UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CÉSAR ARRUDA MESCHIARI

**Concentrações de MMP-8, MMP-9, MPO, TIMP-1
e TIMP-2 na saliva e correlações com plasma**

Ribeirão Preto – SP

2011

CÉSAR ARRUDA MESCHIARI

**Concentrações de MMP-8, MMP-9, MPO, TIMP-1
e TIMP-2 na saliva e correlações com plasma**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências.**

Área de concentração: Farmacologia

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Raquel Fernanda
Gerlach**

Ribeirão Preto

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Meschiari, César Arruda

Concentrações de MMP-8, MMP-9, MPO, TIMP-1 e TIMP-2 na saliva e correlações com plasma. Ribeirão Preto, 2011.

102 p. il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Gerlach, Raquel Fernanda.

1. Saliva. 2. Plasma. 3. Metaloproteinases da matriz extracelular.
4. Doença Periodontal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

CÉSAR ARRUDA MESCHIARI

**Concentrações de MMP-8, MMP-9, MPO, TIMP-1
e TIMP-2 na saliva e correlações com plasma**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências.**

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: _____

Banca examinadora:

Profa.: Raquel Fernanda Gerlach

Instituição: FORP-USP

Assinatura: _____

Profa.: Ana Paula de Souza Pardo

Instituição: FOP-UNICAMP

Assinatura: _____

Profa.: Simone Gusmão Ramos

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

*Dedico esse trabalho aos meus pais, minhas irmãs e aos meus amigos,
pelo carinho, paciência e o convívio.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que me deram amor, carinho, educação e tantas outras coisas boas que estas páginas seriam pouco para descrevê-las. Também me deram broncas, por isso me tornei uma pessoa de caráter. Amo vocês!

As minhas irmãs que sempre me deram apoio e atenção.

À professora Raquel Fernanda Gerlach que me aceitou em seu laboratório, me ensinou o que é ciência, resolveu minhas dúvidas e compreendeu minhas dificuldades. Até agora foram sete anos compartilhando conhecimento, idéias, alegrias, histórias, viagens, artigos, trabalhos e muitas outras coisas. Aqui, meu muito obrigado.

À minha amiga Andréa M. Marcaccini, pelos bons momentos que passamos enquanto trabalhávamos juntos. A conversa e as risadas tornavam até os exaustivos dias de coleta divertidos, e a boa companhia que me fornecia animo para repetir os géis que davam errado. Obrigado pela amizade, apoio, conselhos e caronas.

Ao professor José Eduardo Tanus dos Santos pela a confiança, oportunidade e conselhos.

Agradeço às professoras Dra Ana Paula de Souza Pardo e Dra. Simone Gusmão Ramos a disponibilidade de fazer parte desta banca e a atenção concedida.

Ao apoio financeiro da Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Aos meus amigos que estão no laboratório ou já passaram por ele, deixando sua marca: Andréa, Élen, Lívia Dunga, Carol Guerra, Isabel, Glauce, Adriana, Leo, Carla, Junia, Andrezza, Rafa, Bruna, Aline, Alisson, Stêfany, Anna Laura, Raquel, Michele, Giseli, Rosângela, Carlos, Gabi, Luis Paulo, Lívia Lopes, Ana Carol, Juliana Uzuelli, Dani Moraes, Carol Demacq, Thiago, Marco Aurélio.

Aos meus amigos Erlon, José, Landerson e Thales pela amizade e bebidas.

Às minhas amigas Clévia e a Luciana que sempre acreditaram em mim e no meu potencial mesmo quando eu duvidava.

Aos todos os amigos da saudosa Farma-USP-Ribeirão que tornaram a faculdade mais que uma graduação, uma experiência transformadora.

Ao Fox, por estar ao meu lado nos momentos em que eu estava triste e por me ajudar a estudar, fazendo cara de quem estava entendendo.

Aos funcionários Sônia, Ramon e Fátima pelo excelente auxílio técnico, colaboração e pela competência e prontidão para resolver meus problemas. Agradeço a amizade que colaboraram direta ou indiretamente para meu crescimento pessoal e profissional.

“Não basta sermos os melhores, é preciso que provemos isto todos os dias.”

(Autor desconhecido)

RESUMO

Meschiari, C. A. **Concentrações de MMP-8, MMP-9, MPO, TIMP-1 e TIMP-2 na saliva e correlações com plasma.** 2011. 102p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) são uma família de endopeptidases zinco-dependentes conhecidas por degradar componentes do tecido conjuntivo em processos fisiológicos e patológicos. A regulação da atividade das MMPs pode ser feita pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs).

A doença periodontal (DP) é a inflamação crônica em que atividade excessiva das MMPs e mieloperoxidase (MPO) são apontadas como responsáveis pela destruição dos tecidos suporte dos dentes.

Os componentes da saliva são derivados da vascularização local sendo possível encontrar neste fluido o reflexo de muitas moléculas presentes no plasma. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram: 1) Comparar os níveis de MMPs, TIMPs e MPO na saliva total estimulada (STE) e plasma de pacientes com DP antes (DA) e após (DT) o tratamento periodontal não cirúrgico, e em voluntários saudáveis no início do estudo (CA) e após 3 meses (CT); 2) Avaliar se existe correlação entre os resultados.

Foram realizadas as dosagens de MMP-8, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 pelo método de ELISA; a atividade gelatinolítica das formas da MMP-9 por zimografia; e a atividade da MPO por ensaio colorimétrico.

Houve uma menor atividade gelatinolítica, assim como menores concentrações de MMP-8 e TIMP-2 na STE de DT quando comparadas a DA ($p < 0,05$). A atividade de MPO foi superior no grupo DA em relação a CA ($p < 0,05$). Foram encontradas correlações moderadas e estatisticamente significantes entre a MMP-9 quantificada por ELISA no plasma e todos os parâmetros resultantes da zimografia de STE, isto é, MMP-9 de massa molecular de 92 kDa ($r = 0,37$, $p = 0,002$), 130 kDa ($r = 0,35$, $p = 0,003$), a soma da sua atividade gelatinolítica (130 + 92 kDa) ($r = 0,43$, $p = 0,0002$), gelatinase de 180 kDa ($r = 0,35$, $p = 0,003$), e soma da atividade gelatinolítica total (180+130+92 kDa) ($r = 0,37$, $p = 0,002$). A MMP-8 plasmática apresentou correlação com a atividade gelatinolítica das bandas de 92 kDa ($r = 0,30$ e $p = 0,01$) e soma da atividade gelatinolítica (130 + 92 kDa) ($r = 0,24$ e $p = 0,04$) presentes na STE. Também foi possível observar uma correlação fraca entre a atividade gelatinolítica da MMP-9 de 92 kDa do plasma e a atividade gelatinolítica da banda de 180 kDa ($r = 0,26$ e $p = 0,03$), e uma correlação moderada entre o TIMP-2 do plasma e o TIMP-2 da STE ($r = 0,32$ e $p = 0,04$).

Os resultados mostram que a atividade gelatinolítica da STE pode estar refletindo as concentrações de marcadores inflamatórios sistêmicos tais como a MMP-8 e MMP-9, assim como a concentração de TIMP-2 na STE pode estar refletindo a concentração de TIMP-2 circulante.

A avaliação conjunta destes resultados sugere que existe uma atenuação de alguns dos marcadores inflamatórios analisados na STE e no plasma após o tratamento da DP, e que os níveis salivares e plasmáticos de alguns destes marcadores se correlacionam. Como a coleta de saliva é menos invasiva, mais estudos sobre a correlação destes marcadores nestes dois fluidos pode ser muito interessante. Palavras-chave: saliva, plasma, metaloproteinases da matriz extracelular, doença periodontal.

ABSTRACT

Meschiari, C. A. **Concentrations of MMP-8, MMP-9, MPO, TIMP-1 and TIMP-2 in saliva and their correlations with plasma.** 2011. 102p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of zinc-dependent endopeptidases known to cleave components of the connective tissue in physiological and pathological processes. The regulation of MMP activities is done by the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs).

Periodontal disease (PD) is a chronic inflammation with excessive activity of MMPs, which degrade the tooth supporting tissues.

The saliva components are derived from the local blood supply, and this fluid may therefore reflect the plasma. So, the objectives of this study were: 1) to compare the levels of MMPs, TIMPs and MPO in stimulated whole saliva (SWS) and plasma of PD patients before (PB) and 3 months after (PT) the non-surgical periodontal treatment, and in healthy volunteers at *baseline* (CB) and 3 months after *baseline* (CT), and 2) to evaluate the correlations between the results found.

Measurements of MMP-8, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 were performed by ELISA. Gelatinolytic activity of MMP-9 forms were determined by zymography, and the MPO activity was determined by colorimetric assay.

There was lower gelatinolytic activity, and lower concentrations of MMP-8 and TIMP-2 in STE on PT group compared with PB group ($p < 0.05$). MPO activity was higher in PB compared to CB ($p < 0.05$).

Statistically significant moderate correlations were observed in all associations between MMP-9 performed by ELISA in plasma and gelatinolytic activity bands of STE: MMP-9 molecular form of 92 kDa ($r = 0,37$, $p = 0,0017$), MMP-9 molecular form of 130 kDa ($r = 0,35$, $p = 0,003$), the sum of its gelatinase activity (130 +92 kDa) ($r = 0,43$, $p = 0,0002$), gelatinase of 180 kDa ($r = 0,35$, $p = 0,003$), and the sum of total gelatinase activity (180+130+92 kDa) ($r = 0,37$, $p = 0,002$). Circulating MMP-8 levels correlate with salivary gelatinase activity bands of 92 kDa ($r = 0,30$, $p = 0,01$) and the sum of gelatinase activity (130 +92 kDa) ($r = 0,24$, $p = 0,04$). In addition, a weak correlation between gelatinase activity of plasmatic 92 kDa MMP-9 and gelatinase of 180 kDa in SWS ($r = 0,26$, $p = 0,03$) was found, and a moderate correlation between plasmatic TIMP-2 and TIMP-2 of SWS ($r = 0,32$, $p = 0,004$).

The results show that the gelatinase activity of SWS may reflect the concentrations of systemic inflammatory markers such as MMP-8 and MMP-9, also the concentration of TIMP-2 in the SWS may reflect the circulating concentration of TIMP-2. The evaluation of these results suggests that there is an attenuation of some inflammatory markers analyzed in the SWS and in plasma after treatment of PD. Furthermore, there are correlations between salivary and plasma levels in some of these markers. Because saliva sampling is less invasive, more studies about the correlations between these markers in these two fluids are necessary. Key words: saliva, plasma, matrix metalloproteinases, periodontal disease.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BSA - Albumina sérica bovina

Ca²⁺ - Cálcio

CaCl₂ - Cloreto de cálcio

Cl⁻ - íon cloreto

DP - Doença periodontal

ECM - matriz extracelular

ELISA - Enzyme linked immunosorbent assay

g - gramas

GCF – fluido gengival crevicular

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HOCl - ácido hipocloroso

HRP – horseradish peroxidase

IL - Interleucina

kDa - Quilodaltons

L - Litros

M - Molar

mg - Miligrama

ml - Mililitros

mmol - Milimol

MMPs - Metaloproteinases da matriz extracelular

MT- MMPs - MMP de membrana

ng - nanograma

PBS - Tampão salina fosfato

pH - Potencial hidrogeniônico

PI - Padrão interno

PMN - polimorfonucleares

Saliva total estimulada - STE

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TEMED - tetrametil etilenodiamina

TGF- β - Tumor growth factor beta

TIMPs - Inibidores teciduais das MMPs

TMB - 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

Zn²⁺ - cátion Zinco

ZnCl₂ - Cloreto de zinco

μ l - Microlitro

μ mol - Micromol

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Principais metaloproteinases e suas características estruturais	19
Figura 2: Relação entre saliva total não estimulada/STE	29
Figura 3: Zimograma representativo de STE.....	47
Figura 4: Atividade gelatinolítica da MMP-9 de massa molecular de 92 kDa em amostras de STE.....	48
Figura 5: Atividade gelatinolítica da MMP-9 de massa molecular de 130 kDa em amostras de STE.....	49
Figura 6: Soma da atividade gelatinolítica das formas da MMP-9 em amostras de STE.	50
Figura 7: Atividade da gelatinase de massa molecular de 180 kDa em amostras de STE	51
Figura 8: Atividade gelatinolítica total em amostras de STE	52
Figura 9: Concentrações da MMP-8 em amostras de STE	53
Figura 10: Concentrações da MMP-9 em amostras de STE	54
Figura 11: Concentrações do TIMP-1 em amostras de STE.....	55
Figura 12: Concentrações do TIMP-2 em amostras de STE	56
Figura 13: Atividade de MPO em amostras de STE.....	57
Figura 14: Zimograma representativo de plasma	60
Figura 15: Atividade gelatinolítica da MMP-9 de massa molecular de 92 kDa em amostras de plasma	61
Figura 16: Atividade gelatinolítica da MMP-9 de massa molecular de 102 kDa em amostras de plasma	62

Figura 17: Soma da atividade gelatinolítica das formas da MMP-9 em amostras de plasma.....	63
Figura 18: Atividade de MPO em amostras de plasma	64
Figura 19: Concentração de proteínas em amostras de STE.....	66
Figura 20: Atividade gelatinolítica total em amostras de STE normalizada pela quantidade de proteína presente na amostra.....	69
Figura 21: Níveis plasmáticos dos marcadores inflamatórios normalizados pela quantidade de proteína presente na amostra de STE.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Correlações entre diferentes marcadores inflamatórios encontrados na saliva total estimulada	59
Tabela 2: Correlações entre diferentes marcadores inflamatórios encontrados na saliva total estimulada e plasma.....	67
Tabela 3: Correlações entre diferentes marcadores inflamatórios encontrados na saliva total estimulada, cujos valores foram normalizados pela quantidade de proteína.	73
Tabela 4: Correlações entre diferentes marcadores inflamatórios encontrados na saliva total estimulada e plasma, cujos valores foram normalizados pela quantidade de proteína.	75

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Metaloproteínases da matriz extracelular	18
1.2. TIMPs	21
1.3. Plasma e soro	22
1.4. Doença periodontal	23
1.5. PMN e MPO	25
1.6. Saliva e biomarcadores	26
 2. HIPÓTESE	 32
 3. OBJETIVOS.....	 34
 4. MATERIAIS E MÉTODOS	 36
4.1. Materiais.....	36
4.1.1. Soluções utilizadas nos experimentos	36
4.1.2. Equipamentos utilizados nos experimentos.....	37
4.1.3. Programas de aquisição de dados.....	38
4.2. Métodos.....	38
4.2.1. Seleção dos pacientes.....	38
4.2.2. Coleta da saliva	39
4.2.3. Coleta sanguínea.....	40
4.2.4. Zimografia.....	40
4.2.5. ELISA.....	41
4.2.6. Ensaio de MPO.....	43
4.2.7. Dosagem de proteína pelo método de Bradford:	44
4.2.8. Análise Estatística.....	44
 5. RESULTADOS.....	 47
5.1. Resultados STE	47
5.1.1. Resultados de zimografia	47

5.1.2. Quantificações por ELISA.....	52
5.1.3. Determinação da atividade de MPO	56
5.1.4. Análise de correlação	57
5.2. Resultados de plasma	60
5.2.1. Resultados de zimografia	60
5.2.2. Quantificações por ELISA.....	63
5.2.3. Determinação da atividade de MPO	64
5.3. Resultados de STE versus plasma	65
5.3.1. Análise de correlação	65
5.4. Dosagem de proteínas	66
5.4.1. Normalização pela quantidade de proteína	68
5.4.2. Análise de correlação	72
 6. DISCUSSÃO	77
6.1. Considerações gerais.....	77
6.2. STE	78
6.3. Plasma	86
6.4. STE versus plasma	87
6.5. Dosagem de proteína	90
 7. CONCLUSÃO	93
 8. REFERÊNCIAS.....	95

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Metaloproteínases da matriz extracelular

Metaloproteínases da matriz extracelular (MMPs) são uma família de endopeptidases zinco-dependentes conhecidas por degradar componentes do tecido conjuntivo em processos fisiológicos e patológicos (Kwan, Schulze et al. 2004). As MMPs são produzidas pelos mais diferentes tipos celulares, sendo encontradas em vários tecidos. Estas proteases são sintetizadas e secretadas na forma de zimogênios ou pró-MMPs. Para exercer sua atividade, classicamente, é necessária a clivagem dos seus domínios pró-peptídicos do sítio catalítico da enzima (Visse and Nagase 2003), porém vias alternativas de ativação já foram bem descritas (Ra and Parks 2007). A regulação da atividade das MMPs pode ser feita de três modos: indução da expressão gênica, ativação do zimogênio, e expressão dos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (Castro, Rizzi et al. 2009).

Atualmente, são descritos 28 tipos de MMPs (Schulz 2007), das quais 24 são encontradas em mamíferos (Ra and Parks 2007). São classificadas em seis diferentes grupos: collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas, MMPs de membrana e outras. Essa classificação leva em conta o perfil da MMP expressa (estrutura) e os componentes da matriz (ECM) que elas degradam (Back, Ketelhuth et al. 2010). As MMPs possuem estruturas muito semelhantes entre si, sendo compostas por sítio catalítico, contendo um íon zinco e um pró-peptídeo, ligado a este por uma ligação tipo ponte de dissulfeto. Algumas isoformas das MMPs possuem um domínio chamado “hemopexin-like”, responsável pela afinidade e adesão da enzima aos componentes da ECM (Nagase and Woessner 1999). Mais detalhes sobre a estrutura das MMPs podem ser observados na figura 01.

Figura 1: Principais MMPs e suas características estruturais. As gelatinases (MMP-2 e MMP-9) se diferem das demais por apresentar três repetições do domínios “*fibronectin-like*” (seta) [Modificado de (Chow, Cena et al. 2007)].

As MMPs são responsáveis pela degradação de muitos componentes da ECM, tais como colágeno, caseína, fibronectina, elastina, laminina e proteoglicana (Aimes and Quigley 1995; Kwan, Schulze et al. 2004; Page-McCaw, Ewald et al. 2007). Elas são descritas em eventos fisiológicos tais como: desenvolvimento embrionário, morfogênese, reprodução, reabsorção e remodelamento tecidual (Gross and Lapiere 1962). No entanto, em condições patológicas a atividade excessiva ou desequilibrada das MMPs pode estar associada ao mecanismo de lesão de várias doenças, entre elas: doença periodontal, destruição de cartilagem em artrite, ruptura de placa aterosclerótica, re-estenose coronariana, infarto do miocárdio, desenvolvimento de aneurismas, metástase tumoral, degeneração

macular, entre outras (Azzam, Arand et al. 1993; Birkedal-Hansen 1993; Martel-Pelletier and Pelletier 1996; Nagase and Woessner 1999).

Nos últimos anos, tem-se demonstrado que MMPs também podem degradar muitas moléculas não pertencentes a ECM, desempenhando um importante papel em diferentes processos biológicos tais como: adesão celular (Page-McCaw, Ewald et al. 2007), agregação plaquetária (Sawicki, Salas et al. 1997), regulação do tônus vascular pela clivagem da big endotelina-1 (Fernandez-Patron, Radomski et al. 1999) e do peptídeo gene-relacionado a calcitonina (Ito, Yamada et al. 1998). Além disso, MMPs tem sido descritas como exercendo atividades no meio intracelular (Cauwe and Opdenakker 2010), como por exemplo, em cardiomiócitos, aonde são capazes de degradar troponina I (Gao, Sawicki et al. 2003), Poly-(ADP-ribose) polymerase (Kwan, Schulze et al. 2004), titin (Ali, Cho et al. 2010), e a cadeia leve da miosina-1 (Schulz 2007). Ainda, já foi demonstrado que as MMPs podem clivar moléculas sinalizadoras, o que indica a participação dessas proteinases em processos de multiplicação e diferenciação celular (Overall 2002). Algumas quimiocinas também são substratos das MMPs, sendo que a ação das proteinases pode levar a ativação ou inativação do substrato (McQuibban, Gong et al. 2002; Mohammed, Smookler et al. 2003), dependendo das características do mesmo.

Portanto, com o crescente número de substratos para MMPs, novas funções regulatórias dessas enzimas têm sido descobertas, o que torna cada vez mais relevantes seu estudo.

1.2. TIMPs

A regulação endógena pós-transcricional da atividade das MMPs pode ocorrer pelos TIMPs, sendo estes muito importantes para regular o remodelamento da ECM. A família dos TIMPs é composta por quatro membros: TIMP-1 ao TIMP-4, dos quais o TIMP-1 e -2 são os mais bem caracterizados desta família de proteínas.

A ação inibitória dos TIMPs sobre as MMPs acontecem na estequiometria de 1:1, sendo que o mecanismo dessa interação baseia-se na ligação desses inibidores ao domínio hemopexin-like das MMPs (Nagase, Visse et al. 2006), o que leva a desestruturação da forma terciária da enzima, resultando na perda de atividade catalítica.

Enquanto o TIMP-1, -2 e -4 permanecem solúveis e difusíveis, o TIMP-3 está ligado a ECM (Vanhoutte and Heymans 2010).

Os TIMPs possuem massa molecular de 21~29 kDa, porém diferentes formas glicosiladas podem ser encontradas. Eles possuem seis pontes de dissulfeto cada, responsáveis pela manutenção de sua estrutura terciária (Kandasamy, Chow et al. 2009).

Em geral, não existe um alto grau de especificidade de um TIMP por uma MMP em particular, salvas as exceções do TIMP-1 que possui maior afinidade pela MMP-9 e do TIMP-2 pela MMP-2. Além disso, o TIMP-1 não possui ação inibitória sobre as MT-MMPs (Kandasamy, Chow et al. 2009), e o TIMP-2 não interagem com a MMP-9 (Vanhoutte and Heymans 2010).

Da mesma forma que as MMPs, muitas doenças estão associadas ao aumento ou diminuição dos níveis de TIMPs. Sua regulação normalmente ocorre ao

nível transcricional, sendo afetada por várias citocinas e fatores de crescimento (Stetler-Stevenson 2008).

Outra função dos TIMPs, neste caso o TIMP-2 especificamente, é a ativação da MMP-2 de massa molecular de 72 kDa. O TIMP-2 se complexa com a MMP-14 (MT1-MMP) presente na superfície celular ao mesmo tempo que se liga a MMP-2, forçando a aproximação das duas MMPs. Assim, a MMP-2 ancorada a superfície celular pode ter seu pró-peptídeo clivado por outra MMP-14, formando assim, a MMP-2 ativa de 64 kDa (Ra and Parks 2007).

Além disso, os TIMPs possuem atividades biológicas independentes da sua ação inibitória sobre as MMPs, tais como: crescimento e diferenciação celular, migração celular, anti-angiogenese, e efeito anti- e pró-apoptótico, sendo que os receptores para tais ações ainda estão sendo investigados (Kandasamy, Chow et al. 2009; Vanhoutte and Heymans 2010).

1.3. Plasma e soro

Os níveis circulantes de MMPs e TIMPs têm sido descritos como tendo valor no diagnóstico e prognóstico de muitas doenças (Gerlach, Meschiari et al. 2009) tais como: doença cardiovascular (Tuomainen, Nyysönen et al. 2007), doença periodontal crônica (Marcaccini, Novaes et al. 2009), síndrome do ovário policístico (Gomes, Vieira et al. 2011), artrite reumatóide (Klimiuk, Sierakowski et al. 2003), e diversos tipos de câncer (Roy, Yang et al. 2009; Groblewska, Mroczko et al. 2010).

Existem diferenças nas concentrações de várias moléculas quando se compara soro e plasma de um mesmo indivíduo. A escolha do fluido a ser coletado, assim como os dispositivos utilizados para a colheita parecem influir muito nos

resultados obtidos, por exemplo, os níveis de MMP-2 e -9 no soro são significativamente maiores que no plasma (Mannello, Tonti et al. 2007), além disso, a escolha do anticoagulante utilizado na colheita do plasma parecem interferir na atividade gelatinolítica dessas proteinases (Gerlach, Uzuelli et al. 2005).

A técnica de zimografia é dos métodos mais utilizados para a análise de MMPs no soro e plasma, mas enquanto a zimografia fornece valores de atividade das MMPs, o método de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) permite a quantificação dessas moléculas, porém trata-se de uma técnica de elevado custo devido à utilização de anticorpos e kits importados. Com o método de ELISA também é possível quantificar os TIMPs.

1.4. Doença periodontal

A doença periodontal (DP) é a inflamação crônica causada pela inserção de placa bacteriana no sulco gengival. Caracterizada pela destruição do tecido conjuntivo e ósseo adjacentes ao dente, esta doença é principal causa de perda dos dentes na população adulta (Emekli-Alturfan, Basar et al. 2011). A DP possui uma prevalência de aproximadamente 10% na maioria das populações adultas, chegando a 30% em indivíduos com idade superior a 50 anos (Taba, Kinney et al. 2005; Emekli-Alturfan, Basar et al. 2011).

A progressão desta doença depende de uma interação complexa entre a virulência do patógeno e a imunidade do hospedeiro (Taba, Kinney et al. 2005). A presença da placa bacteriana e seus metabólitos estimulam as células do periodonto a produzirem citocinas pró-inflamatórias, tais como: TGF- β , IL-4, -10 e -12 (Page 1991) que estimulam a liberação de outras citocinas (IL-1, IL-6, TNF- α e PGE₂) e

enzimas neste tecido (Pozo, Valenzuela et al. 2005). Assim, fibroblastos, células do infiltrado inflamatório e outras células do periodonto passam a produzir MMPs que degradam a ECM do tecido conjuntivo periodontal, levando a formação dos bolsos periodontais e conseqüente perda de massa óssea (Gorska and Nedzi-Gora 2006).

Os leucócitos polimorfonucleares (PMN) são a principal fonte de MMPs encontradas na saliva (Uitto, Suomalainen et al. 1990). As proteinases derivadas dessas células, e não das células residentes, são apontadas como responsáveis pela destruição dos tecidos suporte dos dentes na DP (Westerlund, Ingman et al. 1996), dentre as quais se destacam a MMP-8 e -9.

O aumento da expressão de MMPs no tecido inflamatório periodontal leva ao aumento dos níveis de MMPs nos fluidos biológicos como saliva (Buduneli, Mantyla et al. 2010) e fluido crevicular gengival (GCF) (Marcaccini, Novaes et al. 2009). Também é possível observar uma alteração da liberação dos TIMPs, principalmente o TIMP-1, que é produzido pelas células estacionárias do periodonto, macrófagos e monócitos (Gorska and Nedzi-Gora 2006).

Microrganismos e endotoxinas presentes na placa periodontal podem atingir a circulação devido a processos físicos simples, tais como mastigação e escovação. Estes componentes exógenos na corrente sanguínea promovem a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos leucócitos e células endoteliais, o que pode resultar em uma inflamação sistêmica. Níveis circulantes aumentados de diversos marcadores inflamatórios em pacientes com DP e a diminuição desses níveis após o tratamento periodontal não cirúrgico sustentam essa hipótese (Marcaccini, Meschiari et al. 2009).

A relação entre DP e doença cardiovascular tem sido investigada em diversos estudos (Demmer and Desvarieux 2006), pois a inflamação sistêmica induzida pela

DP pode aumentar o risco de acidentes vasculares causados por formação de trombos e agregação plaquetária (Back, Ketelhuth et al. 2010; Emekli-Alturfan, Basar et al. 2011). Um dos mecanismos pelos quais o risco cardiovascular se encontra aumentado seria o aumento das MMPs. Marcaccini *et al.* observaram concentrações plasmáticas aumentadas de MMP-3, MMP-8, e MMP-9 em pacientes com DP em comparação com pacientes controles, adicionalmente, as concentrações de MMP-8 e -9 diminuíram após o tratamento periodontal não cirúrgico, indicando efeitos benéficos do tratamento da DP ao aparelho cardiovascular (Marcaccini, Novaes et al. 2009).

Ainda não existe um consenso sobre o comportamento dos níveis dos TIMP-1 e -2 na DP, pois enquanto em alguns trabalhos as concentrações de TIMPs não se alteraram (Marcaccini, Novaes et al. 2009), outros observaram diferenças apenas nas taxas de MMP-8/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-1 antes e após tratamento (Gorska and Nedzi-Gora 2006). Desta maneira, se acredita que mais estudos sejam necessários para conclusões mais precisas possam ser feitas.

1.5. PMN e MPO

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima de 150 kDa pertencente família das peroxidases cuja principal função é a produção de ácido hipocloroso (HOCl) a partir do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o cloreto (Cl^-) durante o rompimento dos neutrófilos.

Os neutrófilos possuem 6 tipos de grânulos (Gullberg, Andersson et al. 1997), cada um deles é produzido durante diferentes estágios da diferenciação mielóide, e contêm diferentes proteases e outros tipos de enzimas. A MPO pode ser encontrada

nos grânulos primários (ou azurófilos), enquanto proteinases, como a MMP-9 (92 kDa) estão localizada nos grânulos terciários (Marcaccini, Meschiari et al. 2010). Nos grânulos secundários é encontrado a lipocalina associada a gelatinase de neutrófilos (NGAL), uma proteína de 25 kDa que se liga covalentemente na MMP-9 formando um complexo de 130 kDa, que é encontrado também nos grânulos terciários (Kjeldsen, Bainton et al. 1994; Sengelov, Boulay et al. 1994).

A ativação dos PMN e secreção de seus grânulos depende da natureza do estímulo recebido, que podem ser citocinas, prostaglandinas, e patógenos derivadas de microrganismos, sendo que todas estas moléculas podem ser encontradas no tecido periodontal inflamado (Birkedal-Hansen 1993).

A MPO tem sido apresentada como um marcador da DP no GCF (Kaner, Bernimoulin et al. 2006; Marcaccini, Meschiari et al. 2010), porém ainda é pequeno número de trabalhos que mostram a MPO na STE e sua relação com a DP (Sakamoto, Fujii et al. 2008).

1.6. Saliva e biomarcadores

Atualmente, a preocupação e os gastos com a saúde, assim como a velocidade na obtenção de diagnósticos tem impulsionado a ciência a procurar novas técnicas e biomarcadores que tornem esses processos mais dinâmicos. Deste modo, a saliva está emergindo como uma alternativa viável sobre a coleta de sangue (Farnaud, Kosti et al. 2010).

Saliva é um fluido hipotônico que banha a cavidade oral e ajuda a manter a sua homeostase. Secretada pelas glândulas salivares, a saliva é composta principalmente de água, eletrólitos e moléculas orgânicas (por exemplo:

aminoácidos, proteínas e lipídeos) (Miller, Foley et al. 2010). A água da saliva tem origem do leito capilar local e entram nas glândulas salivares por difusão intracelular, canais de aquaporina e outras vias extracelulares (Haeckel and Hanecke 1996; Verkman, Yang et al. 2000). Moléculas pequenas e neutras conseguem se difundir do plasma para as glândulas salivares, já os eletrólitos entram na saliva por pressão osmótica, e esse processo é regulado pela taxa de secreção salivar, nível de mineralocorticóides e presença de estímulos externos. Os componentes orgânicos da saliva são majoritariamente sintetizados, armazenados e secretados pelas células acinares.

São encontrados dois tipo de secreções na saliva: serosa e mucosa. A primeira secreção é produzida principalmente pelas glândulas parótidas, e é formada por muitas proteínas albuminóides mais a α -amilase, enzima que degrada o amido da alimentação. A secreção mucosa é composta glicoproteínas como a mucina, responsáveis pela lubrificação e proteção da cavidade bucal (Guyton and Hall 2006).

A saliva total é uma mistura de componentes produzidos e secretados pelas glândulas salivares parótida, submandibular e sublingual, responsáveis por 90% de seu volume, que varia de 500 a 1.000 ml por dia. Também são encontrados na saliva total componentes não salivares como: GCF, secreções brônquio-nasais, soro e sangue total derivados de ferimentos, células epiteliais esfolheadas e resíduos da alimentação e microrganismos (Greabu, Battino et al. 2009).

Os componentes da saliva são derivados da vascularização local que se origina das artérias carótidas, sendo assim, é possível se encontrar neste fluido o reflexo de muitas moléculas presentes no plasma, o que o torna uma valiosa e promissora amostra para o diagnóstico de várias doenças sistêmicas. Portanto, alguns autores já a denominam como “espelho do corpo” (Farnaud, Kosti et al. 2010).

Muitos trabalhos já descrevem a utilização da saliva para a detecção antecipada de doenças bucais e sistêmicas, por ser uma via de coleta não-invasiva e de rápido acesso, dispensando a utilização de equipamentos e profissionais especializados (Lawrence 2002).

Já estão descritas as correlação de moléculas endógenas como citocinas, prostaglandinas, anticorpos, hormônios, MMPs, TIMPs, fator tecidual, ácido siálico entre saliva total e plasma (Greabu, Battino et al. 2009; Marcaccini, Meschiari et al. 2009; Emekli-Alturfan, Basar et al. 2011; Oktay, Basar et al. 2011). A saliva também pode ser utilizada para detectar substâncias exógenas como medicamentos e drogas de abuso, podendo também, detectar a infecção por microrganismos (vírus, bactérias e fungos), através da presença de proteínas e DNA microbianos, ou anticorpos do hospedeiro contra esses patógenos. (Lawrence 2002; Segal and Wong 2008).

A dosagem de marcadores salivares pode ser feita utilizando-se um tipo específico de saliva (parótida, sublingual ou submandibular) ou saliva total, pois é possível que elas apresentem diferentes quantidades de biomarcadores. Até o presente momento, a maioria dos estudos tem utilizado somente saliva total com ou sem estimulação. A saliva total não estimulada é normalmente coletada pelo método de escoamento, isto é, o voluntário inclina sua cabeça para frente assim que o fluido se acumula na região anterior da boca, ele é derramada em recipiente largo e estéril. A saliva total estimulada (STE) é obtida através de mastigação ou estímulos gustatórios (por exemplo, uso de soluções ácidos ou adocicadas) e expectoração dessa saliva em um tubo estéril. A coleta da STE é mais rápida e fácil, porém os estímulos utilizados podem alterar o pH ou exacerbar a secreção de água, diluindo os análitos de interesse (Miller, King et al. 2006). A relação entre as concentrações

de alguns marcadores inflamatórios encontradas na saliva total não estimulada e na STE, assim como a relação entre a saliva total não estimulada e o soro, pode ser visualizada na figura 2.

É possível observar que praticamente todas as moléculas quantificadas encontram-se em maior concentração na saliva total não estimulada em comparação com a STE. Porém, quando se compara saliva total não estimulada e soro, a maioria desses marcadores estão mais concentrados neste segundo fluido.

Figura 2: Relação entre saliva total não estimulada/STE (valores entre parenteses). As taxas entre saliva total não estimulada/soro podem ser observadas nas barras (e seus valores absolutos são mostrados em sequência). Resultados obtidos de amostras de fluidos de 45 adultos saudáveis [reproduzido de (Miller, King et al. 2006)].

Estudos de proteômica relataram que 27% das proteínas presentes na saliva total também são encontradas no plasma. Ainda, aproximadamente 40% de

proteínas sugeridas como marcadores de doenças como câncer, doença cardiovascular e acidente vascular cerebral podem ser encontrados na saliva total (Loo, Yan et al. 2010).

A automação de análises realizadas com saliva já está se tornando realidade. Artigos de revisão já trazem idéias ou aparelhos capazes de fazer medições rápidas e seguras (Miller, King et al. 2006; Segal and Wong 2008). Por exemplo, existe um equipamento descrito por Herr *et al.* (Herr, Hatch et al. 2007) que integra um pré-tratamento de amostras de saliva (filtração, homogenização e enriquecimento) com um ensaio de imuno-eletroforese. Segundo os autores, este método é capaz de realizar medições rápidas e confiáveis de MMP-8, utilizando apenas 20 µl de amostra e emitindo resultados em menos de 10 minutos. Neste trabalho foram utilizadas amostras de pacientes saudáveis e com DP para a validação do método. Assim, a técnica pode vir a ser uma triagem para o diagnóstico e/ou risco de desenvolver DP.

HIPÓTESE

2. HIPÓTESE

(1) Sabendo que existe uma relação entre os níveis sistêmicos de marcadores inflamatórios e DP, acredita-se que as MMPs e a MPO possam ter seus níveis plasmáticos e salivares aumentado em pacientes com DP;

(2) Outro possível marcador inflamatório importante são os TIMPs, que apesar das incertezas relacionadas às alterações das suas concentrações na saliva e no plasma em estudos com DP, podem desempenhar um importante papel no controle da atividade das MMPs durante esta doença;

(3) Considerando que existe uma comunicação entre a saliva total e o sangue, ainda não se sabe se há correlação entre a alteração das MMPs e TIMPs circulantes e na STE;

a hipótese deste trabalho é de que as alterações nos níveis de MMPs, TIMPs e MPO produzidas pela DP possam ser verificadas na saliva e no plasma e se correlacionem entre si.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

(1) Avaliar o perfil das MMP-8, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e MPO no plasma e STE de indivíduos com DP e com saúde periodontal, antes e depois do tratamento periodontal não cirúrgico;

(2) Correlacionar a concentração ou atividade desses marcadores inflamatórios no plasma e STE.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Soluções utilizadas nos experimentos

- PBS (phosphate saline buffered): 137 mmol/l NaCl, 2,7 mmol/l KCl, 8,1mmol/l Na_2HPO_4 , 1,5 mmol/l KH_2PO_4 , pH 7,3.
- Solução de bloqueio: PBS adicionado de BSA (albumina sérica bovina) a 1%
- Solução de acrilamida 30% e bisacrilamida (0,8%);
- Solução de gelatina: 40 mg/ml
- Tampão utilizado no gel de separação: Tris-HCl/SDS, pH 8,8;
- Tampão utilizado no gel de largada: Tris-HCl/SDS, pH 6,8;
- Persulfato de Amônio 10%;
- TEMED;
- Tampão de amostra não-redutor: SDS 2%, 125 mmol/l Tris, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,001%; ph 6,8;
- Solução de TritonX-100 a 2%;
- Solução de Agarose 3%;
- Solução de coloração: Coomassie Brilliant Blue G-250 0,05%, metanol 30%, ácido acético 10%;
- Solução de descoloração: Metanol 25% e Ácido acético 7%;
- Solução tampão de Tris- CaCl_2 (50 mmol/l Tris, 10 mmol/l CaCl_2 , 1 $\mu\text{mol/l}$ ZnCl_2);
- Kits Quantikine and DuoSet human ELISA Development kits (R&D Systems, DY908, DY911, DY970 e DY971);

- Kit de substrato colorimétrico: BD OptEIA (55214);
- Anticorpos anti-MMP-8: MAB908 (captura) e BAF908 (detecção biotinilado) (R&D Systems);
- Estreptavidina-HRP: DY998 (R&D Systems);
- kit para separação de leucócitos: Histopack 1119 e 1077 (Sigma);
- Tampão NaPO_4 : NaPO_4 a 0,08 mol/l pH 5,4;
- Solução de TMB: 1,6 mmol/ml em DMSO;
- Solução de peróxido de hidrogênio: 0,5 mmol/l em tampão NaPO_4 ;
- Ácido sulfúrico 4 N;
- Os demais reagentes não especificados foram adquiridos da Sigma (St. Louis, USA).

4.1.2- Equipamentos utilizados nos experimentos

- Balança de precisão (Sciencetech SA 120);
- pHmetro (Digimed DM-20);
- Centrífuga refrigerada (Eppendorf 5810R);
- Micropipetas: HTL Labmate;
- Espectrofotômetro: μ QuantTM microplate reader (Bio-Tek Instruments Inc);
- Fonte de eletroforese (Loccus – EPS 301);
- Sistema de fotodocumentação: DNR MF-chemiBis 1.6.

4.1.3 - Programas de aquisição de dados

- KCJunior (Molecular Devices Inc., USA);
- GelCapture 5.0 (DNR Bio Imaging System Ltd., Israel);
- Totallab TL100 v2006c (Totallab Ltd, UK);
- Graphpad Prism 5.0 for Windows (Software Mackiev, USA).

4.2. Métodos

4.2.1. Seleção dos pacientes

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (FORP-USP) sob o número de protocolo 0063.0.138.000-05. Os pacientes voluntários foram informados verbalmente e por escrito sobre os propósitos do estudo, e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido antes de sua inclusão na pesquisa.

A seleção dos pacientes, diagnóstico e tratamento da DP foram realizados de acordo com (Marcaccini, Meschiari et al. 2009; Marcaccini, Novaes et al. 2009). Todos os pacientes foram examinados e tratados por uma única periodontista (Dr^a. A.M.M.).

Os pacientes incluídos no estudo tinham de 35 a 55 anos e possuíam no mínimo 20 dentes sem comprometimento endodôntico. Os critérios para que os pacientes fossem incluídos no grupo de DP era de que tivessem pelo menos 2 dentes com sítios de sondagem ≥ 5 mm, com perda de inserção clínica ≥ 6 mm e

evidências de perda óssea alveolar observáveis radiograficamente. Indivíduos que apresentavam saúde periodontal foram incluídos no grupo controle.

Foram excluídos indivíduos que tivessem recebido qualquer cirurgia periodontal nos últimos seis meses, ou fizeram uso de antibióticos, antiinflamatórios não esteroidais, esteróides, imunossupresores, anticoagulantes ou anti-hiperlipidêmicos nesse mesmo período. Também foram critérios de exclusão: doenças crônicas, doenças infecciosas, gravidez, lactação, fumantes e ex-fumantes (que pararam de fumar há menos de 10 anos).

Os parâmetros clínicos de número de dentes, profundidade de sondagem e nível de inserção clínica foram analisados pela periodontista em seis lados de cada dente antes e após a terapia periodontal utilizando equipamento de sondagem computadorizada (Florida Probe).

Todos os indivíduos selecionados para este estudo receberam instruções de higiene bucal e profilaxia supragengival, e foram re-examinados a cada 15 dias, durante 3 meses. As coletas de sangue e STE foram realizadas no início da pesquisa (*baseline*) e também após 3 meses.

Os pacientes selecionados para grupo DP foram submetidos ao tratamento periodontal não cirúrgico (básico), que consistiu em quatro sessões de raspagem cada uma com uma hora de duração. Todas as sessões foram realizadas em um período máximo quatro semanas.

4.2.2. Coleta da saliva

A STE foi coletada por expectoração após os pacientes mastigarem uma pequena folha de parafilme (Parafilm). As amostras foram submetidas a

centrifugação branda (15 minutos a 2000 rpm a 4°C, para evitar a degradação das proteases) para separar células sem lisá-las, até 1h após sua coleta. Em seguida, os sobrenadantes foram novamente centrifugados (10 minutos a 12.000 g, 4°C) para a separação de partículas, proteínas insolúveis e microrganismos que ainda estivessem em suspensão.

4.2.3. Coleta sanguínea

Os pacientes foram aconselhados a fazer jejum de 12 horas antes da coleta de sangue por punção venosa. A colheita foi realizada com dispositivos Vacutainer (BD) contendo heparina como anticoagulante. Os tubos foram imediatamente centrifugados para a separação do plasma (15 minutos, 2.000 rpm, 4°C) e, em seguida, colocados em banho de gelo até o término da divisão em alíquotas em microtubos para centrífuga (eppendorfs). As amostras foram armazenadas em freezer -80°C até a sua utilização.

4.2.4. Zimografia

A técnica de zimografia é muito utilizada para determinação dos níveis de MMPs no plasma e outras amostras biológicas (Gerlach, Uzuelli et al. 2005; Souza-Tarla, Uzuelli et al. 2005; Gerlach, Demacq et al. 2007).

Resumidamente, o método se baseia na co-polimerização de um substrato (gelatina) ao gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). As proteínas aplicadas no gel de eletroforese são separadas por uma corrente elétrica de acordo com sua massa

molecular. A intensidade das bandas formadas e sua posição no gel indicam, respectivamente, a atividade e a massa molecular da enzima analisada.

Amostras de plasma e saliva total foram previamente preparadas em tampão de amostra não-redutor e aplicadas em géis de poliacrilamida a 7% mais gelatina 0,1% e separadas por corrente elétrica de 16 mA. Após o tempo da eletroforese, os géis foram submetidos a dois banhos de solução a 2% de Triton X-100, para remover o SDS, e colocados em tampão de Tris CaCl_2 pH 7,4, por 18 horas, a 37 °C. Posteriormente, os géis foram fixados e corados em solução Coomassie Blue 0,05% por 3 horas. Para a visualização das bandas referentes às MMPs os géis foram descorados com metanol a 25% e ácido acético a 7%. Observou-se a formação de bandas claras contra o fundo azul do Coomassie (devido à degradação da gelatina incorporada ao gel pela atividade das MMPs).

Em cada gel, foi adicionado uma alíquota de um padrão interno (4 μl de soro fetal bovino), representado nas figuras como PI. A adição do PI possibilitou normalizar as atividades gelatinolíticas obtidas entre os géis, eliminando fatores de confusão interensaios, podendo assim, compará-los de maneira mais adequada. As bandas da MMP-9 foram fotografadas com o sistema DNR MF-chemiBis 1.6, e quantificadas com o programa de análise de imagem Totallab TL100 v2006c. As formas da MMP-9 da saliva total foram identificadas pelas suas massas moleculares: 92, 130, e 180 kDa.

4.2.5. ELISA

O teste de ELISA é conhecido pela sua alta sensibilidade e especificidade em análises quantitativas de moléculas orgânicas, baseada na ligação antígeno-anticorpo. Quando se utilizam dois anticorpos com especificidade e seletividade para

o mesmo antígeno, porém diferentes epítomos, esta técnica é chamada de ELISA sandwich (Abbas and Lichtman 2004).

Nesta técnica, é aplicado na microplaca o anticorpo conhecido como anticorpo de captura, que fica aderido na mesma por interações eletrostáticas. A seguir, é aplicada uma solução de bloqueio (PBS/BSA) para que todos os sítios da microplaca passíveis de ligação com proteínas sejam ocupado. Então, são colocadas as amostras contendo os antígenos de interesse, que ficam ligados aos anticorpos de captura. Logo após, são aplicados o anticorpo de detecção (que esta quimicamente ligado a moléculas de biotina) e uma solução de estreptavidina conjugada a peroxidase. A estreptavidina forma ligação com a biotina, que é proporcional a concentração do anticorpo de detecção existente na placa.

Em seguida, são adicionados os substratos que forneceram coloração a solução. Esta reação é baseada na degradação de peróxido de hidrogênio que produz espécies reativas de oxigênio, e essas oxidam um substrato (TMB) que se torna amarelo, sendo a intensidade desta cor proporcional a quantidade peroxidase presente na placa.

Por fim, é realizada uma leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 450nm onde se determina a absorbância das amostras, e com estes valores se calcula a concentração do antígeno analisado através de uma curva de calibração.

Foram realizadas as dosagens de MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 no utilizando os kits Quantikine and DuoSet human ELISA Development kits (R&D Systems DY911, DY970 e DY971 respectivamente), de acordo com as instruções do fabricante. A dosagem de MMP-8 não foi realizada com um kit, mas sim com anticorpos vendidos

separadamente pela R&D Systems. Os anticorpos utilizados foram: MAB908 (captura) e BAF908 (detecção biotinilado).

4.2.6. Ensaio de MPO

Este ensaio foi realizado como descrito em (Marcaccini, Meschiari et al. 2010).

A análise de MPO é um ensaio colorimétrico baseado na degradação do peróxido de hidrogênio, levando a produção de espécies reativas de oxigênio que oxidam um substrato (TMB) que se torna colorido, sendo a intensidade desta coloração proporcional a quantidade de enzima na amostra.

Para construir uma curva de calibração, foi coletado sangue de um voluntário e separou-se a fração de PMN utilizando o kit Histopack. O número dessas células foi estimado por contagem em microscopia óptica. Em seguida, os leucócitos em questão foram centrifugados e ressuspensos em volume conhecido solução de lise. Diferentes volumes de amostra de STE e plasma foram testados separadamente até que se conseguisse valores adequados de absorbância e linearidade (dentro do intervalo da curva de calibração). Por fim, foi escolhido o volume 5 µl para ambas as amostras. Assim, os resultados obtidos neste experimento são dados em PMNs/µl de amostra.

Resumidamente, em uma microplaca de 96 poço foi adicionado: 45 µl de tampão NaPO₄, 5 µl de amostra, 25 µl de solução de TMB e 100 µl de H₂O₂ 0,5 mmol/l. A placa é incubada a temperatura ambiente por 20 minutos e, em seguida, a reação é finalizada com solução de ácido sulfúrico a 4 N. A coloração amarela produzida foi quantificada em espectrofotômetro de luz visível (450 nm).

4.2.7. Dosagem de proteína pelo método de Bradford

Para a quantificação de proteínas da STE, foi utilizado o método de Bradford, que consiste em um ensaio colorimétrico quantitativo, baseado na reação do Commassie Brilliant Blue-G 250 em pH ácido com as proteínas da solução.

Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 5 μ L de amostra e 200 μ L de reagente de Bradford. A coloração azul desenvolvida no contato do reagente com as proteínas foi quantificada em espectrofotômetro de luz visível (595 nm). A intensidade absorbância varia de acordo com a quantidade de proteína presente na amostra, e seus resultados são comparados a uma curva de calibração construída com concentrações conhecidas de BSA.

4.2.8. Análise Estatística

Os níveis de MMP-8, MMP-9, MPO, TIMP-1, TIMP-2, quantidade total de proteína e a atividade gelatinolítica das bandas encontradas nos zimogramas tiveram seus valores separados em dois grupos e dois períodos de acordo com a classificação do paciente: doença periodontal antes do tratamento não cirúrgico (DA) (n = 23), doença periodontal após o tratamento (DT) (n = 19), controle no início do estudo (*baseline*) (CA) (n = 19) e controle após 3 meses (CT) (n = 11). Além disso, foi analisado se a distribuição dos dados de cada grupo era gaussiana. Na descrição dos resultados são apresentadas média $\pm$ desvio padrão de cada grupo.

Foi utilizado o teste *t* pareado para comparar as médias de DA *versus* DT. No caso dos grupos CA e CT, por ter havido perda de um terço dos voluntários, o teste empregado foi o teste *t* não-pareado, uma vez que o pareamento destes dois grupos não foi significativo durante as análises, devido a discrepância entre o número de

voluntários com amostras antes e após o tratamento. Além disso, foram feitos *testes t* não-pareados para se comparar as médias de DA *versus* CA e DT *versus* CT. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. São apresentados todos os valores de p ao longo da seção de resultados, pois em algumas comparações o valor de p se aproxima do que se considerou significativo, e possivelmente a comparação de um número maior de amostras levaria a uma comparação mais fidedigna.

Correlações entre os marcadores inflamatórios do plasma e da STE foram realizadas usando os quatro grupos (DA, CA,DT e CT) juntos na mesma análise de correlação, sendo que se a distribuição dos dados era normal, foi utilizado a correlação de Pearson, caso contrário, se utilizou a correlação de Spearman.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Resultados STE

5.1.1. Resultados de zimografia

Um gel representativo da zimografia de STE pode ser visualizado na figura 3.

Figura 3: Zimograma representativo de STE. As massas moleculares das gelatinases estão representadas na figura. DA: paciente com doença periodontal antes do tratamento não cirúrgico; DT: paciente com doença periodontal após o tratamento, CA: paciente controle no início do estudo; CT: paciente controle após 3 meses. PI: soro fetal bovino.

A atividade gelatinolítica das MMPs de 92 kDa, 130 kDa e 180 kDa foram obtidas pela quantificação da densidade óptica das bandas no zimograma preparado com gelatina. Também foi feita a soma das formas de 130 e 92 kDa, e das formas de 180, 130 e 92 kDa.

Figura 4: Atividade gelatinolítica da MMP-9 de massa molecular de 92 kDa em amostras de STE. Menor atividade gelatinolítica foi detectada no grupo com DP após o tratamento em relação ao *baseline*. DA: pacientes com doença periodontal antes do tratamento não cirúrgico; DT: pacientes com doença periodontal após o tratamento, CA: pacientes controles no início do estudo; CT: pacientes controles após 3 meses. As barras indicam as médias. * $p < 0,05$.

Os resultados mostram que a forma de 92 kDa da MMP-9 (Figura 4) apresenta valores mais baixos no grupo DT ($1,39 \pm 1,04$) e no grupo CT ($1,07 \pm 0,66$) quando comparados ao período anterior ao tratamento (DA: $2,97 \pm 2,72$) e (CA: $2,34 \pm 2,19$). Não houve diferença entre os grupos DA e CA ($p = 0,47$), mas houve uma diminuição estatisticamente significativa desta forma da MMP-9 nos pacientes com DP antes e depois do tratamento (DA *versus* DT, $p = 0,032$), ou seja, o tratamento resultou na diminuição desta forma da MMP-9 na STE. No grupo controle, também foi verificada uma diminuição dos valores desta forma da MMP-9 após o tratamento, entretanto a diferença não atingiu significância estatística ($p = 0,07$).

Na Figura 5 podem ser observados os resultados de atividade gelatinolítica da MMP-9 ligada a lipocalina (130 kDa). Os pacientes DA apresentam média ($0,68 \pm 0,43$) maior que o mesmo grupo após o tratamento ($0,52 \pm 0,47$) ($p = 0,07$), assim

como o grupo CA ($0,81 \pm 0,73$) teve uma média maior que esse mesmo grupo após 3 meses (CT: $0,38 \pm 0,23$) ($p = 0,065$), entretanto, não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa nestas comparações. Também não foi encontrada diferença entre as médias dos grupos DA e CA ($p = 0,47$).

Figura 5: Atividade gelatinolítica da MMP-9 de massa molecular de 130 kDa em amostras de STE. Não houve diferença na atividade gelatinolítica entre os diferentes grupos. DA: pacientes com doença periodontal antes do tratamento não cirúrgico; DT: pacientes com doença periodontal após o tratamento, CA: pacientes controles no início do estudo; CT: pacientes controles após 3 meses. As barras indicam as médias.

Foi realizado a soma da atividade gelatinolítica das formas de 130 e 92 kDa da MMP-9 (Figura 6). Valores mais altos são verificados no grupo DA ($3,65 \pm 2,97$) e no grupo CA ($3,16 \pm 2,74$) em relação aos respectivos controles (DT: $1,91 \pm 1,49$ e CT: $1,44 \pm 0,86$). Não houve diferença entre os grupos DA e CA ($p = 0,58$), mas houve atenuação estatisticamente significativa da soma da atividade dessas formas da MMP-9 entre o grupo DA e DT ($p = 0,026$), o que sugere ter ocorrido influência do tratamento neste parâmetro analisado. No caso do grupo controle, se pode observar

uma diminuição dos valores das médias, entretanto esta diferença não atingiu significância estatística (CA versus CT) ($p = 0,054$).

Figura 6: Soma da atividade gelatinolítica das formas da MMP-9 em amostras de STE. Houve uma menor uma atividade gelatinolítica detectada no grupo com DP após o tratamento em relação ao *baseline*. DA: pacientes com doença periodontal antes do tratamento não cirúrgico; DT: pacientes com doença periodontal após o tratamento, CA: pacientes controles no início do estudo; CT: pacientes controles após 3 meses. As barras indicam as médias. * $p < 0,05$.

A banda de 180 kDa tem sido apontada como um homodímero da MMP-9 (92 kDa) (Marcaccini, Meschiari et al. 2010). No passado ela também foi considerada um trimêro da MMP-2 a partir de caracterização com soro de coelho imunizado com MMP-2 (Makela, Salo et al. 1994). Independentemente da natureza dessa MMP, ela possui atividade gelatinolítica verificada em zimografia, deste modo, sua ação pode contribuir na patogênese da DP, logo foi considerado importante estudá-la. Os resultados obtidos nos zimogramas para a banda de 180 kDa (Figura 7) mostram que níveis mais altos são encontrados em DA ($0,73 \pm 0,81$) quando comparado a DT ($0,31 \pm 0,34$) ($p = 0,021$). Não houve diferença entre o grupo DA e CA ($0,79 \pm 0,85$)

($p = 0,79$). Os valores da gelatinase de 180 kDa são mais altos no grupo controle no *baseline* do que após 3 meses (CT: $0,25 \pm 0,17$) ($p = 0,049$).

Figura 7: Atividade da gelatinase de massa molecular de 180 kDa em amostras de STE. Menor atividade gelatinolítica detectada no grupo com DP após o tratamento em relação ao *baseline*. Também foi observada menor atividade gelatinolítica quando se comparou o grupo controle no *baseline* e após 3 meses. DA: pacientes com doença periodontal antes do tratamento não cirúrgico; DT: pacientes com doença periodontal após o tratamento, CA: pacientes controles no início do estudo; CT: pacientes controles após 3 meses. As barras indicam as médias. * $p < 0,05$, ** $p < 0,05$.

Na Figura 8 podem ser observados os resultados de atividade gelatinolítica total obtida de cada amostra, isto é, foi feita a soma da atividade das bandas encontradas no zimograma (180, 130 e 92 kDa). Este parâmetro pode ser mais relevante, uma vez que ele reflete de forma mais global o potencial de atividade proteolítica da saliva.

Podem ser observados valores mais altos no grupo DA ($4,38 \pm 3,65$) e no grupo CA ($3,96 \pm 3,57$) em relação aos respectivos controles (DT: $2,22 \pm 1,81$ e CT: $1,07 \pm 1,00$). Não houve diferença entre os grupos DA e CA ($p = 0,07$), mas houve uma diminuição estatisticamente significativa entre o grupo DA e DT ($p = 0,023$), ou

seja, o tratamento da DP diminuiu atividade gelatinolítica total nas amostras de STE. No grupo controle também é possível observar uma diminuição na média da atividade gelatinolítica total (CA *versus* CT) ($p = 0,049$).

Figura 8: Atividade gelatinolítica total em amostras de STE. Menor atividade gelatinolítica foi detectada no grupo com DP após o tratamento em relação ao *baseline*. Também foi observado menor atividade gelatinolítica quando se comparou o grupo controle no *baseline* e após 3 meses. DA: pacientes com doença periodontal antes do tratamento não cirúrgico; DT: pacientes com doença periodontal após o tratamento, CA: pacientes controles no início do estudo; CT: pacientes controles após 3 meses. As barras indicam as médias. * $p < 0,05$, ** $p < 0,05$.

5.1.2. Quantificações por ELISA

Na figura 9 são apresentadas as concentrações (ng/ml) de MMP-8 na STE, havendo valores superiores no grupo DA ($2,85 \pm 0,84$) em comparação com o grupo CA ($2,37 \pm 0,95$) ($p = 0,018$), e também com aqueles verificados no grupo DT ($2,60 \pm 0,79$) ($p = 0,044$). Os níveis de MMP-8 nos controles após 3 meses (CT $1,99 \pm 0,90$) não foram diferentes do *baseline* (CA *versus* CT, $p = 0,27$).

Figura 9: Concentrações da MMP-8 em amostras de STE. Os pacientes com DP possuem níveis mais altos desta collagenase que seu respectivo controle, e ocorreu diminuição nesses níveis no grupo com DP após o tratamento em relação ao *baseline*. DA: pacientes com doença periodontal antes do tratamento não cirúrgico; DT: pacientes com doença periodontal após o tratamento, CA: pacientes controles no início do estudo; CT: pacientes controles após 3 meses. As barras indicam as médias. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,05$.

Na figura 10 pode ser observada a concentração total de MMP-9 dosada por ELISA presentes nas amostras de STE. Não houve diferença entre os grupos DA ($101,00 \pm 77,23$) e CA ($92,48 \pm 72,21$) ($p = 0,34$). Também não foram encontradas diferenças entre as médias nas comparações DA *versus* DT ($85,93 \pm 114,80$) ($p = 0,71$) e CA *versus* CT ($88,03 \pm 117,50$) ($p = 0,89$).

Figura 10: Concentrações da MMP-9 em amostras de STE. Não foram encontradas diferenças os pacientes com DP e seus controles, assim como não houve diferença entre as médias dos grupos encontradas no *baseline* e após 3 meses. DA: pacientes com doença periodontal antes do tratamento não cirúrgico; DT: pacientes com doença periodontal após o tratamento, CA: pacientes controles no início do estudo; CT: pacientes controles após 3 meses. As barras indicam as médias.

A figura 11 revela não haver diferença estatisticamente significante na comparação entre os valores das médias das concentrações do ELISA de TIMP-1 do grupo DA ($101,2 \pm 111,40$) e CA ($102,50 \pm 127,10$) ($p = 0,97$), DA *versus* DT ($70,73 \pm 91,81$) ($p = 0,58$), CA *versus* CT ($65,73 \pm 101,10$) ($p = 0,41$), ou DT *versus* CT ($p = 0,39$).

Figura 11: Concentrações do TIMP-1 em amostras de STE. Não foram encontradas diferenças entre os pacientes com DP e seus controles, assim como não houve diferença entre as médias dos grupos encontradas no *baseline* e após 3 meses. DA: pacientes com doença periodontal antes do tratamento não cirúrgico; DT: pacientes com doença periodontal após o tratamento, CA: pacientes controles no início do estudo; CT: pacientes controles após 3 meses. As barras indicam as médias.

Com os dados obtidos do ELISA de TIMP-2 (Figura 12), foi verificado que o grupo DA possui uma maior concentração desse inibidor ($67,70 \pm 57,84$) maior que o grupo controle (CA: $31,81 \pm 29,82$) ($p = 0,02$). O grupo DT ($38,56 \pm 23,23$) apresentou níveis de TIMP-2 menores que o grupo DA ($p = 0,006$). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada quando se comparou o grupo controle antes a após 3 meses (CA *versus* CT: $23,29 \pm 18,83$) ($p = 0,34$).

Figura 12: Concentrações do TIMP-2 em amostras de STE. Os pacientes com DP possuem níveis mais altos do inibidor que seu respectivo controle, e também ocorreu a diminuição nesses níveis no grupo com DP após o tratamento em relação ao *baseline*. DA: pacientes com doença periodontal antes do tratamento não cirúrgico; DT: pacientes com doença periodontal após o tratamento, CA: pacientes controles no início do estudo; CT: pacientes controles após 3 meses. As barras indicam as médias. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,05$.

5.1.3. Determinação da atividade de MPO

Na figura 13 pode ser verificado que a atividade da MPO no grupo DA ($187,80 \pm 125,50$) é maior que em seu respectivo controle (CA: $112,50 \pm 86,29$) ($p = 0,03$). Pode-se observar uma diminuição do número de PMN/ μl quando se compara os pacientes com DP antes e após tratamento (DT: $132,72 \pm 94,33$), entretanto, a diferença entre as médias não se atingiu significância estatística ($p = 0,08$). Não houve diferença quando foram comparados os pacientes controles antes e após o tratamento (CA versus CT: $94,32 \pm 95,16$) ($p = 0,68$).

Figura 13: Atividade de MPO em amostras de STE. Houve uma menor quantidade de PMN/μl detectada no grupo com DP em relação aos pacientes controles no *baseline*. DA: pacientes com doença periodontal antes do tratamento não cirúrgico; DT: pacientes com doença periodontal após o tratamento, CA: pacientes controles no início do estudo; CT: pacientes controles após 3 meses. As barras indicam as médias. * $p < 0,05$.

5.1.4. Análise de correlação

Foram correlacionados os marcadores inflamatórios presentes na STE. As comparações presentes na tabela 1 foram realizadas pela correlação de Pearson, se a distribuição dos dados era gaussiana, ou pela correlação de Spearman, caso esse requisito não fosse cumprido. As correlações cujo valor de p foi $>$ do que 0,05 não foram apresentadas.

Os resultados da tabela 1 mostram que existem correlações fortes entre a atividade gelatinolítica das diferentes gelatinases encontradas na zimografia de STE. As formas de 92 kDa, 130 kDa, sua respectiva soma (130+92 kDa), a gelatinase de 180 kDa e soma da atividade gelatinolítica total se correlacionam fortemente entre si,

com coeficiente de correlação (r) que varia de 0,75 a 0,99. Além disso, essas correlações possuem altíssima significância estatística ($p < 0,0001$).

Pode ser observada uma correlação positiva (embora fraca) entre a MMP-9, dosada pelo método de ELISA e a atividade da MPO ($r = 0,27$ e $p = 0,016$), assim como a correlação positiva e moderada entre o TIMP-2 e a MPO ($r = 0,45$ e $p < 0,0001$). Ainda, foi encontrada correlação positiva e moderada entre os resultados de MMP-8 e TIMP-2 ($r = 0,42$ e $p < 0,0001$), e uma correlação positiva e fraca entre MMP-8 e MPO ($r = 0,23$ e $p = 0,04$).

Tabela 1: Correlações entre diferentes marcadores inflamatórios encontrados na saliva total estimulada.

		Saliva total estimulada								
		Atividade Gelatinolítica (Unidades Arbitrárias)				MMP-9 (ng/ml)	MMP-8 (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	TIMP-2 (ng/ml)	MPO (PMN/ μ l)
		92 kDa	130 kDa	Soma (130+92 kDa)	180 kDa					
					Atividade gelatinolítica total					
Saliva total estimulada	Atividade Gelatinolítica (Unidades Arbitrárias)									
	92 kDa		$r = 0,8754$ $p < 0,0001$	$r = 0,7538$ $p < 0,0001$	$r = 0,9884$ $p < 0,0001$	$r = 0,9809$ $p < 0,0001$	--	--	--	--
	130 kDa			$r = 0,7646$ $p < 0,0001$	$r = 0,7498^*$ $p < 0,0001$	$r = 0,9244$ $p < 0,0001$	--	--	--	--
	Soma (130+92 kDa)				$r = 0,7728$ $p < 0,0001$	$r = 0,8320$ $p < 0,0001$	--	--	--	--
	180 kDa					$r = 0,9919$ $p < 0,0001$	--	--	--	--
	Atividade gelatinolítica total						--	--	--	--
	MMP-9 (ng/ml)						--	--	--	$r = 0,2734$ $p = 0,0161$
	MMP-8 (ng/ml)							--	$r = 0,4210$ $p < 0,0001$	$r = 0,2283$ $p = 0,0379$
	TIMP-1 (ng/ml)								--	--
	TIMP-2 (ng/ml)									$r = 0,4516$ $p < 0,0001$
	MPO (PMN/ μ l)									

Correlações cujo valor de $p > 0,05$ foram omitidas (--). * Correlação de Pearson.

5.2. Resultados de plasma

5.2.1. Resultados de zimografia

Um gel representativo da zimografia de plasma pode ser visualizado na figura 14.

Figura 14: Zimograma representativo de plasma. As formas da MMP-9 e suas massas moleculares assim como a MMP-2 de 72 kDa estão representadas na figura. DA: paciente com doença periodontal antes do tratamento não cirúrgico; DT: paciente com doença periodontal após o tratamento, CA: paciente controle no início do estudo; CT: paciente controle após 3 meses. PI: soro fetal bovino.

No passado, foram descritos os resultados de MMP-9 no plasma analisados apenas pelo método de ELISA (Marcaccini, Novaes et al. 2009). Com amostras de plasma remanescentes daquele estudo, foram feitos os zimogramas e a atividade gelatinolítica das formas de 92 e 102 kDa da MMP-9 foram quantificadas.

Os resultados mostrados na figura 15 revelam que a forma de 92 kDa da MMP-9 apresenta valores mais altos nos pacientes com DP no início do estudo (DA: $0,96 \pm 0,81$) quando comparados ao período após o tratamento (DT: $0,67 \pm 0,70$) ($p = 0,05$). Não houve diferença entre os grupos DA e CA ($1,08 \pm 0,84$) ($p = 0,64$). No grupo controle, também foi verificada uma diminuição dos valores desta forma da

MMP-9, entretanto a diferença não atingiu significância estatística (CA *versus* CT) (CT: $0,81 \pm 0,65$) ($p = 0,87$).

Figura 15: Atividade gelatinolítica da MMP-9 de massa molecular de 92 kDa em amostras de plasma. Menor atividade gelatinolítica foi detectada no grupo com DP após o tratamento em relação ao *baseline*. DA: pacientes com doença periodontal antes do tratamento não cirúrgico; DT: pacientes com doença periodontal após o tratamento, CA: pacientes controles no início do estudo; CT: pacientes controles após 3 meses. As barras indicam as médias. * $p < 0,05$.

Na figura 16, os resultados mostram que a forma de 102 kDa da MMP-9 apresenta valores mais baixos no grupo DT ($0,39 \pm 0,46$) e no grupo CT ($0,46 \pm 0,50$) quando comparados ao período anterior ao tratamento (DA: $0,42 \pm 0,38$) e (CA: $0,54 \pm 0,52$). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa nas três comparações realizadas: DA *versus* CA ($p = 0,34$), DA *versus* DT ($p = 0,42$), e CA *versus* CT ($p = 0,78$).

Figura 16: Atividade gelatinolítica da MMP-9 de massa molecular de 102 kDa em amostras de plasma. Não houve diferença na atividade gelatinolítica entre os diferentes grupos. DA: pacientes com doença periodontal antes do tratamento não cirúrgico; DT: pacientes com doença periodontal após o tratamento, CA: pacientes controles no início do estudo; CT: pacientes controles após 3 meses. As barras indicam as médias.

Foi realizada a soma da atividade gelatinolítica das formas de 102 e 92 kDa da MMP-9 (Figura 17). Valores mais altos são verificados no grupo DA ($1,38 \pm 1,16$) e no grupo CA ($1,62 \pm 1,24$) em relação aos respectivos controles (DT: $1,06 \pm 1,14$ e CT: $1,28 \pm 1,14$). Não houve diferença entre os grupos DA e CA ($p = 0,52$) ou quando foram comparados os diferentes grupos antes e após o tratamento (DA *versus* DT, $p = 0,10$) (CA *versus* CT, $p = 0,83$).

Figura 17: Soma da atividade gelatinolítica das formas da MMP-9 em amostras de plasma. Não houve diferença na atividade gelatinolítica entre os diferentes grupos. DA: pacientes com doença periodontal antes do tratamento não cirúrgico; DT: pacientes com doença periodontal após o tratamento, CA: pacientes controles no início do estudo; CT: pacientes controles após 3 meses. As barras indicam as médias.

5.2.2. Quantificações por ELISA

As características e aspectos clínicos dos pacientes, assim como os resultados de ELISA de MMP-8, MMP-9 de plasma e a comparação entre os grupos foram previamente publicados em (Marcaccini, Novaes et al. 2009). Esses dados serão utilizados apenas para fazer a correlação com os dados inéditos apresentados nesta dissertação.

5.2.3. Determinação da atividade de MPO

Com os dados obtidos no ensaio de atividade de MPO no plasma (Figura 18), foram observados valores de médias muito próximos – DA: $38,17 \pm 14,88$, DT: $35,56 \pm 10,41$, CA: $34,36 \pm 12,12$ e CT: $31,90 \pm 8,53$. Nenhuma diferença estatística foi encontrada comparando-se os pacientes com DP antes e após o tratamento periodontal não cirúrgico ($p = 0,94$), ou com o grupo controle no *baseline* ($p = 0,37$). Além disso, os resultados da atividade de MPO no grupo controle não apresentaram diferença entre o início do estudo e após 3 meses ($p = 0,33$).

Figura 18: Atividade de MPO em amostras de plasma. Não houve diferença na atividade enzimática entre os diferentes grupos. DA: pacientes com doença periodontal antes do tratamento não cirúrgico; DT: pacientes com doença periodontal após o tratamento, CA: pacientes controles no início do estudo; CT: pacientes controles após 3 meses. As barras indicam as médias.

5.3. Resultados de STE *versus* plasma

5.3.1. Análise de correlação

Foram realizadas análises de correlação a fim de verificar a existência de correlação entre os marcadores da STE e do plasma.

As comparações mostradas na tabela 2 foram feitas pela correlação de Pearson, quando cuja distribuição de dados era gaussiana, ou pela correlação de Spearman, quando este requisito não foi cumprido. As análises não apresentaram significância estatística ($p > 0,05$) foram omitidas.

Foram encontradas correlações moderadas e estatisticamente significantes entre a MMP-9 quantificada por ELISA no plasma e todos os parâmetros resultantes da zimografia de STE, isto é, MMP-9 de massa molecular de 92 kDa ($r = 0,37$, $p = 0,0017$), 130 kDa ($r = 0,35$, $p = 0,0027$), a soma da sua atividade gelatinolítica (130 + 92 kDa) ($r = 0,43$, $p = 0,0002$), gelatinase de 180 kDa ($r = 0,35$, $p = 0,0033$), e soma da atividade gelatinolítica total (180+130+92 kDa) ($r = 0,37$, $p = 0,0017$).

A MMP-8 plasmática apresentou correlação positiva com a atividade gelatinolítica das formas de massa molecular de 92 kDa ($r = 0,30$ e $p = 0,01$) e soma da atividade gelatinolítica (130 + 92 kDa) ($r = 0,24$ e $p = 0,04$) presentes na STE. Foi possível observar uma correlação fraca entre a atividade gelatinolítica da MMP-9 de 92 kDa do plasma e a atividade gelatinolítica da banda de 180 kDa ($r = 0,26$ e $p = 0,03$), e uma correlação moderada entre o TIMP-2 do plasma e o TIMP-2 da STE ($r = 0,32$ e $p = 0,04$).

5.4. Dosagem de proteínas

O método de Bradford foi utilizado para determinar a quantidade de proteína presente na STE (Figura 19). A análise estatística revelou que não existe diferença entre os grupos DA ($0,53 \pm 0,04$) e CA ($0,50 \pm 0,05$) ($p = 0,15$). As médias dos grupos DT ($0,50 \pm 0,05$) e CT ($0,45 \pm 0,07$) quando comparadas com seu *baseline* não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p = 0,38$ e $p = 0,58$, respectivamente). Portanto, a DP não altera a quantidade de proteína presente na saliva.

Figura 19: Concentração de proteínas em amostras de STE. A dosagem foi realizada pelo método de Bradford. Não houve diferença na concentração de proteína entre os diferentes grupos. DA: pacientes com doença periodontal antes do tratamento não cirúrgico; DT: pacientes com doença periodontal após o tratamento, CA: pacientes controles no início do estudo; CT: pacientes controles após 3 meses. As barras indicam as médias.

Tabela 2: Correlações entre diferentes marcadores inflamatórios encontrados na saliva total estimulada e plasma.

		Saliva total estimulada								
		Atividade Gelatinolítica (Unidades Arbitrárias)				MMP-9 (ng/ml)	MMP-8 (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	TIMP-2 (ng/ml)	MPO (PMN/ μ l)
		92 kDa	130 kDa	Soma (130+92 kDa)	180 kDa					
Plasma	Atividade Gelatinolítica (Unidades Arbitrárias)	102 kDa	--	--	--	--	--	--	--	--
		92 kDa	--	--	$r = 0,2585$ $p = 0,0307$	--	--	--	--	--
		Soma (102+92 kDa)	--	--	--	--	--	--	--	--
		MMP-9 (ng/ml)	$r = 0,3689$ $p = 0,0017$	$r = 0,3532$ $p = 0,0027$	$r = 0,4304$ $p = 0,0002$	$r = 0,3470$ $p = 0,0033$	$r = 0,3680$ $p = 0,0017$	--	--	--
		MMP-8 (ng/ml)	$r = 0,2979$ $p = 0,0123$	--	$r = 0,2420$ * $p = 0,0436$	--	--	--	--	--
		TIMP-1 (ng/ml)	--	--	--	--	--	--	--	--
		TIMP-2 (ng/ml)	--	--	--	--	--	--	$r = 0,3242$ $p = 0,0038$	--
		MPO (PMN/ μ l)	--	--	--	--	--	--	--	--

Correlações cujo valor de $p > 0,05$ foram omitidas (--). * Correlação de Pearson.

5.4.1. Normalização pela quantidade de proteína

A secreção salivar é dependente da estimulação autonômica e hidratação do indivíduo, assim, o volume desse fluido pode variar muito mais facilmente que o volume do plasma. Por isso, este trabalho se propôs a analisar se os níveis dos marcadores seriam melhores representados através de sua normalização pela quantidade total de proteína na amostra.

Os dados de atividade gelatinolítica, MMP-8, MMP-9, MPO, TIMP-1, TIMP-2, e foram divididos pela quantidade de proteína presente na amostra em questão. Os resultados podem ser visto nas Figuras 20 e 21 respectivamente.

A figura 20 apresenta os resultados da atividade gelatinolítica da MMP-9 de massa molecular de (a) 92 kDa, (b) 130 kDa e (c) sua respectiva soma, (d) atividade da gelatinase de 180 kDa, e (e) soma da atividade gelatinolítica total. Em (a), (c), (d) e (e), foi verificados valores mais altos nos pacientes com DP no início do estudo quando comparados ao período após o tratamento (médias e desvios padrão não foram apresentados), sendo que houve diferença estatisticamente significantes entre eles [(a) $p = 0,049$, (c) $p = 0,048$, (d) $p = 0,038$, (e) $p = 0,042$]. Quando comparados os grupos DA *versus* CA, e CA *versus* CT, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada.

Figura 20: Atividade gelatinolítica total em amostras de STE normalizada pela quantidade de proteína presente na amostra. Valores de atividade gelatinolítica da MMP-9 de massa molecular de (a) 92 kDa, (b) 130 kDa e (c) sua respectiva soma, (d) atividade da gelatinase de 180 kDa, e (e) soma da atividade gelatinolítica total. Menor atividade gelatinolítica foi detectada no grupo com DP após o tratamento em relação ao *baseline* em (a), (c), (d) e (e). DA: pacientes com doença periodontal antes do tratamento não cirúrgico; DT: pacientes com doença periodontal após o tratamento, CA: pacientes controles no início do estudo; CT: pacientes controles após 3 meses. As barras indicam as médias.

* $p < 0,05$.

Na figura 21, estão apresentados os resultados dos ensaios de ELISA e atividade de MPO.

Em (a), a distribuição dos valores de concentração do grupo DT da MMP-9 não obedeceram uma distribuição gaussiana, então, para comparar os grupos DA e DT foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon, que é recomendado para amostras pareadas, uma vez que uma exigência para a utilização o teste *t* é a distribuição normal dos dados. O teste de Wilcoxon forneceu a informação de que existe diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos citados acima ($p = 0,04$), mostrando que a quantidade de MMP-9 na saliva em paciente com DP após o tratamento diminui. Nenhuma outra diferença entre os grupos foi observada.

As análises estatísticas dos dados de (b) MMP-8 não encontraram nenhuma diferença significativa entre os grupos ou entre o *baseline* e o tratamento ($p > 0,05$). As mesmas observações podem ser feitas para o (c) TIMP-1 e a (e) MPO. Nos resultados de (d) TIMP-2, foram encontrados valores com distribuição não-normal no grupo controle (CA e CT). Devido a isto, foi utilizado um teste não paramétrico, desta vez o teste de Mann-Whitney, que compara duas variáveis independentes não pareadas. Não foi observada diferença entre as médias dessa comparação ($p = 0,62$), mas foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos DA e CA ($p = 0,017$), isto é, a concentração deste inibidor de proteinases esta aumentado em indivíduos com DP. Nenhuma outra diferença entre os grupos foi observada.

Figura 21: Níveis plasmáticos dos marcadores inflamatórios normalizados pela quantidade de proteína presente na amostra de STE. (a) MMP-9: menor concentração dessa proteinase foi encontrada nos pacientes com DP após o tratamento ($p < 0,05$); (b) MMP-8 e (c) TIMP-1: não houve diferença entre as médias dos grupos ($p > 0,05$); (d) TIMP-2: a DP aumentou a concentração desse inibidor em relação ao controle ($p < 0,02$); (e) MPO: não ocorreu alteração na atividade dessa enzima dentro dos parâmetros de análise ($p > 0,05$). DA: pacientes com doença periodontal antes do tratamento não cirúrgico; DT: pacientes com doença periodontal após o tratamento, CA: pacientes controles no início do estudo; CT: pacientes controles após 3 meses. As barras indicam as médias.

5.4.2. Análise de correlação

Foram correlacionados os marcadores inflamatórios presentes na STE. As comparações presentes na tabela 3 foram realizadas pela correlação de Pearson, se a distribuição dos dados era gaussiana, ou pela correlação de Spearman, caso esse requisito não fosse cumprido. As correlações cujo valor de p foi $>$ do que 0,05 não foram apresentadas.

Os resultados da tabela 3 mostram que existem fortes correlações entre a atividade gelatinolítica das diferentes gelatinases encontradas na zimografia de STE. As formas de 92 kDa, 130 kDa, sua respectiva soma (130+92 kDa), a gelatinase de 180 kDa e a soma da atividade gelatinolítica total, se correlacionam fortemente entre si, cujo coeficiente de correlação (r) varia de 0,64 a 0,99. Além disso, essas correlações possuem altíssima significância estatística ($p < 0,0001$).

É possível observar uma correlação positiva e fraca entre a MMP-8 e a atividade da MPO ($r = 0,24$ e $p = 0,04$), assim como a correlação positiva moderada entre a MMP-8 e o TIMP-2 ($r = 0,34$ e $p = 0,003$). Ainda, foi encontradas correlações entre os resultados de TIMP-2 com a atividade da MPO de forma moderada ($r = 0,41$ e $p = 0,0002$).

Foram realizadas análises de correlação a fim de verificar a existência de correlação entre os marcadores do plasma da STE normalizada pela quantidade de proteína (tabela 4). Todas as comparações mostradas na tabela 4 foram feitas pela correlação de Spearman, uma vez os grupos comparados pela correlação de Pearson, ou seja, cuja distribuição de dados era gaussiana, não apresentaram significância estatística e por isso foram omitidas.

Tabela 3: Correlações entre diferentes marcadores inflamatórios encontrados na saliva total estimulada, cujo valores foram normalizados pela quantidade de proteína.

		Saliva total estimulada										
		Atividade Gelatinolítica (Unidades Arbitrárias)					MMP-9 (ng/mg proteína)	MMP-8 (ng/mg proteína)	TIMP-1 (ng/mg proteína)	TIMP-2 (ng/mg proteína)	MPO (PMN/mg proteína)	
		92 kDa	130 kDa	Soma (130+92 kDa)	180 kDa	Atividade gelatinolítica total						
Saliva total estimulada	Atividade Gelatinolítica (Unidades Arbitrárias)	92 kDa		r = 0,6386* p < 0,0001	r = 0,7680* p < 0,0001	r = 0,9788* p < 0,0001	r = 0,9673* p < 0,0001	--	--	--	--	--
		130 kDa			r = 0,6650* p < 0,0001	r = 0,7826* p < 0,0001	r = 0,7845* p < 0,0001	--	--	--	--	--
		Soma (130+92 kDa)				r = 0,7975* p < 0,0001	r = 0,8710* p < 0,0001	--	--	--	--	--
		180 kDa					r = 0,9910* p < 0,0001	--	--	--	--	--
		Atividade gelatinolítica total						--	--	--	--	--
		MMP-9 (ng/mg proteína)							--	--	--	--
		MMP-8 (ng/mg proteína)							--	r = 0,3388 p=0,0028	r = 0,2374 p = 0,0403	
		TIMP-1 (ng/mg proteína)								--	--	
		TIMP-2 (ng/mg proteína)										r = 0,4114 p = 0,0002
		MPO (PMN/mg proteína)										

Correlações cujo valor de $p > 0,05$ foram omitidas (--). * Correlação de Pearson.

Podem ser observadas correlações positivas e estatisticamente significantes entre a MMP-9 plasmática quantificada por ELISA e todos os parâmetros resultantes da zimografia de STE, isto é, MMP-9 de massa molecular de 92, 130 kDa e a soma da sua atividade gelatinolítica, gelatinase de 180 kDa, e soma da atividade gelatinolítica total. Os valores de correlação (r) destas comparações variam 0,26 a 0,36, e a significância estatística (p) foi menor que 0,03 em todos os casos.

A MMP-9 de massa molecular de 92 kDa do plasma apresentou correlação positiva e fraca com a atividade gelatinolítica da banda de 180 kDa da STE ($r = 0,27$ e $p = 0,023$). A soma da atividade gelatinolítica do plasma (102+92 kDa) correlacionou-se positivamente de maneira fraca com a gelatinase de 180 kDa da STE ($r = 0,24$ e $p = 0,04$). Ainda, a MMP-9 de 102 kDa apresentou correlação negativa e fraca com o TIMP-1 encontrado na STE ($r = - 0,27$ e $p = 0,02$); o TIMP-2 plasmático apresentou correlação moderada com a MMP-9 quantificada por ELISA na STE ($r = 0,30$ e $p = 0,01$); e o TIMP-2 do plasma se correlacionou fortemente com o TIMP-2 na STE ($r = 0,45$ e $p < 0,001$).

Tabela 4: Correlações entre diferentes marcadores inflamatórios encontrados na saliva total estimulada e plasma, cujo valores foram normalizados pela quantidade de proteína.

		Saliva total estimulada									
		Atividade Gelatinolítica (Unidades Arbitrárias)				Atividade gelatinolítica total	MMP-9 (ng/mg proteína)	MMP-8 (ng/mg proteína)	TIMP-1 (ng/mg proteína)	TIMP-2 (ng/mg proteína)	MPO (PMN/mg proteína)
		92 kDa	130 kDa	Soma (130+92 kDa)	180 kDa						
Plasma	Atividade Gelatinolítica (Unidades Arbitrárias)	102 kDa	--	--	--	--	--	--	r = - 0,2744 p = 0,0235	--	--
	92 kDa	--	--	--	r = 0,2700 p = 0,0228	--	--	--	--	--	
	Soma (102+92 kDa)	--	--	--	r = 0,244 p = 0,0400	--	--	--	--	--	
	MMP-9 (ng/mg proteína)	r = 0,2803 p = 0,0179	r = 0,2625 p = 0,0270	r = 0,3595 p = 0,0021	r = 0,2725 p = 0,0215	r = 0,2842 p = 0,0163	--	--	--	--	
	MMP-8 (ng/mg proteína)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
	TIMP-1 (ng/mg proteína)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
	TIMP-2 (ng/mg proteína)	--	--	--	--	--	r = 0,3015 p = 0,0125	--	--	r = 0,4471 p < 0,0001	--
	MPO (PMN/mg proteína)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Correlações cujo valor de $p > 0,05$ foram omitidas (--).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1. Considerações gerais

Este é um estudo exploratório que visou relacionar os níveis de possíveis marcadores inflamatórios no plasma e na saliva em pacientes com DP. Os trabalhos anteriores sobre este assunto relacionaram esses marcadores nos dois fluidos com acidente vascular cerebral (Buduneli, Mantyla et al. 2010) ou verificaram a influência do tratamento periodontal básico somado ao uso de doxyciclina (Gorska and Nedzi-Gora 2006). O presente estudo é o primeiro realizar estas comparações entre pacientes com DP antes e após um tratamento periodontal não cirúrgico, e também comparar pacientes com DP com voluntários controles saudáveis em dois momentos distintos (*baseline* e após 3 meses).

A degradação da ECM é fundamental para o remodelamento do tecido periodontal inflamado e progressão da DP, por isso a contribuição de várias MMPs foi relatada em diversos estudos experimentais.

O desequilíbrio entre os níveis de MMPs e TIMPs é responsável atividade proteolítica excessiva encontrada na DP, que resulta na perda do tecido de sustentação do dente: cemento, ligamento e osso alveolar (Uitto, Suomalainen et al. 1990). Assim, existe um crescente número de trabalhos demonstrando o aumento das MMPs na saliva de pacientes com DP.

Devido aos rigorosos fatores de inclusão e exclusão da escolha dos voluntários, um número muito baixo de controles foi conseguido no *baseline* (CA), e este número diminuiu após 3 meses (CT), devido a desistência desses indivíduos (devido a dificuldade de trazer pacientes sem doença para revisão a cada 15 dias).

Isso pode ter prejudicado os resultados e consequentes conclusões do estudo, pois um baixo número amostral juntamente com o alto desvio padrão dos resultados são fatores que diminuem a chance de encontrar diferenças estatisticamente significantes (erro tipo 2 de estatística). Devido a este pequeno número amostral nos CT ($n = 11$), se optou por utilizar o *teste t* não pareado, uma vez que o pareamento dos resultados não estava sendo efetivo, segundo o programa estatístico utilizado.

6.2. STE

Neste estudo, foi avaliada a hipótese de haver aumento da atividade gelatinolítica, particularmente das formas da MMP-9, na STE de pacientes com DP, e observar se existe uma diminuição desses níveis após o tratamento periodontal.

A diminuição da atividade da forma de 92 kDa da MMP-9 pode estar relacionada a diminuição da inflamação local representada pela melhora dos parâmetros clínicos, previamente apresentados em (Marcaccini, Novaes et al. 2009). A redução da placa bacteriana em decorrência da raspagem pode levar a menor liberação de citocinas pró-inflamatórias (Miller, Foley et al. 2010), diminuição no recrutamento de leucócitos e diminuição na liberação de MMPs pelos leucócitos e também pelas células residentes do periodonto. Deste modo, a atenuação da degradação do tecido conjuntivo após o tratamento da DP pode estar relacionada com a diminuição da atividade da forma de 92 kDa da MMP-9.

Além disso, pode-se observar que a intensidade da atividade gelatinolítica da banda correspondente a forma de 92 kDa da MMP-9 é muito maior que a forma de 130 kDa no grupo DA (médias: 2,68 e 0,68 respectivamente). Possivelmente, a forma de 92 kDa tenha maior importância no processo de degradação tecidual

presente na doença periodontal crônica que a MMP-9 ligada a lipocalina, podendo inclusive ter origens celulares distintas.

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na atividade da forma de 130 kDa da MMP-9 antes e após o tratamento, entretanto, é possível verificar que existiu uma tendência a esta diferença ($p= 0,07$). Uma possível explicação seria que no período de 3 meses pode não ter havido resolução completa (para perfeita saúde periodontal) em todos os sítios periodontalmente comprometidos, o que ainda explicaria a migração de número maior de PMN para a saliva. Esta explicação encontra subsídio nos resultados de níveis de MPO, que não são diferentes nos doentes antes e após o tratamento, mas são mais altos nos doentes do que nos controles.

A diminuição da atividade da MMP-9 (soma 130+92 kDa) provavelmente se deve aos valores da forma de 92 kDa que forneceram “força estatística” para a análise. A interpretação deste dado é que a atividade da MMP-9, de modo geral, diminui na STE após o tratamento.

A atividade da gelatinase de 180 kDa diminui após o tratamento periodontol não cirúrgico. Os mecanismos desse fenômeno provavelmente são os mesmos descritos para a forma de 92 kDa. Entretanto, este achado pode ser considerado menos importante por dois motivos: primeiramente, a atividade gelatinolítica encontrada na zimografia é proporcional a quantidade de enzima presente na amostra, então, comparando as médias deste parâmetro no grupo DA, a forma de 92 kDa (2,48) existiria em maior quantidade que a forma de 180 kDa (0,73). Em segundo lugar, a velocidade cinética da forma dímerica da MMP-9 é cerca de 10 vezes menor que o monômero e sua estrutura é mais estável (Olson, Bernardo et al. 2000). Assim, a baixa atividade dessa espécie de MMP-9 forneceria apenas uma

manutenção pequena, lenta e sustentada da proteólise *in vivo* (Marcaccini, Meschiari *et al.* 2010).

A soma da atividade gelatinolítica total (180+130+92 kDa) dos pacientes com DP possui média superior aos seus controles no início do tratamento, além disso, ocorre a diminuição desse parâmetro após tratamento da DP, provavelmente, pelos mesmos motivos discutidos até o momento. É sugerido neste estudo que a soma da atividade gelatinolítica seja um melhor marcador do que cada forma das gelatinases analisadas separadamente, pois a análise estatística dos resultados da soma (180+130+92 kDa) evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os controles (*CA versus CT*), e também o menor valor de p ($p = 0,023$) na comparação entre as médias de DA e DT.

Utilizando o método da zimografia, Makela *et al.* encontraram diminuição da atividade das gelatinases quando realizado o tratamento da DP em amostras de enxaguatórios bucais, ou seja, uma mistura que continha todos os fluidos presentes na cavidade oral, assim como a saliva total. Desta maneira, é possível afirmar que os resultados de zimografia apresentados estão de acordo com os achados na literatura pela mesma técnica (Makela, Salo *et al.* 1994).

Não há um consenso sobre as alterações nas concentrações salivares de MMP-9 em pacientes com DP. Enquanto alguns autores não encontraram diminuição da MMP-9 após o tratamento não cirúrgico (Sorsa, Ding *et al.* 1994; Gorska and Nedzi-Gora 2006), trabalhos mais recentes tem observado um aumento de MMP-9 e TIMP-1 dosados por ELISA em pacientes com DP (Isaza-Guzman, Arias-Osorio *et al.* 2011). Ainda, outros artigos mostram a diminuição da MMP-9 apenas após 12 meses o tratamento de periodontite moderada (Kinney, Morelli *et al.* 2011).

Neste estudo, não foram encontradas diferenças entre os grupos quando se analisou a MMP-9 pelo método de ELISA, entretanto, esta diferença foi encontrada na técnica de zimografia. Devido à inexatidão sobre o comportamento dos níveis dessa gelatinase na literatura até o presente momento, é sugerido que seja feita a análise da MMP-9 por duas ou mais técnicas distintas, para que resultados mais confiáveis sejam conseguidos.

Os resultados do ELISA para MMP-8 condizem com o que é encontrado na literatura. Os pacientes com DP apresentam maiores concentrações de MMP-8 na saliva em relação aos controles, e ocorre a diminuição dessa collagenase após o tratamento da doença em questão (Gorska and Nedzi-Gora 2006; Buduneli, Mantyla et al. 2010).

Em estudos com camundongos *knockout* para MMP-8, a DP produz maior perda de osso alveolar, demonstrando um provável papel também protetor dessa collagenase nesta doença. Uma possível explicação do mecanismo dado pelos autores seria atividade da proteinase sobre citocinas e quimiocinas antiinflamatórias (Kuula, Salo et al. 2009). Segundo estes autores, a destruição tecidual seria produzida pela elastase dos neutrófilos presentes na gengiva, e não pela MMP-8.

Alguns trabalhos relatam que os níveis de MMP-8 na saliva estariam altamente correlacionados com os parâmetros clínicos encontrados na DP, sendo que elevados níveis de MMP-8 aumentariam o risco de DP (Miller, King et al. 2006). A média da concentração de MMP-8 em pacientes com DP pode ser até 4 vezes maior que em pacientes saudáveis (Herr, Hatch et al. 2007).

Também tem sido mostrado que a MMP-8 analisada pela técnica de ELISA diminui após o tratamento periodontal não cirúrgico, assim como no tratamento com

doxyciclina (Sorsa, Ding et al. 1994; Gorska and Nedzi-Gora 2006; Sexton, Lin et al. 2011).

Os resultados dos ensaios de ELISA para MMP-8 neste trabalho confirmam os dados da literatura, isto é, a MMP-8 está aumentada na DP e diminui após o tratamento.

Os valores encontrados das concentrações da MMP-8 (unidades de ng/ml) foram abaixo dos observados na literatura (dezenas ou centenas de ng/ml), isso pode ser devido a metodologia utilizada para a quantificação destas moléculas, que diferentemente dos outros ensaios, não foi realizada com um kit padronizado pelo fabricante. Assim, uma baixa ligação do anticorpo de captura a microplaca ou baixo reconhecimento do antígeno pelos anticorpos podem ter gerado essa discrepância nos resultados.

Em 2010, Gursoy *et al.* descreveram níveis aumentados de MMP-8 e diminuídos de TIMP-1 em pacientes com DP em relação aos seus controles. Este trabalho ainda analisou a MMP-14 (também chamada de MT1-MMP), conhecida por ser responsável pela clivagem do sítio catalítico de várias MMPs, resultando na sua ativação, entretanto, nenhuma alteração na sua concentração foi observada no modelo experimental utilizado (Gursoy, Kononen et al. 2010).

Gorska *et al.* não encontraram alteração nos níveis de TIMP-1 em pacientes com DP após o tratamento periodontal básico, porém, quando se adicionou doxyciclina ao tratamento, foi observado um aumento na concentração deste inibidor (Gorska and Nedzi-Gora 2006).

Pacientes com DP após o tratamento periodontal não cirúrgico possuíam níveis mais altos de MMP-1, MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 que controles saudáveis e a

utilização tópica de aprotinina aumentou ainda mais os níveis destes marcadores inflamatórios na saliva (Pietruska, Pietruski et al. 2009).

De acordo com o que foi discutido acima, acredita-se que os níveis de TIMP-1 na DP possam ser: a – menores em pacientes com DP que em controles saudáveis; b – inalterados quando um paciente com DP recebe apenas tratamento periodontal não cirúrgico; c – maiores em pacientes tratados que em controles saudáveis quando se utilizar um tratamento farmacológico em conjunto.

É encontrado na literatura que citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF- α e TGF- β podem inibir a expressão do TIMP-1, e os níveis destas citocinas estão aumentadas na saliva de pacientes com DP (Pietruska, Pietruski et al. 2009; Miller, Foley et al. 2010).

No estudo aqui realizado, os níveis de TIMP-1 não tiveram diferença estatisticamente significativa quando comparados entre os grupos, e levando em conta que alguns dados da literatura não são conclusivos, entende-se que a expressão do TIMP-1 na saliva durante a DP continue incerta.

Foi encontrado apenas um trabalho a quantificação do TIMP-2 em paciente com DP, e os resultados deste já foram descritas acima (Pietruska, Pietruski et al. 2009). De acordo com os dados apresentados nesta dissertação, os níveis de TIMP-2 estão aumentados na DP e diminuem após tratamento. Interessantemente, os valores obtidos para os TIMP-1 e -2 mostram que estes 2 inibidores parecem ter comportamentos distintos, uma vez que as concentrações de TIMP-1 não se modificam com o tratamento, enquanto as de TIMP-2 diminuem com o tratamento.

Em 2003, foi descrito que *in vitro*, a MMP-14 cliva o pró-peptídeo da MMP-8 humana derivada de PMN (75 kDa), deixando-a em sua forma ativa (65 kDa). Ainda, o TIMP-2 teria a capacidade de inibir essa ativação (Holopainen, Moilanen et al.

2003). Desta maneira, o TIMP-2 poderia ser o mais importante fator para o controle da MMP-8 na saliva durante a DP, seja impedindo sua ativação, ou inibindo sua atividade. Além disso, a concentração deste inibidor esta acompanhando o comportamento da MMP-8 nas comparações pelo teste *t* e na análise de correlação, na qual se observa um valor de *r* moderado, mas altamente significativo ($r = 0,4210$ e $p < 0,0001$).

Sabendo-se que o TIMP-2 interage com todas as MMPs, exceto a MMP-9 (Vanhoutte and Heymans 2010), a relação entre eles na DP não será discutida.

O aumento da atividade da MPO na saliva já foi descrita em pacientes com DP em relação aos seus controles (Over, Yamalik et al. 1993), desta maneira, esse resultado já era esperada. Pode-se observar que existe uma tendência a diminuição da atividade da MPO após o tratamento dos pacientes com DP ($p = 0,08$), este fenômeno poderia ser justificado pelo fato do tratamento periodontal básico reconhecidamente diminuir o infiltrado de PMN na gengiva e na bolsa periodontal (Lindhe 2010), sugerindo que possa ter ocorrido um erro tipo 2 de estatística. Contribuindo com a hipótese acima, a atividade desta enzima diminuiu no GCF dos mesmos pacientes após o tratamento periodontal (Marcaccini, Meschiari et al. 2010), lembrando que o GCF é um dos componentes que forma a saliva total. Assim, a possível influência do tratamento periodontal sobre a atividade de MPO na saliva de pacientes com DP é um dado inédito.

Acredita-se que a discreta diminuição de quase todos os biomarcadores entre CA e CT seja devida a diminuição da gengivite resultante das noções de higiene e profilaxia bucal ensinadas, além da motivação do paciente aos cuidados bucais (pois todos os indivíduos foram examinados a cada 15 dias, possuindo DP ou não). A gengivite é um estado inflamatório leve e reversível (Loe 1967), caracterizada pela

ativação de MMPs latentes da gengiva e rápida degradação das fibras da gengiva (Narayanan and Page 1976).

As correlações entre a atividade gelatinolítica das formas de 92 kDa, 130 kDa, sua respectiva soma (130+92 kDa), gelatinase de 180 kDa e soma da atividade gelatinolítica total já era esperada, pois sua expressão ocorre pelo mesmo conjunto de células (PMN, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais) que estão susceptíveis a regulação por citocinas liberadas durante a DP.

A correlação da MMP-8, MMP-9 e TIMP-1 com MPO sugerem que estes três marcadores sejam liberados em quantidade considerável pelos PMNs. Informação semelhante sobre estes marcadores foi encontrada no GCF. (Marcaccini, Meschiari et al. 2010)

Alguns trabalhos realizaram a comparação entre as taxas de MMPs pelos TIMPs a fim de evidenciar diferenças entre indivíduos com DP e controles e os pacientes antes e após o tratamento, o que sugere o desequilíbrio entre a concentração das proteinases e seus inibidores nas diferentes condições analisadas. Foi descrito por Gursoy *et al.* que a taxa MMP-8/TIMP-1 na saliva esta aumentada em pacientes com DP (Gursoy, Kononen et al. 2010). Além disso, Gorska *et al.* (Gorska and Nedzi-Gora 2006) observaram a diminuição das taxas de MMP-8/TIMP-1 na saliva após o tratamento periodontal básico, e a diminuição das taxas de MMP-9/TIMP-1 na saliva após o tratamento periodontal básico somado ao uso de doxiciclina. Neste estudo foram realizadas as análises das taxas de MMP-8/TIMP-1, MMP-8/TIMP-2, MMP-9/TIMP-1, MMP-9/TIMP-2 na STE e no plasma, porém nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos, por isso, esses resultados foram omitidos.

6.3. Plasma

A zimografia de plasma não revelou qualquer diferença estatisticamente significantes na comparação das médias dos diferentes grupos. Este resultado esta em oposição ao do método de ELISA, que encontrou diminuição dos níveis de MMP-9 aumentados em DA em relação a CA e também a DT. A diferença nos resultados pode ser devida aos métodos de análises, pois cada um deles possui um conjunto distinto de interferentes. Particularmente, no método de ELISA pode haver interferência nos resultados em decorrência da elevada quantidade de TIMP-1 presente na amostra (a informação fornecida pelo fabricante do kit é que concentrações maiores do que 1,56 ng/mL de TIMP-1 podem interferir na análise; e nas determinações de amostras de plasma as concentrações de TIMP-1 estão em torno deste valor). Esta interferência ocorre porque o reconhecimento da MMP-9 ligada ao TIMP-1 é diferente daquele da MMP-9 não ligada. Da mesma maneira, pode-se supor que diversas outras proteínas presentes na própria amostra, como outros TIMPs, MMPs e α -macroglobulina, possam modificar a interação antígeno-anticorpo, alterando os resultados do ELISA.

A atividade de MPO no plasma não sofre alteração pela DP e seu tratamento, apesar disso, este resultado merece atenção, pois se trata de um dado inédito, isto é, nenhum trabalho analisou os níveis plasmáticos de MPO em modelo de DP. Nestes mesmos pacientes anteriormente foi verificado haver aumento de MMP-8 e MMP-9, que são encontradas também nos grânulos dos PMNs, assim como a MPO. A não detecção de aumento da MPO, paralelamente ao aumento de MMP-8 e -9 no plasma, sugere que a fonte de MMP-8 e -9 não sejam os PMNs, uma vez que todos os grânulos destas células são liberados ao mesmo tempo. A MPO é localizada nos grânulos primários, enquanto a MMP-8 é encontrada nos grânulos secundários e a

MMP-9 nos terciários (Kjeldsen, Bainton et al. 1994; Sengelov, Boulay et al. 1994; Betsuyaku, Nishimura et al. 1999). Neste trabalho, foram utilizados pacientes com doença periodontal moderada, que não possuem alteração na quantidade de PMN nos pacientes doentes em relação aos controles saudáveis. Estudos anteriores demonstraram que é possível detectar aumento do número de PMNs circulantes no sangue de pacientes com DP generalizada (Loos, Craandijk et al. 2000), situação em que talvez haja uma maior tendência à degranulação destes e na qual se poderia talvez encontrar aumento da MPO. Neste estudo não foi encontrada diferença na atividade de MPO no sangue dos pacientes, e acredita-se que esta informação seja útil para descartar a origem do aumento da MMP-8 e MMP-9 circulantes.

O aumento nos níveis sanguíneos de IL-6 e hs-CRP demonstrados por Marcacinni *et al.* (Marcaccini, Meschiari et al. 2009) demonstram que a DP leva ao aumento de marcadores inflamatórios sistêmicos nestes pacientes; a proteína C reativa, por exemplo, é produzida no fígado (Genest 2010). Como estes marcadores inflamatórios (IL-6 e hs-CRP) estão aumentados, é bastante razoável imaginar que também a expressão e secreção de MMP-8 e -9 poderiam estar aumentadas em outros tipos celulares, tais como macrófagos e células endoteliais.

6.4. STE versus plasma

Quando duas variáveis variam juntas, os estatísticos dizem que existe uma covariação ou correlação entre elas. A correlação quantifica o grau em que duas variáveis estão correlacionadas. O cálculo do coeficiente de correlação (r) informa o quanto uma variável tende a alterar a outra quando uma delas sofre uma mudança. O valor do nível de significância (p) indica a probabilidade de a correlação

encontrada entre os dados não ser real, ou seja, ser apenas um produto do acaso durante a correlação de uma amostragem aleatória.

As análises de correlação não expressam relação de causa e efeito entre as variáveis, apenas quantificam o quanto duas variáveis estão relacionadas uma com a outra.

Até o presente momento, as análises de correlação entre os marcadores descritos acima encontrados na saliva e no plasma não haviam sido realizadas sendo, portanto, inéditas na literatura.

A atividade gelatinolítica observada na zimografia de plasma não possui correlação com a zimografia de STE, sugerindo não haver uma migração dessas proteinases de um fluido para o outro, por exemplo, via o sangramento das áreas com DP. As diferentes massas moleculares, assim como, as características distintas das bandas visualizadas no gel reforçam essa hipótese. Por exemplo, no plasma se encontra a forma da MMP-9 de 102 kDa, entretanto, ela não é observada na STE, assim como as bandas de 130 kDa e 180 kDa verificadas na STE estão ausentes no plasma, o que sugere que tipos celulares diferentes estejam realizando a expressão e secreção destas gelatinases encontradas no plasma e na saliva. Outro exemplo para esta hipótese é a característica da banda de 92 kDa encontrada na STE que possui um aspecto mais difuso do que a encontrada no plasma, sugerindo que haja um sutil processo de glicosilação nesta forma da MMP-9 encontrada na saliva.

Entretanto, existem correlações entre a MMP-9 do plasma e a atividade das formas da MMP-9 na STE. Uma possível explicação para este fenômeno seria a ação dos sinalizadores inflamatórios aumentados sistemicamente pela DP (Marcaccini, Meschiari et al. 2009), tais como as citocinas, que agiriam de maneira

semelhante nas células destes dois compartimentos aparentemente distintos, promovendo o aumento da expressão de MMP-9 nos dois compartimentos.

A MMP-8 do plasma está correlacionada com as bandas de MMP-9 de 92 e a soma da atividade gelatinolítica (130 + 92 kDa) da STE sugerindo que esses marcadores inflamatórios possuem o mesmo perfil na duração deste estudo, isto é, estão aumentados de maneira semelhante em pacientes com DP e diminuem após o tratamento não cirúrgico. Os mecanismos moleculares envolvidos nesta hipótese provavelmente são os mesmos descritos no parágrafo anterior. Desta maneira, também se correlaciona a MMP-9 de 92 kDa do plasma com a gelatinase de 180 kDa da STE.

A correlação entre o TIMP-2 do plasma com o TIMP-2 da STE pode ser devida ao pequeno tamanho desta proteína que possibilita sua difusão a partir do leito vascular que irrigam a região bucal ou pelos capilares inflamados dos sítios periodontais, assim como pelo sangramento destes tecidos lesionados. A concentração média do TIMP-2 do plasma (518,6 ng/ml) é aproximadamente dez vezes a concentração na STE (42,7 ng/ml), logo, existe sustentação da hipótese sugerida acima.

No estudo de Marcaccini *et al.* (Marcaccini, Novaes et al. 2009), o TIMP-2 apresentou a mesma tendência (em valores absolutos) de aumento no grupo DA e diminuição no grupo DT. Entretanto, naquele estudo, embora tenha sido mencionado não haver diferença estatisticamente significativa, na verdade a diferença existe se critérios menos restritos forem utilizados, pois o valor de p foi = 0,053. Assim, novas análises de TIMP-2 no plasma deveriam ser feitas em um número maior de indivíduos para confirmar estes achados.

As correlações encontradas foram de fraca a moderadas, e como se trata de um estudo exploratório, com um número amostral pequeno, e utilização de muitas variáveis, não foram realizados correções (*post hoc*) tais como o teste de Bonferroni, pois, ao se aceitar um valor de significância estatística muito mais restritivo, praticamente nenhuma correlação seria aceita como significativa.

Acredita-se que este estudo possa ser importante para guiar trabalhos futuros nesta importante área de pesquisa, no sentido de calcular o número amostral adequado e identificar quais são os marcadores mais promissores.

6.5. Dosagem de proteína

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nas concentrações de proteína determinadas na saliva dos grupos analisados, o que sugere que as secreções serosas, hidratação do indivíduo, presença de sangue, esfolhamento de células, ou o conjunto desses fatores não altera este parâmetro.

A normalização pela quantidade de proteína impediu que algumas diferenças estatisticamente significantes fossem encontradas em comparação com a análise feita utilizando-se o volume total de STE para expressar os resultados. Desta maneira, a partir dos dados comparativos deste trabalho, pode-se dizer que não há razão científica para recomendar a determinação de proteínas na saliva e o uso de concentração de proteínas neste fluido para expressar resultados. Segundo levantamento na literatura, não foram encontrados outros trabalhos que realizaram esta comparação entre resultados de marcadores na saliva expressos por volume e por dosagem de proteínas. A grande maioria dos estudos expressa os resultados por volume de saliva. Há apenas um outro trabalho que faz a comparação entre

resultados de ELISA na saliva dividindo esses valores pelo número de dentes ou número de dentes sob a dosagem de proteínas. Estes autores chegam à conclusão que o uso da correção por número de dentes/dosagem de proteínas é superior à correção por número de dentes somente (Furuholm, Sorsa et al. 2006).

Curiosamente, a única diferença que nos parece digna de nota vista na expressão dos resultados por dosagem de proteínas está na comparação DA *versus* DT no ELISA de MMP-9, que não foi estatisticamente significativa na análise feita por volume. Como não foi observada diferença por *teste t* na comparação da dosagem de proteínas entre estes grupos, não se sabe qual seria a explicação para este resultado.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Os pacientes com DP possuem níveis salivares diminuídos de MMP-8, TIMP-2 e atividade gelatinolítica após o tratamento periodontal não cirúrgico, e estes dados reforçam achados prévios sobre esses marcadores inflamatórios.

A atividade de MPO na STE e no plasma durante a DP e após o tratamento periodontal não cirúrgico são descrições inéditas e revelam que esta enzima apresenta maior atividade apenas na STE de pacientes doentes.

A concentração salivar de proteínas não se altera com a DP e seu o tratamento. A normalização de marcadores inflamatórios da STE pela quantidade protéica desse fluido não foi considerada adequada.

Existem correlações entre alguns marcadores inflamatórios da STE e no plasma, tais como: a banda de MMP-9 de 92kDa e soma da atividade gelatinolítica (130 + 92 kDa) da STE e a MMP-8 do plasma; a gelatinase de 180 kDa da STE e a banda da MMP-9 de 92kDa do plasma, a atividade gelatinolítica da STE e a MMP-9 do plasma, e também o TIMP-2 da STE com o TIMP-2 do plasma

A avaliação conjunta destes resultados sugere que existe uma atenuação de alguns dos marcadores inflamatórios analisados na STE e no plasma após o tratamento da DP, e que os níveis salivares e plasmáticos de alguns destes marcadores se correlacionam. Como a coleta de saliva é menos invasiva, mais estudos sobre a correlação destes marcadores nestes dois fluidos pode ser muito interessante.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

- Abbas, A. K. and A. H. Lichtman (2004). Basic Immunology: Functions e Disorders of the Immune System. Philadelphia, Elsevier Inc.
- Aimes, R. T. and J. P. Quigley (1995). "Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments." J Biol Chem **270**(11): 5872-5876.
- Ali, M. A., W. J. Cho, et al. (2010). "Titin is a Target of Matrix Metalloproteinase-2: Implications in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury." Circulation **122**(20): 2039-2047.
- Azzam, H. S., G. Arand, et al. (1993). "Association of MMP-2 activation potential with metastatic progression in human breast cancer cell lines independent of MMP-2 production." J Natl Cancer Inst **85**(21): 1758-1764.
- Back, M., D. F. Ketelhuth, et al. (2010). "Matrix metalloproteinases in atherothrombosis." Prog Cardiovasc Dis **52**(5): 410-428.
- Betsuyaku, T., M. Nishimura, et al. (1999). "Neutrophil granule proteins in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema." Am J Respir Crit Care Med **159**(6): 1985-1991.
- Birkedal-Hansen, H. (1993). "Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases." J Periodontol **64**(5 Suppl): 474-484.
- Buduneli, E., P. Mantyla, et al. (2010). "Acute Myocardial Infarction is Reflected in Salivary Matrix Metalloproteinase-8 Activation Level." J Periodontol.
- Castro, M. M., E. Rizzi, et al. (2009). "Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling." Matrix Biol **29**(3): 194-201.
- Cauwe, B. and G. Opdenakker (2010). "Intracellular substrate cleavage: a novel dimension in the biochemistry, biology and pathology of matrix metalloproteinases." Crit Rev Biochem Mol Biol **45**(5): 351-423.

- Chow, A. K., J. Cena, et al. (2007). "Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature." Br J Pharmacol **152**(2): 189-205.
- Demmer, R. T. and M. Desvarieux (2006). "Periodontal infections and cardiovascular disease: the heart of the matter." J Am Dent Assoc **137 Suppl**: 14S-20S; quiz 38S.
- Emekli-Alturfan, E., I. Basar, et al. (2011). "Plasma Tissue Factor Levels and Salivary Tissue Factor Activities of Periodontitis Patients with and without Cardiovascular Disease." Pathophysiol Haemost Thromb.
- Farnaud, S. J., O. Kostic, et al. (2010). "Saliva: physiology and diagnostic potential in health and disease." ScientificWorldJournal **10**: 434-456.
- Fernandez-Patron, C., M. W. Radomski, et al. (1999). "Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor." Circ Res **85**(10): 906-911.
- Furuholm, J., T. Sorsa, et al. (2006). "Salivary matrix metalloproteinase-8 in patients with and without coronary heart disease may indicate an increased susceptibility to periodontal disease." J Periodontal Res **41**(5): 486-489.
- Gao, C. Q., G. Sawicki, et al. (2003). "Matrix metalloproteinase-2 mediates cytokine-induced myocardial contractile dysfunction." Cardiovasc Res **57**(2): 426-433.
- Genest, J. (2010). "C-reactive protein: risk factor, biomarker and/or therapeutic target?" Can J Cardiol **26 Suppl A**: 41A-44A.
- Gerlach, R. F., C. Demacq, et al. (2007). "Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma." Clin Biochem **40**(1-2): 119-123.
- Gerlach, R. F., C. A. Meschiari, et al. (2009). "Positive correlations between serum and plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 or MMP-9 levels in disease conditions." Clin Chem Lab Med **47**(7): 888-891.
- Gerlach, R. F., J. A. Uzuelli, et al. (2005). "Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities." Anal Biochem **344**(1): 147-149.

- Gomes, V. A., C. S. Vieira, et al. (2011). "Imbalanced circulating matrix metalloproteinases in polycystic ovary syndrome." Mol Cell Biochem.
- Gorska, R. and M. Nedzi-Gora (2006). "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) **54**(6): 419-426.
- Greabu, M., M. Battino, et al. (2009). "Saliva--a diagnostic window to the body, both in health and in disease." J Med Life **2**(2): 124-132.
- Groblewska, M., B. Mroczko, et al. (2010). "Matrix metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 2 in the diagnosis of colorectal adenoma and cancer patients." Folia Histochem Cytobiol **48**(4): 564-571.
- Gross, J. and C. M. Lapiere (1962). "Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay." Proc Natl Acad Sci U S A **48**: 1014-1022.
- Gullberg, U., E. Andersson, et al. (1997). "Biosynthesis, processing and sorting of neutrophil proteins: insight into neutrophil granule development." Eur J Haematol **58**(3): 137-153.
- Gursoy, U. K., E. Kononen, et al. (2010). "Salivary MMP-8, TIMP-1, and ICTP as markers of advanced periodontitis." J Clin Periodontol **37**(6): 487-493.
- Guyton, A. C. and J. E. Hall (2006). Textbook of Medical Physiology. Philadelphia, Elsevier Inc.
- Haeckel, R. and P. Hanecke (1996). "Application of saliva for drug monitoring. An in vivo model for transmembrane transport." Eur J Clin Chem Clin Biochem **34**(3): 171-191.
- Herr, A. E., A. V. Hatch, et al. (2007). "Microfluidic immunoassays as rapid saliva-based clinical diagnostics." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(13): 5268-5273.
- Holopainen, J. M., J. A. Moilanen, et al. (2003). "Activation of matrix metalloproteinase-8 by membrane type 1-MMP and their expression in human tears after photorefractive keratectomy." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(6): 2550-2556.
- Isaza-Guzman, D. M., C. Arias-Osorio, et al. (2011). "Salivary levels of matrix metalloproteinase (MMP)-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase

- (TIMP)-1: A pilot study about the relationship with periodontal status and MMP-9(-1562C/T) gene promoter polymorphism." Arch Oral Biol **56**(4): 401-411.
- Ito, A., M. Yamada, et al. (1998). "Calmodulin antagonists increase the expression of membrane-type-1 matrix metalloproteinase in human uterine cervical fibroblasts." Eur J Biochem **251**(1-2): 353-358.
- Kandasamy, A. D., A. K. Chow, et al. (2009). "Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix." Cardiovasc Res **85**(3): 413-423.
- Kaner, D., J. P. Bernimoulin, et al. (2006). "Gingival crevicular fluid levels of calprotectin and myeloperoxidase during therapy for generalized aggressive periodontitis." J Periodontal Res **41**(2): 132-139.
- Kinney, J. S., T. Morelli, et al. (2011). "Saliva/Pathogen Biomarker Signatures and Periodontal Disease Progression." J Dent Res.
- Kjeldsen, L., D. F. Bainton, et al. (1994). "Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel matrix protein of specific granules in human neutrophils." Blood **83**(3): 799-807.
- Klimiuk, P. A., S. Sierakowski, et al. (2003). "[Serum interleukin 6 (il-6A) concentration correlates with matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in rheumatoid arthritis]." Pol Arch Med Wewn **109**(2): 119-123.
- Kuula, H., T. Salo, et al. (2009). "Local and systemic responses in matrix metalloproteinase 8-deficient mice during *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis." Infect Immun **77**(2): 850-859.
- Kwan, J. A., C. J. Schulze, et al. (2004). "Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro." FASEB J **18**(6): 690-692.
- Lawrence, H. P. (2002). "Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health." J Can Dent Assoc **68**(3): 170-174.
- Lindhe, J. (2010). Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral.

- Loe, H. (1967). "The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems." J Periodontol **38**(6): Suppl:610-616.
- Loo, J. A., W. Yan, et al. (2010). "Comparative human salivary and plasma proteomes." J Dent Res **89**(10): 1016-1023.
- Loos, B. G., J. Craandijk, et al. (2000). "Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients." J Periodontol **71**(10): 1528-1534.
- Makela, M., T. Salo, et al. (1994). "Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status." J Dent Res **73**(8): 1397-1406.
- Mannello, F., G. A. Tonti, et al. (2007). "Silicate increases the release of MMP-9 forms in peripheral blood: why gelatin zymography differs significantly in citrate plasma and serum obtained with or without clot activators." Clin Chem **53**(11): 1981-1982.
- Marcaccini, A. M., C. A. Meschiari, et al. (2009). "Circulating interleukin-6 and high-sensitivity C-reactive protein decrease after periodontal therapy in otherwise healthy subjects." J Periodontol **80**(4): 594-602.
- Marcaccini, A. M., C. A. Meschiari, et al. (2010). "Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy." J Clin Periodontol **37**(2): 180-190.
- Marcaccini, A. M., A. B. Novaes, Jr., et al. (2009). "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 **409**(1-2): 117-122.
- Martel-Pelletier, J. and J. P. Pelletier (1996). "Wanted--the collagenase responsible for the destruction of the collagen network in human cartilage!" Br J Rheumatol **35**(9): 818-820.
- McQuibban, G. A., J. H. Gong, et al. (2002). "Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo." Blood **100**(4): 1160-1167.
- Miller, C. S., J. D. Foley, et al. (2010). "Current developments in salivary diagnostics." Biomark Med **4**(1): 171-189.

- Miller, C. S., C. P. King, Jr., et al. (2006). "Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study." J Am Dent Assoc **137**(3): 322-329.
- Mohammed, F. F., D. S. Smookler, et al. (2003). "Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **62 Suppl 2**: ii43-47.
- Nagase, H., R. Visse, et al. (2006). "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs." Cardiovasc Res **69**(3): 562-573.
- Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr. (1999). "Matrix metalloproteinases." J Biol Chem **274**(31): 21491-21494.
- Narayanan, A. S. and R. C. Page (1976). "Biochemical characterization of collagens synthesized by fibroblasts derived from normal and diseased human gingiva." J Biol Chem **251**(18): 5464-5471.
- Oktay, S., I. Basar, et al. (2011). "Serum and Saliva Sialic Acid in Periodontitis Patients with and without Cardiovascular Disease." Pathophysiol Haemost Thromb.
- Olson, M. W., M. M. Bernardo, et al. (2000). "Characterization of the monomeric and dimeric forms of latent and active matrix metalloproteinase-9. Differential rates for activation by stromelysin 1." J Biol Chem **275**(4): 2661-2668.
- Over, C., N. Yamalik, et al. (1993). "Myeloperoxidase activity in peripheral blood, neutrophil crevicular fluid and whole saliva of patients with periodontal disease." J Nihon Univ Sch Dent **35**(4): 235-240.
- Overall, C. M. (2002). "Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites." Mol Biotechnol **22**(1): 51-86.
- Page-McCaw, A., A. J. Ewald, et al. (2007). "Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(3): 221-233.
- Page, R. C. (1991). "The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease." J Periodontal Res **26**(3 Pt 2): 230-242.
- Pietruska, M., J. Pietruski, et al. (2009). "Assessment of aprotinin influence on periodontal clinical status and matrix metalloproteinases 1, 2 and their tissue inhibitors saliva concentrations in patients with chronic periodontitis." Adv Med Sci **54**(2): 239-246.

- Pozo, P., M. A. Valenzuela, et al. (2005). "Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients." J Periodontal Res **40**(3): 199-207.
- Ra, H. J. and W. C. Parks (2007). "Control of matrix metalloproteinase catalytic activity." Matrix Biol **26**(8): 587-596.
- Roy, R., J. Yang, et al. (2009). "Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer." J Clin Oncol **27**(31): 5287-5297.
- Sakamoto, W., Y. Fujii, et al. (2008). "A novel assay system for myeloperoxidase activity in whole saliva." Clin Biochem **41**(7-8): 584-590.
- Sawicki, G., E. Salas, et al. (1997). "Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation." Nature **386**(6625): 616-619.
- Schulz, R. (2007). "Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 211-242.
- Segal, A. and D. T. Wong (2008). "Salivary diagnostics: enhancing disease detection and making medicine better." Eur J Dent Educ **12 Suppl 1**: 22-29.
- Sengelov, H., F. Boulay, et al. (1994). "Subcellular localization and translocation of the receptor for N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils." Biochem J **299** (Pt 2): 473-479.
- Sexton, W. M., Y. Lin, et al. (2011). "Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment." J Clin Periodontol **38**(5): 434-441.
- Sorsa, T., Y. Ding, et al. (1994). "Effects of tetracyclines on neutrophil, gingival, and salivary collagenases. A functional and western-blot assessment with special reference to their cellular sources in periodontal diseases." Ann N Y Acad Sci **732**: 112-131.
- Souza-Tarla, C. D., J. A. Uzuelli, et al. (2005). "Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities." Clin Biochem **38**(5): 410-414.

- Stetler-Stevenson, W. G. (2008). "Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities." Sci Signal **1**(27): re6.
- Taba, M., Jr., J. Kinney, et al. (2005). "Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases." Dent Clin North Am **49**(3): 551-571, vi.
- Tuomainen, A. M., K. Nyysönen, et al. (2007). "Serum matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with cardiovascular outcome in men." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(12): 2722-2728.
- Uitto, V. J., K. Suomalainen, et al. (1990). "Salivary collagenase. Origin, characteristics and relationship to periodontal health." J Periodontal Res **25**(3): 135-142.
- Vanhoutte, D. and S. Heymans (2010). "TIMPs and cardiac remodeling: 'Embracing the MMP-independent-side of the family'." J Mol Cell Cardiol **48**(3): 445-453.
- Verkman, A. S., B. Yang, et al. (2000). "Role of water channels in fluid transport studied by phenotype analysis of aquaporin knockout mice." Exp Physiol **85 Spec No**: 233S-241S.
- Visse, R. and H. Nagase (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." Circ Res **92**(8): 827-839.
- Westerlund, U., T. Ingman, et al. (1996). "Human neutrophil gelatinase and associated lipocalin in adult and localized juvenile periodontitis." J Dent Res **75**(8): 1553-1563.