvolvimento desta doença no ser humano.

Para estudar a dinâmica de atividade total de gelatinases utilizamos um modelo de indução de doença periodontal em ratos por meio da colocação de ligadura de algodão ao redor de primeiros molares inferiores. Embora haja relatos na literatura de detecção da atividade de gelatinases nas gengivas de animais com doença induzida por tal método, ainda não há trabalhos descrevendo a dinâmica de atividade de tais proteases no tecido gengival e no plasma destes animais.

2.0 Revisão de literatura

2.1 Doença periodontal

A periodontite representa uma doença inflamatória crônica, e é hoje no Brasil e também em outros países um problema de saúde pública. Esta doença se desenvolve por meio de um processo complexo, multifatorial no qual as interações entre os componentes da placa bacteriana subgengival e os mecanismos de defesa do hospedeiro determinam o início e a progressão da doença. Clinicamente, a periodontite se caracteriza por inflamação dos tecidos de proteção e suporte dos dentes, ocasionando perda de inserção dentária e perda óssea alveolar.

Na placa bacteriana periodontopatogênica são encontradas, dentre outras, bactérias gram-negativas como *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Bacteroides forsythus* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) (CRPD, 1996). A presença de bactérias e a liberação de seus produtos desencadeiam uma reação inflamatória no tecido periodontal que, dependendo da expressão dos componentes inflamatórios do hospedeiro, pode levar à degradação do cemento, do ligamento periodontal e do osso alveolar.

Bactérias e seus produtos podem causar perda óssea inflamatória em diferentes infecções como: periodontite, otite média crônica e perda de implantes ortopédicos (Moriyama *et al.*, 1984; Sokransky e Haffajee, 1992; Harris, 1995; Carayol *et al.*, 2006). Na maioria dos casos de inflamação crônica associada com infecção, um infiltrado de células mononucleares (monócitos e linfócitos T e B) está tipicamente presente, e tais células têm um papel central no mecanismo de resposta para o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (Burger, 1984; Athanasou e Sabokar, 1999; Carayol *et al.*, 2006).

O lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) foi a primeira substância bacteriana capaz de induzir reabsorção óssea *in vitro* (Hausmann *et al.*, 1970). A cápsula da bactéria *A. actinomycetemcomitans*, formada por polissacarídeo, é capaz de induzir apoptose em osteoblastos (Yamamoto *et al.*, 1999), e extratos desta mesma bactéria inibem osteoblastos *in vitro* (Murata *et al.*, 1997). LPS purificado de *P. Gingivalis* inibe a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos (Kodono *et al.*, 1999), além de estimular osteoblastos maduros a secretarem

colagenase (Sismey-Durrant e Hopps, 1989), que é o primeiro passo para reabsorção óssea.

Citocinas, quimiocinas e prostaglandinas têm sido identificadas como reguladoras do processo imuno inflamatório na periodontite. Após ocorrer a ativação de linfócitos, macrófagos e neutrófilos, tais células podem secretar moléculas como IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IGF e prostaglandina E₂, que, dependendo dos níveis de concentrações das mesmas no tecido periodontalmente doente, podem induzir degradação de tecido conjuntivo por meio de reabsorção óssea alveolar e metaloproteinases da matriz (MMPs) (Fujihashi *et al.*, 1993; Wiebe *et al.*, 1996; Fujihashi *et al.*, 1996; Gemmell *et al.*, 1997; Baker, 2000; Marques *et al.*, 2009).

Osteoclastos ativos, envolvidos na reabsorção óssea, são células altamente polarizadas. O domínio livre das células apresenta uma zona de “vedação”, um cinturão de adesão formado por integrinas avb3, que têm seu domínio intracelular ligado à actina F e o seu domínio extracelular ligado à osteopontina na superfície óssea (Chellaiah e Hruska KA, 2003). A lacuna de Howship é o local onde a matriz óssea é removida pelo osteoclasto. A remoção da matriz óssea ocorre em duas fases: primeiramente, o componente mineral é mobilizado em um ambiente ácido (pH ~ 4,5), em seguida o componente orgânico é degradado pela catepsina K (Vääräniemi *et al.*, 2004.)

A compreensão dos mecanismos moleculares que regulam a formação de osteoclastos tem avançado nos últimos anos. Tal avanço se deu principalmente após o a descoberta e entendimento do controle da atividade destas células por meio das moléculas: *receptor activator of nuclear factor kappa B* (RANK), RANK-Ligand (RANKL) e *osteoprotegerin* (OPG). O RANKL que, fisiologicamente, é expresso por osteoblastos, células T e B, é conhecido por induzir a diferenciação de células precursoras de osteoclastos, que tem a capacidade de expressar o RANK (Takayanagi, 2007, e Boyce e Xing, 2008). Inversamente, a OPG, que é expressa por osteoblastos e células B, pode ligar-se interagir com RANK, limitando assim a formação e degradação ósseas (Boyce, 2009).

O processo de resposta inflamatória ocorrido na doença periodontal, promove uma alteração nos níveis de expressão de citocinas, quimiocinas dentre outros fatores no sítio periodontalmente doente. Tais fatores inflamatórios, por sua vez,

podem modular osteoblastos e fibroblastos a aumentarem a produção de RANKL, culminando com a formação de osteoclastos, que promoverão perda óssea alveolar.

2.2 Metaloproteinases da matriz (MMPs) e doença periodontal

Metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) representam uma importante família de endopeptidases zinco-dependentes, que coletivamente são capazes de degradar todas as proteínas da matriz extracelular (ME). São classificadas em subgrupos de acordo com a capacidade de degradar substratos específicos pelos quais têm afinidade. Como exemplo de alguns subgrupos pode-se citar: collagenases intersticiais (MMP-1 e MMP-8), estromelisinases (MMP-3 e MMP-10), gelatinases (MMP-2 e MMP-9) e MMPs de membrana (MT-MMPs) (Woessner, 1998). As MMPs são expressas pelas células do tecido conjuntivo em respostas a estímulos específicos, desta forma participam da manutenção da homeostasia tecidual. São também produzidas por células polimorfonucleadas que eventualmente possam estar presentes no tecido conjuntivo (Woessner, 1998). Sua atividade no tecido é regulada por inibidores específicos, denominados inibidores teciduais de metaloproteinases da matriz (TIMPs) (Rifas *et al.*, 1989). Atividade excessiva de MMPs, em particular as pertencentes ao grupo das collagenases e das gelatinases, é observada em processos patológicos como: a periodontite, osteoartrite, cânceres metastáticos e aneurismas (Birkedal-Hansen, 1993).

Além de ser sintetizada após estímulos específicos, como por exemplo mediadores inflamatórios, a gelatinase MMP-2 representa uma enzima constitutiva, ou seja, de expressão contínua. Tal enzima pode ser secretada por fibroblastos (Salo *et al.*, 1985), células endoteliais (Kalebic *et al.*, 1983), monócitos e osteoblastos (Birkedal-Hansen, 1993; Rifas *et al.*, 1989). Já a gelatinase MMP-9 (ou gelatinase B - 92 kDa) é expressa por leucócitos polimorfonucleares (Hibbs *et al.*, 1984), macrófagos (Mainardi *et al.*, 1984) e células epiteliais (Woodley *et al.*, 1987).

Metaloproteinases da Matriz como: MMP-1, -2, -3, -4, -7, -8, -9, -13, -25 and -26 já foram detectadas em biopsia de tecido gengival e fluido crevicular de pacientes com periodontite. Um aumento significativo na expressão e na atividade de MMP-2 e MMP-9 no tecido gengival e no fluido crevicular, sugere a participação destas enzimas na destruição tecidual durante a periodontite (Gangbar *et al.*, 1990; Mäkelä

et al., 1994). Além disso, já foi observado que a atividade destas enzimas também é aumentada em doença periodontal experimental em animais (Marques *et al.*, 2009)

O LPS bacteriano é capaz de aumentar a secreção de MMPs por macrófagos *in vitro* (Wahl *et al.*, 1974), e injeções gengivais de LPS geram um infiltrado de leucócitos polimorfonucleares, os quais também secretam MMPs (Llavaneras *et al.*, 1999). Além disso, já foi demonstrado que *P. gingivalis* e IL-1 β foram capazes de induzir fibroblastos do ligamento periodontal humanos a produzir MMP-2 *in vitro* (Pattamapun *et al.*, 2003).

Estudos investigando citocinas como IL-1 β e TNF- α , verificaram que as mesmas possuem efeito indutivo na expressão gênica das MMPs (McGeehan *et al.*, 1994; Irwin e Myrillas, 1998). Estas citocinas, e também a IL-6, podem influenciar diretamente na expressão dos TIMPs, e a regulação destes fatores, podem ter um papel importante na degradação tecidual em doenças inflamatórias (McGeehan *et al.*, 1994, Sato *et al.*, 1990, Irwin *et al.*, 2002).

Pela importante relação entre a atividade das MMPs e a sua capacidade de destruição tecidual, tem sido investigado *in vivo*, a regulação destas enzimas por inibição da produção das mesmas, ou por inibição de sua atividade na matriz extracelular. Tal efeito inibitório, funcionaria como um suporte terapêutico em doenças causadas por processos inflamatórios como a acontece na doença periodontal (Karatzas *et al.*, 2000; Ramamurthy *et al.*, 2002 ; Gapski *et al.* 2009).

3.0 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo:

- 1) Investigar a dinâmica da atividade total de gelatinases no tecido gengival de ratos com periodontite induzida por ligadura.
- 2) Tentar correlacionar, no tecido gengival de ratos com periodontite induzida, a dinâmica da atividade total de gelatinases com o nível de infiltrado inflamatório;
- 3) Investigar se há correlação entre a atividade total de gelatinases no tecido gengival com a taxa de perda óssea alveolar em ratos com periodontite induzida.

4.0 Material e Métodos

4.1 Indução de periodontite

Periodontite foi induzida colocando-se um fio de algodão ao redor dos dois primeiros molares inferiores de 32 ratos Wistar machos com 4 semanas de idade. Para controle negativo, oito animais não receberam a ligadura.

Grupo Controle (C): sem doença

Grupo PP10: 10 dias de doença

Grupo PP20: 20 dias de doença

Grupo PP40: 40 dias de doença

Grupo PP20+20: 20 dias de doença, remoção da ligadura, + 20 dias sem ligadura

Após cada tempo experimental os animais foram anestesiados, e aproximadamente 2 mL de sangue foram obtidos por punção cardíaca em coletados em tubos heparinizados. Em seguida os animais eram mortos por meio de deslocamento cervical e o sangue era centrifugado para a remoção e congelamento (a -70°C) do plasma obtido.

4.2 Medição da perda óssea alveolar

Após o sacrifício dos animais e remoção das gengivas, as mandíbulas (n=8 por grupo para cada tempo experimental) foram limpas com o auxílio de uma gaze para remoção do tecido mole. Posteriormente foram mergulhadas em uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% onde permaneceram por 16 horas. Em seguida as mandíbulas foram lavadas em água deionizada e então mergulhadas em uma solução de azul de metileno por 1 minuto. Após lavagem em água corrente por 2 minutos, as peças foram secas em estufa a 37°C por 1 hora. As faces linguais e vestibulares das hemimandíbulas direitas foram digitalizadas por meio de uma lupa acoplada a uma câmera digital (Leica) e, utilizando-se de um programa analisador de imagens (ImageTool), foram feitas medidas lineares entre a crista óssea alveolar e a junção amelo-cementária em 3 pontos (pontos mais alto das cúspides do molar) de cada face (vestibular e lingual). Em seguida foi feita uma média das medidas obtidas por cada animal. Tais medidas foram realizadas por um avaliador

previamente calibrado, e códigos foram feitos para que o mesmo não soubesse de qual grupo se referia cada amostra lida.

4.3 Ensaio fluorimétrico para medir a atividade total de gelatinases nas gengivas e no plasma

Para medir atividade total das gelatinases presentes no tecido gengival (n=5 por grupo para cada tempo experimental), as amostras (gengivas ao redor dos primeiros molares inferiores esquerdos) foram lavadas em tampão fosfato salino, cortadas em fragmentos menores e após a pesagem dos fragmentos, os mesmos foram colocados em um tubo tipo *ependorf* estéril contendo 0,6 mL de meio de cultura (DMEM-Gibco, New York, USA), suplementado com 40ug/mL de garamicina, para de 0,2 gramas de tecido. Em seguida, os tubos contendo o tecido e meio de cultura foram levados a uma estufa a 37 °C e após 2 horas o meio foi substituído por outro meio novo. Após 18 horas de incubação a 37 °C, o sobrenadante foi coletado e guardado em nitrogênio líquido. A quantificação de proteínas totais de cada amostra foi realizada pelo método de Bradford (Bio-Rad).

Cerca de 30 ug de proteína total de cada de gengiva, e aproximadamente 2uL de plasma foram separadamente homogeneizadas com um tampão Tris-CaCl₂ (50 mM Tris, 10 mM de CaCl₂, 1 M ZnCl₂) e a atividade gelatinolítica total foi medida utilizando-se do “kit” DQ Gelatin (E12055; Molecular Probes, Eugene, OR, E.U.A.) e um Fluorímetro (λ -excitação: 495 nm, λ -emissão: 515 nm; Gemini EM, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, E.U.A.). Uma curva padrão de atividade gelatinolítica e os controles positivos e negativos foram preparados como recomendado pelo fabricante do “kit”.

4.4 Ensaio para quantificação de mieloperoxidase no tecido gengival

O tecido gengival ao redor dos primeiros molares inferiores direitos, foram utilizados para medição da expressão de MPO, um marcador de infiltrado neutrofílico. As amostras do tecido gengival foram pesadas e adicionado 1 mL de brometo de hexadeciltrimetilamônia (HTAB, Sigma Chem. Co., EUA) para cada 50 mg de tecido, seguido de homogeneização (Heidolph Diax 900, Alemanha). Os homogenatos foram aquecidos durante duas horas a 60 ° C em banho maria e então

centrifugados a 10.000g durante 5 minutos. Após o término da centrifugação, os sobrenadantes foram usados como fonte para medida da atividade de MPO. 40 Cinquenta microlitros de homogenato foram adicionados a 200 µL de tampão fosfato de potássio, pH 6.0 contendo 0,164 mg/mL de dihidroclorato de odianisidina (Sigma Chemical Co., EUA) e 0,0005% de água oxigenada (Merck, Alemanha). A mudança de absorbância (OD) foi medida em leitor de ELISA a 460nm durante 20 minutos a intervalos de 20 segundos. Gráficos mostrando a variação de absorbância em função do tempo foram obtidos, a partir dos quais foram calculados os valores de Vmax/seg. Do gráfico de OD (densidade óptica ou absorbância) em função do tempo em segundos, foi escolhido o intervalo de tempo no qual as medidas de OD mostravam linearidade com o tempo (correspondendo ao valor de r^2 mais próximo de 1), obtendo assim o valor de Vmax/seg. (BRADLEY et al., 1982).

Os resultados obtidos para os valores de perda óssea e de atividade total de gelatinas (para plasma e gengivas) foram submetidos à ANOVA e teste de Tukey, e foram considerados significantes valores de $p < 0.05$.

5.0 Resultados

5.1 Perda óssea alveolar

A partir das imagens digitalizadas das hemimandíbulas, foram feitas 3 medidas na face lingual e 3 na face vestibular. A partir dessas medidas foram calculadas duas médias, uma para a face vestibular, e outra para a lingual, e a partir destas duas médias foi calculada a média de perda óssea total por animal.

Como observado na figura 1, todos os grupos que receberam ligadura possuíam maior perda óssea alveolar quando comparado ao grupo controle. O grupo PP20+20, que sofreu remoção da ligadura, continuou tendo perda de osso alveolar mesmo sem a ligadura.

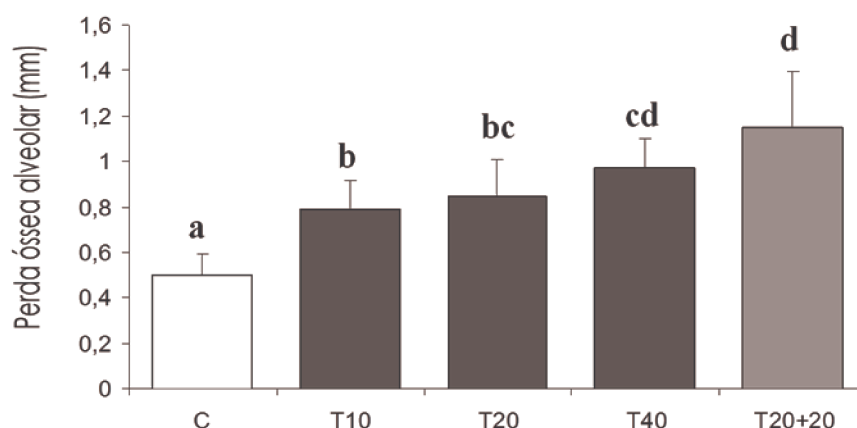


Figura 1 Gráfico representativo das médias totais de perda óssea alveolar dos ratos com ou sem doença periodontal induzida, considerando as seis medidas (3 na vestibular e 3 na lingual) para cada animal avaliado. Notou-se que os grupos T40 e T20+20 teve maior perda óssea. (a, b, c e d / Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes, $p < 0.05$).

5.2 Ensaio Fluorimétrico da atividade de gelatinase total nas gengivas e no plasma

Foi realizado um ensaio com o meio condicionado por gengivas e pelo plasma coletado de 5 amostras (de 1 a 5) para cada grupo. Para as gengivas, a amostra foi colocada de acordo com a concentração de proteína (ug/ml), uniformizando as quantidades. Já para o plasma foi uniformizado o volume de plasma a ser aplicado na reação. Os resultados obtidos para atividade total de gelatinases foram realizados após 50 minutos de leitura em um aparelho denominado de fluorímetro e estão demonstrados nas figuras 2 (gengivas) e figura 3 (plasma).

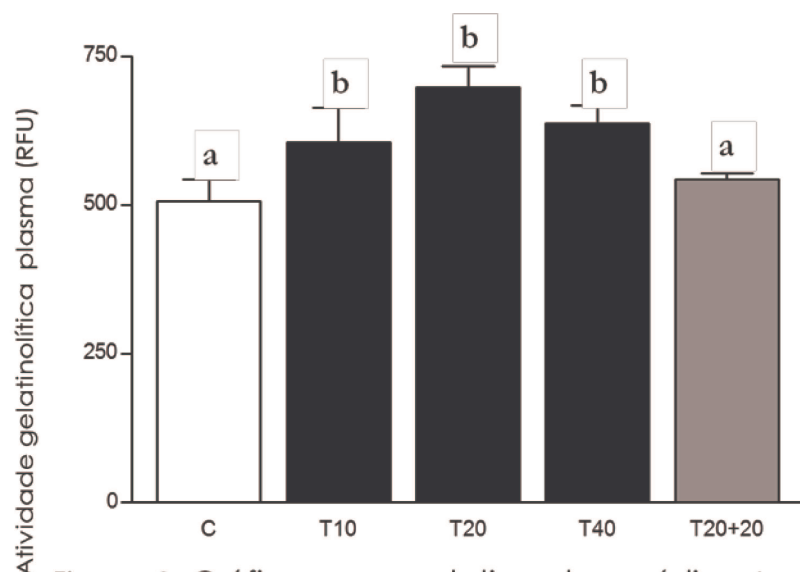


Figura 2 Gráfico representativo das médias $\pm$ dp dos valores (em unidades arbitrárias) obtidos de atividade gelatinolítica total no plasma dos animais. Notou-se um aumento da atividade total de gelatinases no plasma em decorrência da periodontite, e a remoção da ligadura foi acompanhada por uma diminuição dessa atividade. (a, b / Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes), $p < 0.05$).

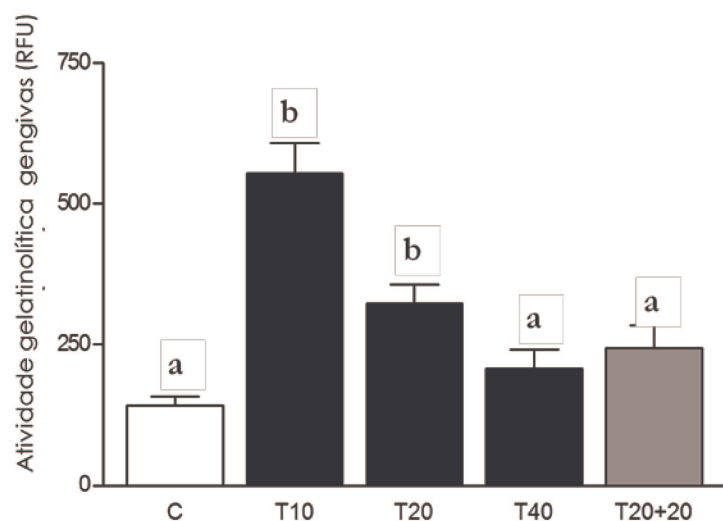


Figura 3 Gráfico representativo das médias $\pm$ dp dos valores (em unidades arbitrárias) obtidos de atividade gelatinolítica total nas gengivas dos animais. Verificou-se um aumento na atividade de gelatinases após 10 dias de periodontite induzida, e essa atividade foi diminuindo nos outros tempos experimentais. (a, b, / Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes).

5.3 Ensaio para quantificação de MPO nas gengivas

Como demonstrado na figura 4, a atividade de MPO foi mínima no tecido gengival não doentes (dos animais sem ligadura, Grupo C). Após 10 dias de indução da doença, foi detectado o maior nível de expressão de MPO, e em seguida houve um declínio na expressão que se manteve semelhante para todos ou outros períodos experimentais estudados.

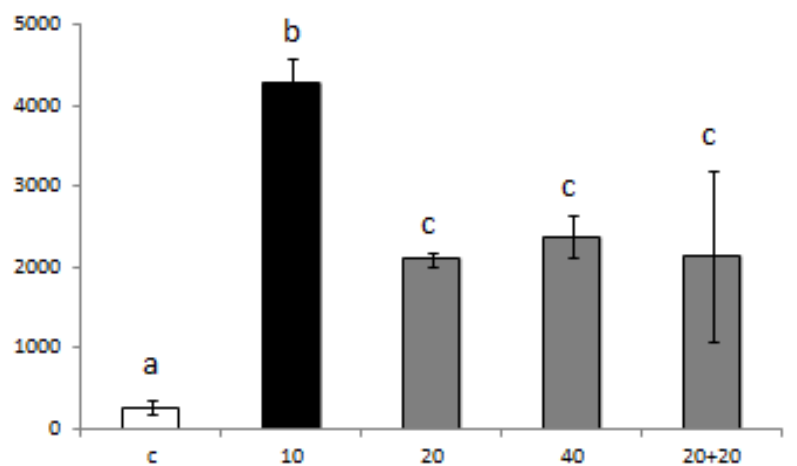


Figura 4. Gráfico representativo das médias $\pm$ dp dos valores (em unidades arbitrárias) obtidos de atividade de MPO. Verificou-se um aumento na atividade de MPO em todos os períodos experimentais, em relação ao controle. Letras diferentes (a, b, c) indicam grupos estatisticamente diferentes entre si.

6.0 Discussão

Este trabalho teve como objetivo investigar a dinâmica da atividade total de gelatinases no tecido gengival e em plasma de ratos com periodontite induzida por ligadura. Apesar da existência de diversos trabalhos na literatura científica, que usam modelos experimentais em animais para se estudar a patogênese da doença periodontal (Rovin *et al.*, 1966; Sanavi *et al.*, 1985; Koide *et al.*, 1995; Marques *et al.*, 2005; Garlet *et al.*, 2006; Garcia de Aquino *et al.*, 2009) nestes estudos, a investigação das gelatinases no tecido periodontal tem sido amplamente estudada a nível de expressão gênica e expressão protéica, e pouco tem se estudado em relação à atividade destas enzimas em sítios periodontalmente doentes. Certamente é de interesse científico entender, em diferentes circunstâncias e testes experimentais, como é modulada a atividade das gelatinases no tecido periodontal, e em plasma circulante, já que sabidamente elas são responsáveis em parte pela degradação tecidual na periodontite,

A doença periodontal se desenvolve como um resultado da interação entre as bactérias presentes na placa dental e as respostas imunes e inflamatórias. Estes dois fatores, diretamente responsáveis pela destruição de tecidos, estão ligados por citocinas pró-inflamatórias e enzimas proteolíticas, incluindo as metaloproteinases. As gelatinases são enzimas proteolíticas que apresentam grande potencial para agir como mediadoras da destruição tecidual no dano imunológico. Diversos autores sugerem que a liberação de metaloproteinases e sua ativação representam passos regulatórios fundamentais em diferentes fases da doença periodontal

Evidências da atuação da MMP-9 no extravasamento e na migração dos neutrófilos (WESTERLUND *et al.*, 1996), na degradação do colágeno (INGMAN *et al.*, 1994), na reabsorção óssea normal e patológica (OKADA *et al.*, 1995; KUSANO *et al.*, 1998) e no aumento do poder quimiotático da IL-8 (OPDENAKKER *et al.*, 2001) revelam efeitos pró-inflamatórios desta metaloproteinase e sugerem papel relevante da MMP-9 na patogênese de doenças inflamatórias, como a periodontite. (Figueredo *et al.*, 2003)

Dentro dos períodos experimentais estudados no presente trabalho, pôde-se traçar o comportamento da atividade total de gelatinases no plasma e na gengiva dos animais durante o experimento. Os resultados obtidos demonstraram pela primeira vez, em modelo animal de indução de periodontite, que há um aumento da expressão de gelatinases não só nas gengivas no sítio com periodontite, mas também no plasma circulante. O aumento desta classe de metaloproteinases no plasma já foi observado em pacientes com doença periodontal (Marcaccini *et al.*, 2009) e pode levar a implicações sistêmicas relevantes, já que tais proteases participam de processos tanto fisiológicos como patológicos em diversos órgãos do organismos.

Estudos demonstraram que os níveis de gelatinases em fluidos orais aumentam com a gravidade da doença periodontal. Pacientes com periodontite apresentam níveis mais elevados de gelatinases comparados a indivíduos saudáveis (Makela *et al.*, 1994). No nosso estudo foi possível observar a diferença da atividade gelatinolítica entre os grupos comparando o grupo Controle, com os demais.

O conhecimento das metaloproteinases presentes nas diversas patologias médicas e odontológicas tem permitido sua utilização como marcadores possibilitando, assim, a confirmação do diagnóstico e com que este seja efetuado precocemente. Existe um interesse crescente no desenvolvimento de pesquisas de inibidores biológicos de metaloproteinases que possam ser utilizados com sucesso e segurança na clínica odontológica. (Navarro, 2006)

A realização da medição dos níveis de metaloproteinases é considerada de grande importância na busca dos papéis específicos dessas enzimas na etiopatogenia das diferentes formas de doença periodontal (McCULLOCH, 1994); e promissora para um futuro no qual as metaloproteinases possam ser alvos importantes para a terapia da doença periodontal. (Figueiredo, 2003)

Todavia, testes utilizando as metaloproteinases e seus inibidores teciduais se encontram em fases iniciais de desenvolvimento, existindo a necessidade de pesquisas adicionais para esclarecer e aprimorar o conhecimento sobre as metaloproteinases. Assim, será possível ampliar sua utilização, melhorando o

custo/benefício para o diagnóstico e o monitoramento das terapias nos pacientes (Navarro, 2006).

A distância entre a crista óssea e a junção cimento esmalte é uma referência importante para o estudo do comportamento do tecido ósseo frente aos eventos da doença periodontal. A avaliação desta referência foi utilizada neste estudo por ser considerada um método adequado para a análise da ação destrutiva da periodontite induzida por ligadura de algodão.

As metaloproteinases participam ativamente na reabsorção óssea que ocorre na doença periodontal. Os osteoblastos expressam FIB-CL (fibroblast-type collagenase) (MMP) quando estimulados. Assim, hipoteticamente, a reabsorção óssea osteoclástica é iniciada por uma resposta osteoblástica a sinais de reabsorção, como a liberação de metaloproteinases, resultando em dissolução da camada osteóide não mineralizada, sendo os osteoclastos recrutados para essa região. (Navarro, 2006).

Dentre os resultados obtidos, é importante destacar os valores encontrados para medida de perda óssea no grupo que teve indução de periodontite por 20 dias, remoção da ligadura, e permanência do animal vivo por mais 20 dias sem a ligadura. Nestes animais, pôde-se observar que a perda óssea continuou evoluindo com o tempo mesmo sem a ligadura. Embora não haja uma resposta definitiva para esse achado, foi notado que ao remover as ligaduras, permaneceu um espaço entre o dente e a gengiva, o que possivelmente favoreceu o acúmulo de biofilme, e provavelmente promoveu a evolução da doença.

7.0 Conclusão

O conhecimento de um modelo experimental, reproduzível, como é o modelo de ligadura, e sabendo-se que há sim, alterações a nível sistêmico de expressão de gelatinases no plasma em razão de periodontite, permite que tal modelo experimental sirva tanto para novas análises sobre implicações sistêmicas da doença periodontal, como para monitorar testes de novas abordagens terapêuticas que visem o controle da expressão e atividade de gelatinases a nível sistêmico.

Referências ¹

Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996; 11: 266-273.

Athanasou N, Sabokar A. Human osteoclast ontogeny and pathological bone resorption. *Histol Histopathol*. 1999; 14: 635-647.

Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microb Infect*. 2000; 2: 1181-1192.

Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol*. 1993; 64: 474-484.

Bradley, P.P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.78, n.3, p.206-209, Mar. 1982.

Boyce BF. Sphingosine-1 phosphate: a new player in osteoimmunology. *Dev Cell*. 2009; 16:323-324.

Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473:139-46.

Burger E, van der Meer J, Nijweide P. Osteoclast formation from mononuclear phagocytes: role of bone-forming cells. *J Cell Biol*. 1984; 99: 1901-1906.

Carayol N, Chen J, Yang F, Jin T, Jin L, States D, Wang CY. A dominant function of IKK/NF-kappaB signaling in global lipopolysaccharide-induced gene expression. *J Biol Chem*. 2006;281:31142-51

¹ De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver.

Chellaiah MA, Hruska KA. The integrin $\alpha(v)\beta(3)$ and CD44 regulate the actions of osteopontin on osteoclast motility. *Calcif Tissue Int.* 2003;72:197-205.

Consensus Report for Periodontal Diseases (CRPD) pathogenesis and microbiol factors. *Ann Periodontol.* 1996; 1: 926-932.

De Souza, A.P; Da Silva R.A.; Da Silva, M.A.D. Catanzaro-Guimarães, S.A.; Line, S.R.P. Matrix metalloproteinases: the most important pathway involved with periodontal destruction. *Braz J Oral Sci.* October-December 2005 - Vol. 4 - Number 15

Figueiredo CMS; Crispino AF; Tinoco EMB. Níveis elevados de metaloproteinase da matriz-9 em sítios com destruição tecidual de pacientes com periodontite crônica generalizada. *R. Ci. méd. biol., Salvador, v. 2, n. 1, p. 40-47, jan./jun. 2003*

Fujihashi K, Beagley KW, Kono Y. Gingival mononuclear cells from chronic inflammatory periodontal tissue produce interleukin (IL)-5 and IL-6, but not IL-2 and IL-4. *Am J Pathol.* 1993; 142: 1239-1250.

Fujihashi K, Yamamoto M, Hiori T, Bamberg TV, Mcghee JR, Kiyono H. Selected Th1 and Th2 cytokine mRNA expression by CD4⁺ cells isolated from inflamed human gingival tissues. *Clin Exp Immunol.* 1996; 103: 422-428.

Gangbar S, Overall CM, McCulloch CAG, Sodek J. Identification of polymorphonuclear leukocyte collagenase and gelatinase activities in mouthrinse: correlation with eriodontal disease activity and juvenile periodontitis. *J Periodont Res.* 1990; 25: 196-202.

Gapski R, Hasturk H, Van Dyke TE, Oringer RJ, Wang S, Braun TM, Giannobile WV. Systemic MMP inhibition for periodontal wound repair: results of a multi-centre randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2009 36:149-56.

Garcia de Aquino S, Manzolli Leite FR, Stach-Machado DR, Francisco da Silva JA, Spolidorio LC, Rossa C Jr. Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. Life Sci. 2009 Mar 12. *in press*.

Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, Silva JS. cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. Oral Microbiol Immunol. 2006;21:12-20.

Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. Periodontol 2000. 1997; 14: 112-143.

Górska R, Nedzi-Góra M. The effects of the initial treatment phase and of adjunctive low-dose doxycycline therapy on clinical parameters and MMP-8, MMP-9, and TIMP-1 levels in the saliva and peripheral blood of patients with chronic periodontitis. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2006 Nov-Dec;54(6):419-26. Epub 2006 Nov 21.

Harris W. The problem is osteolysis. Clin Orthoped. 1995; 311: 46-53.

Hausmann E, Raisz L, Miller WA. Endotoxin: stimulation of bone resorption in tissue culture. Science. 1970; 168: 862-864.

Hibbs MS, Hasty KA, Kang AH, Mainardi CL. Secretion collagenolytic enzymes by human polymorphonuclear leucocytes. J Collagen Rel Res. 1984; 4: 467-477.

Irwin CR, Myrillas TT, Traynor P, Leadbetter N, Cawston TE. The role of soluble interleukin (IL)-6 receptor in mediating the effects of IL-6 on matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression by gingival fibroblasts. J Periodontol. 2002;73:741-747.

Karatzas S, Robledo P, Mitchel P, Tohme Z, Trujillo A, Vandyke T. The effect of matrix metalloproteinases inhibitor on the progression of periodontal disease. J Dent Res. 2000; 79, abstract 1588.

Koide M, Suda S, Saitoh S, Ofuji Y, Suzuki T, Yoshie H, *et al.* *In vivo* administration of IL-1 accelerates silk ligature-induced alveolar bone resorption in rats. J Oral Pathol Med 1995;24:420-34.

Kodono H, Kido J, Kataoka M, Yamauchi N, Nagata T. Inhibition of osteoblastic cell differentiation by lipopolysaccharide extract from *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun. 1999; 67: 2841-2846.

Llavaneras A, Golub LM, Rifkin BR, *et al.* CMT-8/clodronate combination therapy synergistically inhibits alveolar bone loss in LPS-induced periodontitis. Ann NY Acad Sci. 1999; 878: 671-674.

Mainardi CL, Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM. Purification of a type V collagen degrading enzyme from rabbit alveolar macrophages. J Collagen Rel Res. 1984; 4: 479-492.

Mäkelä M, Salo T, Uitto A-J, Larjava H. Matrix Metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. J Dent Res. 1994; 73: 1397-1406.

Marcaccini AM, Novaes AB Jr, Meschiari CA, Souza SL, Palioto DB, Sorgi CA, Faccioli LH, Tanus-Santos JE, Gerlach RF. Circulating matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) and MMP-9 are increased in chronic periodontal disease and decrease after non-surgical periodontal therapy. Clin Chim Acta. 2009 Nov;409(1-2):117-22. Epub 2009 Sep 12.

Marques MR, Silva MA, Manzi FR, Cesar-Neto JB, Nociti Jr FH, Barros SP. Effect of intermittent PTH administration in the periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. Arch Oral Biol. 2005; 50: 421-429.

Marques, MR ; SANTOS, MCLG ; da Silva, AF ; NOCITI JR, FH ; BARROS, SP . Parathyroid hormone administration may modulate IL-6, MMP-2 and MMP-9 in periodontal tissues in experimental periodontitis. Journal of Periodontal Research *in press*.

McCULLOCH, C. A. G. Collagenolytic enzymes in gingival crevicular fluid as diagnostic indicators of periodontitis. Ann NY Ac Sci, v.732, p.152-164, 1994.

McGeehan GM, Becherer JD, Bast J. Regulation of tumor necrosis factor- α processing by a metalloproteinase inhibitor. Nature. 1994; 370: 558-561.

Moriyama H, Huang C, Abramson M, Kato M. Bone resorption factors in chronic otitis media. Otolaryngol Head Neck Surg. 1984; 92: 322-328.

Murata T, Ansai T, Taehara T, Kobayashi Shaneji T. Extracts of *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* inhibit alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells *in vitro*. Oral Dis. 1997; 3: 106-112.

Navarro VP, Nelson-Filho P, Silva LAB, Freitas AC. The participation of matrix metalloproteinases in the physiopathological processes of the oral cavity. Rev Odontol UNESP. 2006; 35(4): 233-38.

Pattamapun K, Tiranathanagul S, Yongchaitrakul T, Kuwatanasuchat J, Pavasant P. Activation of MMP-2 by Porphyromonas gingivalis in human periodontal ligament cells. J Periodont Res. 2003; 38: 115–121.

Rifas L, Halstead RL, Peck WA, Aviolo LV, Welgus HG. Human osteoblasts *in vitro* secrete tissue inhibitor of metalloproteinases and gelatinase but not interstitial collagenase as major products. J Clin Invest. 1989; 84: 686-694.

Ramamurthy NS, Xu J-W, Bird J, Baxter A, Bhogal R, Wills R, *et al.* Inhibition of alveolar bone loss by matrix metalloproteinases inhibitors in experimental periodontal disease. J Periodont Res. 2002; 37: 1-7.

Rovin S, Costich ER, Gordon AH. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. J Periodontal Res 1966;1:193-204.

Sanavi F, Listgarten MA, Boyd F, Sallay K, Nowotny A. The colonization and establishment of invading bacteria in the periodontium of ligature-treated immunosuppressed rats. J Periodontol 1985;56:273-80.

Salo T, Turpeenniemi-Hujanen T, Tryggvason K. Tumor-promoting phorbol esters and cell proliferation stimulate secretion of basement-membrane (type IV) collagen degrading metalloproteinase by human fibroblasts. J Biol Chem. 1985; 260: 8526-8531.

Sato T, Ito A, Mori Y. Interleukin 6 enhances the production of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) but not that of matrix metalloproteinases by human fibroblasts. Biochem J Biophys Res Commun. 1990; 170: 824-829

Sismey-Durrant HJ, Hopps RM. The effect of lipopolysaccharide from *Bacteroides gingivalis* and muramyl dipeptide on osteoblast collagenase release. Calcif Tiss Int . 1989; 4: 361-363.

Sokransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: Current concepts. J Periodontol. 1992; 63: 322-331.

Takayanagi H. The role of NFAT in osteoclast formation. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 ;1116:227-37.

Vääräniemi J, Halleen JM, Kaarlonen K, Ylipahkala H, Alatalo SL, Andersson G,

Kaija H, Vihko P, Väänänen HK. Intracellular machinery for matrix degradation in bone-resorbing osteoclasts. *J Bone Miner Res* 2004:1432-40.

Yamamoto S, Mogi M, Kipara K, Ishihara Y, Ueda N, Amano K, *et al.* Anti-proliferative capsular-like polysaccharide antigen from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* induces apoptotic cell death in mouse osteoblastic MC3T-E1 cells. *J Dent Res.* 1999; 78: 1230-1273.

Wahl LM, Wahl SM, Mergenhagen SE, Martin GR. Collagenase production by endotoxin activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1974; 71: 4955-4958.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991 Jan;173(2):697-703.

Woessner Jr JF. The matrix metalloproteinase family. In:Parks WC, Mechan RP, editors. *Matrix Metalloproteinase.* 1998; 300-356.

Woodley DT, Kalebic T, Banes RJ, Link W, Pruniers M, Liotta L. Adult human keratinocytes migrating over nonviable dermal collagen produce collagenolytic enzymes that degrade type I and Type IV collagen. *J Invest Dermatol.* 1987; 86: 418-423.