ROGÉRIA PEREIRA GONÇALVES

**Efeito do Tratamento Periodontal não Cirúrgico na Atividade da Peroxidase na
Saliva da Glândula Parótida e no Fluido Gengival**

São Paulo

2012

ROGÉRIA PEREIRA GONÇALVES

**Efeito do Tratamento Periodontal não Cirúrgico na Atividade da Peroxidase na
Saliva da Glândula Parótida e no Fluido Gengival**

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Tit. Francisco Emílio Pustiglioni.

São Paulo

2012

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

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Gonçalves, Rogéria Pereira.

Efeito do tratamento periodontal não cirúrgico na atividade da peroxidase na saliva da glândula parótida e no fluido gengival / Rogéria Pereira Gonçalves : orientador Francisco Emílio Pustiglioni. -- São Paulo, 2012.

50 p. : fig. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas - Área de concentração - Periodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Tratamento periodontal. 2. Doenças periodontais. 3. Peroxidase. 4. Periodontite crônica. 5. Saliva I. Pustiglioni, Francisco Emílio. II. Título.

Gonçalves RP. Efeito do Tratamento Periodontal não Cirúrgico na Atividade da Peroxidase na Saliva da Glândula Parótida e no Fluido Gengival. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2012

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

A Deus, meus pais e minha irmã,
por todo incentivo e força para enfrentar os desafios.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Titular Francisco Emílio Pustiglioni**, pela confiança, incentivo, ensinamentos e paciência. Foi uma longa convivência, na qual pude aprender que nossos objetivos são apenas alcançados quando realmente vamos atrás, nada vem de graça.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará**, pela co-orientação e por ceder seu laboratório para a realização dos experimentos desta pesquisa.

Aos meus queridos parceiros de equipe **Simone Borges Braga Queiroz, Ana Paula Sassá Benedette e Henrique Aparecido Bueno** sem vocês nada disso seria possível.

A **Carla Andreotti Damante e Fábio Luis Moura Lima**, que durante minha iniciação científica além da ajuda, me incentivaram a seguir pós-graduação em periodontia.

Aos Professores **Marinella Holzhausen, Cláudio Mendes Panutti, Simone Aparecida Teixeira, Luiz Lima e Fernando Nogueira** pela colaboração durante a elaboração do estudo.

Aos meus colegas do mestrado, **Adriana Moura Foz, Caio César Cremonini, Samuel Ferreira Jr, Gislene, Elaine e Livia**, nossa convivência foi enriquecedora, aprendemos e superamos as dificuldades do curso juntos.

Aos pacientes que participaram desta pesquisa, pela confiança, disponibilidade de tempo e seguimento das condições burocráticas do protocolo da pesquisa.

Aos docentes da disciplina de periodontia **Marco Georgetti, Giuseppe Alexandre Romito, Giorgio de Micheli, Luciana Saraiva, João Batista César Neto, Koto, Marina Conde**, com quem pude conviver e aprender periodontia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP**, à
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – **CAPES** pelo
apoio financeiro.

"A felicidade tem um preço a ser pago. Afinal nada, só nada vive isolado. No tudo, todas as coisas se interpenetram e tudo deve compensar tudo. E tudo é uma questão de QUERER. E querer só é aquilo que se vive no pensamento para o mundo. Muitos querem a riqueza, mas pensam pobremente. Querem a saúde, mas pensam na vulnerabilidade. Muitos querem a felicidade, mas não pensam felizes. Abra sua mente. O que você quer só é querer se é o que você vive.... Se você quer a felicidade, pense feliz, e se pensar é viver, viva feliz porque o preço da felicidade é O DEVER DE SER FELIZ."

Chico Carvalho

Gonçalves RP. Efeito do Tratamento Periodontal não Cirúrgico na Atividade da Peroxidase na Saliva da Glândula Parótida e no Fluido Gengival [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Original.

RESUMO

Dois importantes fatores inter-relacionados estão envolvidos na patogênese da doença periodontal: ativação do sistema imune e produção de peroxidases. Os objetivos deste estudo foram comparar os níveis da atividade do sistema peroxidase presentes no fluido gengival (MPO/FG) e saliva da parótida (POS) em pacientes portadores de periodontite crônica em relação a pacientes periodontalmente saudáveis e avaliar o efeito do tratamento periodontal não cirúrgico nestes indivíduos nestes parâmetros enzimáticos. MATERIAL E MÉTODO: Foram coletados dados dos parâmetros clínicos periodontais e amostras de FG e saliva da glândula parótida de 17 pacientes clinicamente saudáveis (GC) e de 17 pacientes portadores de periodontite crônica generalizada (GP) antes e depois do tratamento periodontal pareados em idade e sexo. As atividades de MPO/FG e POS Parótida foram avaliadas por espectrofotometria. RESULTADOS: O GP apresentou valores maiores nos parâmetros clínicos periodontais em relação ao GC, sendo que os mesmos foram reduzidos após tratamento periodontal. Além disso, o GP apresentou valores mais elevados de atividade de MPO no FG ($p=0,04$) do que o GC. Após tratamento periodontal os níveis de MPO/FG ($p<0,001$) e POS parótida ($p=0,013$) foram reduzidos significativamente. No GP houve correlação negativa e significativa entre POS da parótida e MPO no FG ($r=-0,59$, $p=0,02$). CONCLUSÕES: Na doença periodontal, as atividades de MPO no FG são maiores quando comparados ao grupo controle, e tanto de MPO/FG e POS parótida são reduzidas após tratamento periodontal.

Palavras-chave: Peroxidases. Mieloperoxidase. Saliva Parótida. Fluido Gengival. Periodontite Crônica.

Gonçalves RP. Effect of non Surgical Periodontal Therapy on Peroxidase Activity in Parotid Saliva and Gingival Crevicular Fluid [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Original.

ABSTRACT

Two important and interrelated factors are involved in the pathophysiology of periodontal diseases: the activation of immune system and the production of peroxidases. The objectives of this study were to examine the peroxidase activities present in Gingival Crevicular Fluid (MPO/GCF) and in Parotid Saliva (POS) in patients with generalized chronic periodontitis with healthy controls and to compare the effects of periodontal therapy on enzyme activities. MATERIAL AND METHOD: Periodontal clinical measurements, parotid saliva and GCF samples were obtained of 17 age-matched healthy controls (PC) and 17 patients with chronic periodontal disease (PD) before treatment and after periodontal treatment. The MPO/GCF and POS parotid activities were determined spectrophotometrically. RESULTS: In PD group, clinical parameters, MPO/GCF ($p=0,04$) activities presented higher values than controls. After periodontal treatment levels of MPO/GCF ($p<0.001$) and POS parotid ($p=0,013$) were significantly reduced. In PD there was significant negative correlation between POS and MPO in the parotid FG ($r = -0,59$, $p=0,02$). CONCLUSIONS: In periodontal disease MPO/GCF presented higher levels than controls and MPO/GCF and POS parotid are reduced after treatment.

Keywords: Peroxidase. Myeloperoxidase. Parotid Saliva. Gingival Crevicular Fluid. Chronic Periodontal Diseases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 – Coleta de Saliva da Parótida.....	26
Figura 4.2 – Coleta de Fluido Gengival	27
Figura 4.3 – Cálculo do Volume do Fluido Gengival	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – Média, Desvio Padrão, Medianas e Quartis (25-75%) e comparação entre grupos controle e grupo periodontite.....	31
Tabela 5.2 – Média, Desvio Padrão, Medianas e Quartis (25-75%) e comparação entre antes e após tratamento	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FG	fluido gengival
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HClO	ácido hipocloroso
HOSCN	ácido hipotiacianoso
HTAB	brometo de hexadeciltrimetilamônio
LPO	lactoperoxidase
m	metro
μmol	micromolar
mL	mililitro
mm	milímetro
MMP	metaloproteinase da matriz
MPO	mieloperoxidase
UPOS	unidade de peroxidase salivar
UMPO	unidade de mieloperoxidase
NCI	nível clínico de inserção
O ₂ ⁻	radical ânion superóxido
OSCN ⁻	ânion hipotiocinato
PCS	profundidade clínica de sondagem
PMN	neutrófilo polimorfonuclear
POS	peroxidase salivar
SCN ⁻	íon tiocianato
SS	sangramento à sondagem
TIMP	Inibidor tecidual de MMPs
μL	microlitro
nm	nanometro

LISTA DE SÍMBOLOS

<	menor
>	maior
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
®	marca comercial registrada
°C	graus Celsius
α	alfa
β	beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Peroxidase salivar (origem e função)	17
2.2 Peroxidase salivar e doença periodontal.....	18
2.3 Mieloperoxidase (origem e função)	19
2.4 Mieloperoxidase e doença periodontal	20
3 PROPOSIÇÃO	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Pacientes.....	23
4.2 Avaliação Clínica	24
4.3 Tratamento	25
4.4 Coleta de Saliva da glândula parótida	26
4.5 Coleta de Fluido Gengival (FG)	27
4.6 Quantificação da atividade de POS parótida e MPO FG.....	28
4.7 Quantificação das proteínas totais da saliva	29
4.8 Análise estatística	29
5 RESULTADOS	30
6 DISCUSSÃO	33
7 CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXOS	46

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória de origem bacteriana caracterizada pela destruição dos tecidos de suporte do dente. Sua etiologia é complexa e varia de indivíduo para indivíduo, mas, em geral, a doença pode ser considerada como resultado de um desequilíbrio entre respostas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias (Page, 1999).

Em função da complexidade da sua etiologia e ao fato de que os parâmetros clínicos periodontais, que foram introduzidos há mais de cem anos, e que ainda continuam a funcionar como modelo básico de diagnóstico na prática clínica atual e na pesquisa, os quais possibilitam o diagnóstico apenas pela sequela da doença, existe um considerável interesse em identificar biomarcadores que possam estar associados com a atividade da doença periodontal. Alguns marcadores poderiam oferecer a base do conhecimento para o desenvolvimento de novas terapias periodontais. Além disso, possibilitariam informações pertinentes sobre diagnóstico diferencial e poderiam permitir o monitoramento da doença predizendo futuras perdas ou como ferramenta para avaliar o resultado do tratamento (Ebersole, 2003).

O fluido gengival (FG) e a saliva total têm sido intensamente avaliados por serem considerados fluidos que contêm biomarcadores inflamatórios, os quais podem refletir o status da doença periodontal (Kaufman; Lamster, 2002; Taba et al., 2005; Lamster; Ahlo, 2007). Alguns deles tais como as metaloproteinases da matriz (MMPs) (Sorsa et al., 2004), elastase de neutrófilos polimorfonucleares-PMNs (Palcanis et al., 1992; Armitage et al., 1994; Jin et al., 2002) mediadores inflamatórios como a prostaglandina E-2 (PGE-2) e as interleucinas (IL-6, IL-1, IL-8, IL-10) (Offenbacher et al., 1981; Offenbacher et al., 1986; Reinhardt et al., 1993; Ishihara et al., 1997; Gamonal et al., 2000) dentre outros, apresentam-se aumentados em pacientes portadores de doença periodontal.

O FG é principalmente composto por soro e exsudado inflamatório da gengiva. Apresenta um papel protetor no sulco/bolsa periodontal por sua capacidade de remover células, moléculas e periodontopatógenos, e um papel antibacteriano, pois contém anticorpos e enzimas (Lamster, 1997). Já a saliva total é composta por diversos fluidos e partículas da cavidade oral e das vias aéreas e, assim como o FG,

possui vários mecanismos de defesa do sistema imune, inclusive o sistema peroxidase (Nagler et al., 2002).

O sistema peroxidase é um dos mais importantes sistemas de defesa inata presentes na saliva e no FG, cujos mecanismos são inespecíficos. O espectro deste sistema atinge tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. Consiste da peroxidase salivar (POS) de origem das glândulas parótida e submandibulares e da mieloperoxidase (MPO) derivada principalmente de leucócitos polimorfonucleares presente no FG (Tenovuo; Pruitt, 1984).

A POS contribui na manutenção da saúde oral por suas importantes funções: controle do nível de peróxido de hidrogênio na cavidade oral, assim como, atividade antibacteriana, inibindo o metabolismo e proliferação de muitas bactérias. Além disso, tem a capacidade de inativar uma série de componentes cariogênicos e mutagênicos, protegendo deste modo, os dentes e a mucosa oral (Tenovuo; Pruitt, 1984; O'Brien, 2000).

Embora muitas informações em relação ao sistema peroxidase e sua importância biológica tenham sido estudadas nesses últimos anos, várias questões ainda continuam sem resposta. As investigações experimentais, avaliando o efeito da terapia sobre este parâmetro enzimático (parótida) em pacientes portadores de periodontite crônica, e sua correlação com a atividade da MPO presente no FG em pacientes portadores de doença periodontal são limitadas.

Baseando-se, portanto, em seu comportamento fisiológico, nós hipotetizamos que a avaliação do sistema peroxidase na doença periodontal e do efeito do tratamento em sua atividade possibilitaria uma melhor compreensão dos mecanismos da doença.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Peroxidase salivar (origem e função)

A Peroxidase Salivar (POS) é estruturalmente e catalicamente similar à Lactoperoxidase (LPO) (Ihalin et al., 2006). *In vivo*, os sistemas POS e LPO utilizam apenas o pseudohaletio tiocianato (SCN^-) como substrato para produzir ânion hipotiocianeto (OSCN^-) (Pruitt et al., 1988). Tais peroxidases defensivas são comumente encontradas nas mucosas, leite materno (Shin et al., 2000), fluido lacrimal (Van Haeringen et al., 1979; Tenovuo et al., 1985), e nas mucosas terminais dos pulmões (Gerson et al., 2000). LPO e POS são codificadas pelo mesmo gene (Ueda et al., 1997).

A verdadeira POS humana é secretada a partir das células acinares das glândulas parótida e submandibulares (Riva et al., 1978) e, além disso, sua liberação diária reflete a secreção total da saliva estimulada.

Na saliva, H_2O_2 oxida o íon tiocianato (SCN^-), produto da detoxicação do cianeto, o qual é secretado pela saliva (principalmente a parótida) e é doador de elétrons na reação $[\text{SCN}^- + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{HOSCN} + \text{H}_2\text{O}]$, na qual é catalizada pela enzima peroxidase.

O peróxido de hidrogênio é tóxico, tanto para a mucosa oral, quanto para a gastrointestinal, podendo ser letal para as bactérias e células do hospedeiro (Tenovuo; Mäkinen, 1976; Thomas et al., 1980). É mutagênico em microrganismos (Thomas et al., 1981; Carlsson, 1987; Ortiz et al., 1997); induz aberrações cromossômicas e trocas de pares cromossômicos em células de mamíferos (Pruitt et al., 1983; Geiszt et al., 2003); pode induzir câncer (van der Vliet et al., 1997). Sua citotoxicidade também está relacionada à sua capacidade de induzir a peroxidação lipídica da membrana citoplasmática (Duncan et al., 1995).

Um potente produto antibacteriano oxidante está envolvido nesta reação: o ânion hipotiocianato (OSCN^-). A atividade antibacteriana desse íon advém de sua capacidade de inibir as enzimas dos grupos sulfidril bacterianos, os quais são vitais para a glicólise (Petrides, 1998). De qualquer forma, o acúmulo de atividade antibacteriana em combinação com a peroxidase, peróxido de hidrogênio e

tiocianato é muito mais potente do que o peróxido de hidrogênio sozinho (Tenovuo; Mäkinen, 1976). Além disso, a oxidação do peróxido de hidrogênio mediada pela peroxidase em combinação com íon (OSCN^-) pode resultar na produção de espécies reativas de oxigênio com potente atividade antibacteriana (Ortiz et al., 1997).

Portanto, o sistema POS mantém a reação de peroxidação do tiocianato em estado de equilíbrio dinâmico, o qual serve para minimizar a concentração tóxica de peróxido de hidrogênio e maximizar a concentração antibacteriana do agente hipotiocianato. Ou seja, inibe o crescimento de microrganismos de modo eficiente diante destas condições, bloqueando o metabolismo bacteriano, constituindo uma proteção aos tecidos do hospedeiro (Pruitt, 1987).

2.2 Peroxidase salivar e doença periodontal

Diante destas características de sua função biológica, foram realizados alguns estudos para avaliar a atividade da POS na doença periodontal. Smith et al. (1984) avaliaram as mudanças na atividade da peroxidase em gengivite experimental, por três semanas, e, após esse período os pacientes receberam tratamento periodontal. Durante a fase experimental, em intervalos regulares, foram coletadas amostras de saliva total e FG (teste strip) e dados clínicos de índice Gengival e índice de placa. Foi observado um considerável aumento da atividade da peroxidase durante o período, a qual declinou após restabelecimento da higiene oral. O autor concluiu que este procedimento poderia ser útil na avaliação da progressão da gengivite, entretanto, no FG, os resultados foram questionados devido ao fato de que a composição das tiras utilizadas na avaliação (Hemastix®) são inadequadas para este tipo de avaliação.

Em 1996, Güven et al., observou que em 10 pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1, que, segundo os autores, teoricamente poderiam ter a “tendência” de apresentar periodontite, apresentavam maior atividade de peroxidase salivar que 10 pacientes sistemicamente saudáveis. Estes resultados estavam correlacionados com os parâmetros clínicos periodontais de profundidade clínica de sondagem, índice placa e índice de sangramento à sondagem modificado. Concluíram que este

teste poderia ser utilizado como marcador de tendência ao desenvolvimento de periodontite em pacientes portadores de diabetes.

2.3 Mieloperoxidase (origem e função)

A POS não é a única peroxidase presente nos fluidos orais. Os leucócitos polimorfonucleares (PMNs) do exsudato do FG produzem mieloperoxidase (MPO), encontrada também na saliva (Sermon et al., 2005). É a mais abundante proteína existente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e também pode ser encontrada em monócitos, porém em menores concentrações.

A MPO pode catalisar a oxidação do íon cloreto como segue: $\text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ClO}^- + \text{H}_2\text{O}$.

O íon hipoclorito (ClO^-) e seus derivados formados nos tecidos são mais tóxicos para células de mamíferos e microrganismos que o peróxido de hidrogênio (Thomas, 1981; Pruitt et al., 1986; Pal; Bhattacharyya, 1989). Na presença de (SCN^-), a MPO catalisa a oxidação do (SCN^-) independente da concentração de Cl^- (Tenovuo; Larjava, 1984). Isso significa que a MPO na saliva não é um perigo para os tecidos orais em condições normais, em função das altas concentrações de SCN^- na saliva. Portanto a MPO irá atuar em conjunto com a POS protegendo contra a toxicidade convertendo H_2O_2 em OSCN^- e água. Pode-se notar que os íons cloreto não podem ser usados como substratos pela POS (Hänström et al., 1983). Além disso, MPO, catalisando a oxidação do íon cloreto, produz o ácido hipocloroso (HClO^-), um potente agente bactericida (O'Brien, 2000). A atividade antimicrobiana do sistema $\text{MPO-H}_2\text{O}_2\text{-Cl}$ pode se dar em função da reação direta do HOCl com os componentes celulares, ou pode ser mediada por outros agentes oxidantes e derivados do cloreto como as cloroaminas, os quais são formados em reação com HOCl e amônia e aminas (Thomas et al., 1988).

Em resposta a sinais quimiotáticos gerados em sítios infeccionados e inflamados, PMNs migram através das vias sanguíneas e entram nos tecidos, chegando primeiramente aos tecidos orais através do FG (Schiött; Loe, 1969).

2.4 Mieloperoxidase e doença periodontal

A concentração de MPO varia como consequência da inflamação gengival sendo que quanto maior a taxa de inflamação maior a quantidade de PMNs que estarão contidas na saliva.

Esta condição foi demonstrada por Smith et al. (1984) que encontraram correlação entre a atividade da peroxidase no exsudato gengival e a severidade da inflamação, em 8 indivíduos, que se submeteram a gengivite experimental. Observaram aumento na atividade peroxidase e que esta correlacionava-se com as alterações teciduais descritas nas lesões iniciais por Page e Schroeder (1976), nestas a inflamação gengival e exsudato de leucócitos atingiram seu nível máximo 6-12 dias após o estabelecimento da gengivite. Após esse período, o índice gengival continuou a aumentar, enquanto a atividade da peroxidase mostrou uma queda antes de aumentar novamente. Isso pode refletir as alterações teciduais que ocorrem nesses tecidos em lesões iniciais da doença periodontal até o estabelecimento da lesão. Quando foi restabelecida a higiene normal deste pacientes, os índices gengivais e atividade de peroxidase caíram nitidamente.

Wolff et al. (1988) avaliaram o efeito de uma única sessão de raspagem e alisamento radicular nos níveis de MPO e Dehidrogenase Láctea (LDH) presentes no FG. Participaram deste estudo doze pacientes portadores de periodontite crônica moderada á severa. Observaram que altos níveis de LDH e MPO no FG estavam fortemente relacionados com a severidade da doença. A raspagem foi eficiente na redução dessas enzimas, e foi acompanhada de diminuição dos sinais clínicos de doença periodontal.

Buchmann et al. (2002), avaliaram se existem diferenças na resposta dos neutrófilos em periodontite crônica tratada e não tratada através da atividade da Mieloperoxidase e complexo inibidor de elastase α -1-proteinase presentes no FG, antes e após cirurgia periodontal. Seis meses após, concluíram que a cicatrização estaria associada com diminuição da resposta dos neutrófilos em função da terapia periodontal, pois verificaram uma diminuição nos níveis destes marcadores de resposta inflamatória.

Gonçalves et al. (2008) acompanharam o efeito da terapia periodontal na atividade da peroxidase em saliva total e MPO em FG, em pacientes portadores de

diabetes mellitus tipo 2 e em pacientes sistemicamente saudáveis, ambos com diagnóstico de periodontite crônica. Observaram que houve redução nos dois grupos avaliados, em todos parâmetros, porém os indivíduos portadores de diabetes apresentaram menores níveis de MPO no FG do que o grupo sistemicamente saudável.

Marcaccini et al. (2010), investigaram o efeito do tratamento periodontal em pacientes portadores de periodontite crônica sobre vários marcadores inflamatórios (MMP)-8, inibidor tecidual de MMPs (TIMP)-1 e TIMP-2, MPO, e MMP-9 no FG. Observaram que pacientes saudáveis apresentavam menores níveis que pacientes portadores de Periodontite Crônica, e que os níveis reduzem após tratamento periodontal.

Hernández et al. (2010) demonstraram que a MPO e a MMP-8 estão relacionadas com episódios de progressão e com a resposta ao tratamento em pacientes portadores de periodontite crônica, e que interagem entre si, seus resultados sugerem que estão envolvidas no metabolismo da doença, podem ser utilizadas como potentes biomarcadores para avaliação da resposta ao tratamento.

3 PROPOSIÇÃO

Objetivo geral: avaliar a atividade dos sistemas de peroxidase em indivíduos com periodontite crônica.

Os objetivos específicos foram:

- Comparar a atividade de peroxidase salivar na parótida e mieloperoxidase no fluido gengival em indivíduos com e sem periodontite (pacientes periodontalmente saudáveis).
- Avaliar o efeito do tratamento periodontal sobre a atividade da peroxidase salivar e mieloperoxidase no fluido gengival em pacientes portadores de periodontite crônica.
- Analisar a correlação entre a mieloperoxidase no fluido gengival e a peroxidase secretada especificamente pela glândula salivar parótida, com parâmetros clínicos periodontais (profundidade clínica de sondagem, nível clínico de inserção e sangramento à sondagem).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Foram incluídos 17 pacientes portadores de periodontite crônica generalizada (com mais de 30% dos sítios apresentando perda do nível clínico de inserção) 15 dentes (excluindo terceiros molares), os mesmos foram classificados quanto à severidade da doença, de acordo com Armitage (1999). Adicionalmente os indivíduos doentes (GP) deveriam apresentar pelo menos 4 dentes exibindo Profundidade Clínica de Sondagem de um ou mais sítios ≥ 5 mm não adjacentes, com sangramento à sondagem e no máximo 60% dos sítios com perda clínica de inserção ≤ 7 mm, indivíduos com bolsas periodontais mais profundas que 7mm foram excluídos do estudo.

O Grupo Controle (GC) foram selecionados 17 pacientes periodontalmente saudáveis, apresentando pelo menos formado pelos pacientes periodontalmente saudáveis, apresentavam profundidade clínica de sondagem ≤ 3 mm, pareados com o GP em relação a idade (± 5 anos) e sexo.

Os seguintes critérios de exclusão foram considerados: gestantes, fumantes ou ex fumantes, indivíduos com história de reações anafiláticas, que tivessem recebido tratamento periodontal nos últimos seis meses antes do início do estudo, com alterações sistêmicas (infecção por HIV, diabetes, hepatite) e que tenham sido submetidos à administração sistêmica de agentes anticoagulantes, antibióticos, anti-inflamatórios, anti-neoplásicos, imuno-estimulatórios ou antidepressivos até 6 meses antes do início do estudo.

Todos os participantes foram informados, em detalhes, dos procedimentos, e assinaram um termo de consentimento autorizando a participação nesta pesquisa.

Os pacientes foram triados na Clínica de Pós Graduação da disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia da USP.

4.2 Avaliação clínica

Os sujeitos incluídos receberam exame clínico periodontal, que foi realizado por um único examinador previamente treinado e calibrado (RPG), no início do estudo.

Todos os dentes, exceto os terceiros molares, foram avaliados em 6 sítios (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual, disto-lingual), para os seguintes parâmetros, na seguinte ordem:

Distância da Linha esmalte-cimento à margem gengival: A retração gengival foi mensurada em 6 sítios por dente. Ela foi registrada quando a margem gengival livre estava apical a margem esmalte-cimento (junção esmalte-cimento anatômica ou a margem de uma restauração fixa).

Profundidade clínica de sondagem (PCS)- sondagem com sonda PCPUNC 15 (Hu Friedy, USA) em seis sítios por dente. Corresponde, em milímetros, à distância entre margem gengival e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.

Nível clínico de inserção - NCI: distância, em milímetros, entre a junção esmalte-cimento e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.

Sangramento à sondagem – SS (Lenox; Kopczyk, 1973): presença (positivo) ou ausência (negativo) de sangramento após 20 segundos da sondagem com sonda periodontal milimetrada em 6 sítios por dente. A porcentagem de sangramento foi calculada por paciente pela divisão do número total dos sítios com sangramento pelo número total de sítios nesse paciente (número de dentes presentes multiplicado por 6).

A metodologia utilizada para a calibração do examinador foi preconizada por Araújo et al. (2003), onde se avaliou o erro padrão da medida (e.p.m) e o erro médio percentual (e.m.p) para os parâmetros clínicos periodontais contínuos (profundidade de sondagem e nível clínico de inserção).

Foram coletados os dados clínicos e as amostras de saliva e FG antes do tratamento e 4 semanas após o término do tratamento básico, segundo Perry et al.

(2007) este é o período necessário para que o tecido epitelial e conjuntivo se cicatrizem.

4.3 Tratamento

Os pacientes portadores de periodontite receberam tratamento periodontal não cirúrgico, realizado por especialistas em periodontia (A.P.S.B e H.A.B.), conforme segue:

1. Instrução de higiene oral para controle de placa bacteriana e remoção de cálculo supragengival com o uso de ultra-som.
2. Eliminação de fatores locais retentores de biofilme (Restaurações, Próteses, se necessário).
3. Raspagem, alisamento e polimento corono-radicular com instrumentação manual e uso de ultra-som, por sextante.
4. Integração clínica (restauração provisória de cáries, extração de dentes condenados, se necessário).

Foram realizadas de quatro a seis sessões que foram definidas de acordo com as características e condições apresentadas por cada paciente.

Finalizada a fase inicial do tratamento, iniciou-se a fase do pós tratamento, um período de 4 semanas. Dentro deste período, os pacientes receberam controle de placa bacteriana profissional semanal (orientação de higiene bucal, raspagem e profilaxia supra gengival) até o momento da reavaliação.

Na reavaliação, os pacientes foram reexaminados com os mesmos parâmetros clínicos inicialmente utilizados. Neste momento foi verificado se os pacientes apresentavam controle de placa satisfatória ($\leq 30\%$ dos sítios com placa) de acordo com O'Leary et al. (1972), e diminuição de inflamação dos tecidos periodontais. Os pacientes que não apresentavam este perfil retornaram ao tratamento.

4.4 Coleta de saliva da glândula parótida

Para as coletas de saliva foi orientado para todos os pacientes do GP e do GC, estarem em jejum de no mínimo oito horas e que a escovação dos dentes fosse feita apenas com água. Foram realizadas no período da manhã entre 8:00 e 12:00 horas.

Foi utilizado o aparelho de Lashley modificado (Tenovuo, 1989), simultaneamente do lado direito e esquerdo. Após o correto posicionamento do coletor na saída do ducto de Stenson e conectado a um cilindro de borracha que conduziu a saliva até um tubo de ensaio resfriado em gelo, assim foi obtida uma amostra de saliva. Foi realizado estímulo com 15µl de ácido cítrico a 5%, a cada 30 segundos, na ponta da língua por um período de 10 minutos, para cada amostra estimulada. A cada 25 segundos o paciente foi orientado para deglutir e assim receber um novo estímulo.

A saliva foi coletada em tubos graduados e mantida em gelo picado enquanto se realizavam as coletas. Após as coletas, as amostras foram separadas em tubos Eppendorf de 1ml cada e congeladas a -80°C até que fosse realizado o experimento (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Coleta de Saliva da Parótida, estimulação gustativa por ácido cítrico

4.5 Coleta de Fluido Gengival (FG)

Uma semana após a avaliação clínica, em cada indivíduo do GP, foram coletadas amostras do FG de 5 sítios com PCS $\geq 5\text{mm}$ e NCI $\geq 4\text{mm}$, para o GC foram coletadas amostras de 5 sítios PCS $\leq 3\text{mm}$ e NCI $\leq 4\text{mm}$. O paciente não poderia ter comido ou bebido por 2 horas antes da coleta, sendo que este procedimento foi realizado no período da manhã. Os sítios selecionados foram isolados com roletes de algodão e suavemente secos com jato de ar. A amostra do fluido do sulco gengival foi coletada com 3 tiras de papel em sequência (PerioPaper, ProFlow Inc., Amityville, NY, USA) por sítio para análise de mieloperoxidase, os quais foram introduzidos na sulco gengival por 30 segundos (Rudin et al., 1970). As amostras do FSG foram mensuradas com o Periotron 8000® calibrado (Oraflow, Inc., NY, USA). As amostras do fluido do sulco gengival foram estocadas individualmente em tubos de Eppendorfs 1,5ml. Para análise, foi feito um “pool” das amostras por paciente, sendo um pool para sítios doentes, e outro para sítios saudáveis. A coleta foi realizada por um único pesquisador. Amostras visivelmente contaminadas por sangue foram descartadas. As soluções foram armazenadas a -80°C . No momento da análise, as amostras foram diluídas em solução fosfato contendo 0,1% dietil pirocarbonato (Figuras 4.2 e 4.3).

Figura 4.2 – Coleta de FG no sítio

Figura 4.3 – Cálculo do Volume do FG coletado, Periotron 8000®

4.6 Quantificação da atividade de POS parótida e MPO FG

A medida de atividade de peroxidase/mieloperoxidase (POS/MPO) baseia-se na velocidade de oxidação do substrato o-dianisidina na presença de água oxigenada, e é evidenciada pela mudança de absorbância medida a 460nm (Bradley et al., 1982). As amostras de saliva (30 μ L) e FG (30 μ L) foram diluídas com solução de fosfato de potássio com pH 6,0 contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (30 μ L) (HTAB, Sigma Chem. Co, EUA). As misturas foram aquecidas durante duas horas a 60°C para inativação da catalase endógena (Ohta et al., 2003) e centrifugados a 10000g por 5 minutos. A cada 10 μ L das soluções foram acrescentados 200 μ L de solução de fosfato de potássio (50mM, pH6) contendo 16,7mg/mL de o-dianisidina (Sigma Chem. Co., EUA) e 0,0005% de H₂O₂ em microplaca de leitor ELISA (Espectramax, Molecular Devices, EUA).

A monitorização da velocidade de formação do produto de oxidação da o-dianisidina foi realizada registrando o aumento da absorbância da mistura a 460nm (leituras coletadas em intervalos de 10 segundos durante 5 minutos). A atividade específica de peroxidase foi calculada pela velocidade máxima da reação e o resultado foi expresso em UPOS/mg de proteína para amostras de saliva. A concentração de atividade da peroxidase também foi calculada pela velocidade máxima da reação expressa em UPOS/mL na saliva parótida e UMPO/ μ L para as amostras de FG. Uma unidade de POS e de MPO é definida como a quantidade em μ mol de H₂O₂ degradado por minuto.

4.7 Quantificação das proteínas totais da saliva

A dosagem de proteínas contidas na saliva da parótida foi realizada empregando-se o método de Bradford (1976), por meio de kit comercial (Bio Agency, Brasil), utilizando-se como padrão, a curva de albumina diluída em água destilada e para cada 200µL de padrão ou amostra, foram adicionados 50µL do reagente Comassie Blue. Após incubação de 5 minutos à temperatura ambiente, as leituras de absorbância foram realizadas a 595nm em microplaca de leitor ELISA (Spectramax, Molecular Devices, EUA).

4.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do programa SPSS (IBM SPSS Statistics 19).

Os indivíduos do GP e do GC foram comparados com relação às variáveis contínuas (idade, PCS, NCI, PO parótida e MPO FG). Inicialmente foi verificado se havia aderência à distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias foi verificada pelo teste de Levene. Como houve rejeição destas duas condições, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney para comparar os dois grupos.

No GP, as médias das variáveis contínuas de antes do tratamento foram comparadas com as medianas após o tratamento pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon.

A associação entre sexo e grupo foi avaliada pelo teste de qui-quadrado.

A Correlação entre variáveis contínuas foi verificada por meio do coeficiente de correlação de Pearson.

Todos os testes utilizaram nível de significância alfa de 5%.

5 RESULTADOS

O GP (n=17) apresentou idade média de $44,05 \pm 10,84$, e o GC (n=17) apresentou idade média de $44,11 \pm 8,60$. De acordo com o teste t de Student não houve diferença entre os grupos em relação à idade ($p=0,98$). No GP e no GC havia 11 (64,7%) mulheres. De acordo com o teste de qui-quadrado não houve associação entre sexo e grupo ($p=0,82$).

As variáveis PCS, NCI e SS foram significativamente maiores ($p<0,001$) no GP do que no GC. A média de atividade específica de peroxidase da parótida (UPOS/mg) foi menor no grupo GP que no GC ($p=0,01$). Para a concentração de atividade de POS (UPOS/mL) não foi encontrada diferença significativa comparada ao GC ($p=0,16$). Para a concentração de atividade (UMPO/ μ L) no FG, o GP apresentou mediana maior em relação ao GC ($p=0,04$) (Tabela 5.1).

Após tratamento periodontal no GP houve redução significativa das variáveis PCS, NCI e SS comparadas aquelas de antes do tratamento, além disso, houve redução da concentração de atividade (UMPO/ μ L) presente no FG ($p<0,001$). Em relação à POS parótida também foram observadas reduções significativas para atividade específica (UPOS/mg) ($p=0,013$) e também para a concentração de atividade (UPOS/mL) ($p=0,033$) depois do tratamento (Tabela 5.2).

No GP houve uma correlação inversa e significativa entre atividade específica de POS da parótida e atividade de MPO no FG ($r=-0,59$, $p=0,02$). No entanto, no GC não houve correlação significativa entre POS da parótida e MPO no FG ($r=0,57$, $p=0,059$).

Também foi verificada correlação significativa, entre PCS e MPO FG ($r=0,47$, $p=0,008$), entre NCI e MPO FG ($r=0,37$, $p=0,039$) e entre BOP e MPO FG ($r=0,43$, $p=0,013$). Para POS parótida, não foram encontradas correlações significativas em relação aos parâmetros clínicos periodontais.

Tabela 5.1- Mediana e Quartis (25-75%) e comparação entre Grupo Controle e Grupo Periodontite

		Grupo Controle	Grupo Periodontite	<i>p</i> (MW)
PCS (mm)	Mediana (25-75%)	1,75 (1,57-1,95)	3,12 (2,83-3,5)	< 0.001*
NCI (mm)	Mediana (25-75%)	1,8 (1,72-2,12)	3,93 (3,59-4,57)	< 0.001*
SS (%)	Mediana (25-75%)	8,92 (4,45 -12,71)	74,65 (59,78-88,09)	< 0.001*
UMPO/ μ L (FG) n=16	Mediana (25-75%)	0,90 (0,46-1,72)	2,03 (0,49-3,61)	0,04*
UPOS/mg (Sal. Parótida) n=17	Mediana (25-75%)	12,91 (2,21-29,53)	1,717 (0,25-4,02)	0,01*
UPOS/mL (Sal. Parótida) n=17	Mediana (25-75%)	5,274 (1,9-13,31)	2,77 (1,6-5,31)	0,16

OBS: MW = *p* valor de acordo com o teste de Mann-Whitney; relativo à comparação entre POS parótida e MPO FG.

Atividade POS Parótida expressos em (UPOS/mg), (UPOS/mL) e de MPO/FG expressos em (UMPO/ μ L). * significativo ao nível alfa de 5%

Tabela 5.2 - Mediana e Quartis (25-75%) e comparação antes e depois no Grupo Periodontite

		Antes Tratamento	Depois Tratamento	p (W)
PCS (mm)	Mediana (25-75%)	3,12 (2,83-3,5)	2,65 (2,06-3,02)	0,008*
NCI (mm)	Mediana (25-75%)	3,93 (3,59-4,57)	3,89 (2,84-4,42)	0,088
SS (%)	Mediana (25-75%)	74,65 (59,78-88,09)	23,7 (14,4-31,85)	<0,001*
UMPO/ μ L (FG)	Mediana (25-75%)	2,03 (0,49-3,61)	0,65 (0,14-1,66)	<0,001*
n=16				
UPOS/mg (Sal. Parótida)	Mediana (25-75%)	70,66 (0,27-3,48)	0,42 (0,12-0,82)	0,013*
n=11				
UPOS/mL (Sal. Parótida)	Mediana (25-75%)	3,02 (1,71-5,38)	1,43 (0,71-3,85)	0,033*
n=11				

W = p valor do teste de Wilcoxon relativo à comparação entre POS Parótida e MPO FG. Atividade POS Parótida expressos em UPOS/mg, UPOS/mL. MPO expressos em UMPO/ μ L. * significativo ao nível alfa de 5%.

6 DISCUSSÃO

Este estudo foi delineado para avaliar o efeito do tratamento na atividade da peroxidase presente na saliva da parótida e MPO no FG em pacientes portadores de periodontite crônica e comparando as atividades das mesmas em pacientes periodontalmente saudáveis.

Os resultados dos parâmetros clínicos periodontais sugerem que o tratamento periodontal não cirúrgico no GP foi eficiente, resultando em uma significativa redução da PCS, NCI e SS em todos pacientes. Constatou-se, portanto que houve diminuição da inflamação periodontal.

A maior atividade de peroxidase foi detectada na saliva da parótida seguida pela atividade encontrada no FG no GP, sendo que menores níveis foram encontrados no GC apenas no FG. Com relação à atividade específica POS parótida, o inverso do que era esperado ocorreu, de acordo com o teste de Mann-Whitney, o GP apresentou menor mediana que o GC. Em relação à concentração de atividade POS parótida não foi encontrada diferença entre os grupos avaliados. (Tabela 5.1). Após tratamento periodontal, as atividades de MPO do FG e de POS parótida reduziram-se significativamente conforme mostra tabela 5.2.

Os resultados de FG estão de acordo com Yamalik et al. (2000), que avaliaram os níveis de MPO no FG e a atividade de elastase no FG de 60 indivíduos divididos em três grupos: periodontite inicial, periodontite do adulto, e saudáveis. Houve menor atividade das enzimas em sujeitos saudáveis, comparados a pacientes portadores de doença periodontal (sem diferença entre esses dois grupos). Concordaram também com os achados de Wei et al. (2004), que detectaram maiores níveis de MPO no FG em pacientes portadores de periodontite, comparados com pacientes saudáveis, e que, altas concentrações de MPO poderiam gerar espécies reativas de oxigênio, as quais seriam capazes de lesionar os tecidos periodontais.

A composição do FG deriva de um grande número de fontes, incluindo o soro, tecido conjuntivo e epitélio. O FG atravessa da crista óssea, carreando células inflamatórias, imunológicas e bactérias presentes no tecido. Logo, este aumento dos níveis de MPO em sítios afetados pela doença ocorre em função do aumento de

leucócitos que penetraram no sulco gengival como resultado da inflamação local (Cao; Smith, 1989; Gomes et al., 2009).

Makinen e Tenevuo (1976) sugeriram que peroxidase de origem leucocitária não está presente na saliva da parótida, mas suas características são similares às peroxidases presentes no exsudado inflamatório (Tenovuo et al., 1978) ou de origem do FG (Makinen; Tenovuo, 1976), a qual é a MPO. Estima-se que 75% da atividade da peroxidase na saliva total é atribuída à MPO, e o remanescente à POS (Thomas et al., 1994). Devido ao fato de que a peroxidase na saliva total poderia conter PMNs, os quais poderiam confundir a interpretação dos resultados, foi feita também a análise na saliva pura da glândula parótida.

Foi utilizado o mesmo método para a detecção da atividade de POS e MPO em função da heterogeneidade do sistema salivar, conforme Oram e Reiter, 1966, Shannon et al., 1966, Iwamoto et al., 1967 e Bradley et al., 1982, que demonstraram que o-dionisidina pode ser utilizada para substrato da atividade destas duas enzimas.

Os resultados referentes à atividade de POS parótida sugerem que a glândula parótida responde à inflamação periodontal, pois seus níveis reduzem após tratamento, o que está de acordo com a resposta local, já que o mesmo fenômeno foi detectado na atividade de MPO no FG. Porém foi encontrada no GP menor atividade específica de POS parótida que o GC. Em relação à concentração de atividade de POS parótida não foi encontrada diferença entre o GP e GC. Esse resultado pode ter ocorrido devido ao pequeno tamanho da amostra e a alta dispersão da variável POS parótida encontrada neste estudo. Isto pode indicar que a saliva da parótida não é o veículo mais adequado para detecção de doença periodontal por este parâmetro enzimático.

Previamente, apenas Saxén et al. (1990) avaliaram as concentrações de POS, MPO e tiocianato tanto na saliva total, quanto na saliva da parótida de pacientes portadores de periodontite juvenil (agressiva). A atividade de peroxidase salivar foi significativamente menor na saliva da parótida e na saliva total desses pacientes, assim como a atividade de MPO presente na saliva total desses pacientes. Isto os levou a supor que a supressão deste mecanismo de defesa do hospedeiro poderia ser uma característica da periodontite agressiva. Já nos pacientes portadores de periodontite crônica, esperava-se que apresentassem uma

resposta imune normal, logo uma maior atividade destas enzimas na doença, fato que não ocorreu neste estudo.

Outro dado que merece destaque foi a correlação negativa encontrada entre atividade específica da POS parótida e MPO no FG ($r=-0,59$, $p=0,02$). Isto sugere que as duas enzimas podem funcionar em sistema de “feedback” negativo, onde as atividades das enzimas tanto de origem do FG como da parótida, embora sempre aumentem em função da doença periodontal, buscam manter estável a homeostase do sistema de peroxidase salivar, já que a MPO originada do FG também será liberada na cavidade oral juntamente com a saliva da parótida. Provavelmente este mecanismo procura prevenir a formação de radicais livres em excesso, o que poderia gerar danos nos tecidos na cavidade oral (Yamalík et al., 2000; Wei et al., 2004). Este fenômeno foi verificado apenas na doença, na saúde isto não ocorre, já que não encontramos correlação entre saliva parótida e fluido gengival nos pacientes controle. É importante frisar que foi verificada uma correlação apenas moderada. Além disso, o número de indivíduos avaliados, um total de 17 para cada grupo, nos mostra uma apenas uma tendência. Novos estudos são necessários para confirmar esta informação.

Embora se tenha conhecimento da sua potente atividade antibacteriana, existem poucas investigações experimentais na literatura que avaliaram a atividade de peroxidase da saliva da parótida em pacientes portadores de periodontite. Também não encontramos trabalhos na literatura que tenham avaliado o efeito do tratamento neste parâmetro. Estudos anteriores apenas indicaram que algumas proteínas (albumina, cistatina C e S) estão aumentadas na saliva da glândula de pacientes portadores de periodontite em relação à pacientes saudáveis (Henskens et al., 1993; Henskens et al., 1994; Henskens et al., 1996). Este é, provavelmente, o primeiro estudo que documenta os níveis da atividade da Peroxidase na saliva da parótida antes e após tratamento periodontal correlacionando com as alterações locais, no sítio inflamado.

Além disso, as glândulas salivares podem responder à periodontite pelo aumento da produção e secreção de alguns marcadores inflamatórios (Zhong et al., 2007), os quais, pelas circulações sanguíneas e linfáticas, poderiam levar tais mediadores, originados pela inflamação do periodonto, às glândulas, e vice e versa. Sabemos que a POS desempenha um importante papel em condições fisiológicas e patológicas e neste estudo observamos que a POS parótida sofreu redução após

tratamento periodontal assim como verificado através das análises de MPO no FG. Uma das possíveis vias para resultar neste fenômeno pode estar relacionada à produção elevada de prostaglandinas (PGE-2) no periodonto destes pacientes, assim como demonstraram o aumento deste mediador inflamatório associado ao aumento dos níveis de NOS e amilase em saliva de parótida de ratos com periodontite experimental (Miozza et al., 2010; Miozza et al., 2011). Sabe-se que as prostaglandinas são mediadores inflamatórios da doença periodontal. PGE-2 é um produto inflamatório lipídico presente em grandes quantidades na saliva da glândula parótida (Oshima et al., 1987), podendo desencadear sinais intracelulares ligando-se aos receptores de prostaglandinas presentes na glândula. A ativação dos receptores de prostaglandinas pode levar a um aumento de AMPc (Narumiya et al., 1999), o que já foi descrito em células acinares da glândula parótida (Krause et al., 1996). Assim a PGE-2 seria o primeiro mensageiro e o AMPc o segundo mensageiro, e através do sistema adenilato ciclase-AMPc, seguido de outros eventos bioquímicos, poderia resultar na ativação da secreção da glândula. Portanto, a hipótese seria que PGE-2 atuaria em seu receptor na parótida, induzindo ao acúmulo de AMPc, o qual modularia a atividade de POS, diminuindo portanto sua produção na glândula parótida de pacientes portadores de periodontite, após tratamento periodontal.

Em suma, neste estudo foi possível um melhor entendimento da patogênese da doença, já que foi demonstrada que as atividades de peroxidases tanto na saliva da parótida, quanto no FG, apresentam um importante papel na periodontite, apresentando atuação sistêmica e local. Embora apresentem origens diferentes, desempenham a mesma função, estão correlacionadas entre si e reduzem após tratamento periodontal. Em função destes achados e por apresentarem metodologias relativamente simples e de baixo custo de detecção, consideramos que a medição da atividade de MPO no FG seria o meio mais eficiente e poderia ser considerado como um possível marcador de doença periodontal.

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados encontrados no presente trabalho e frente à metodologia empregada consideramos válido chegar às seguintes conclusões:

- Pacientes portadores de periodontite crônica apresentam atividade maior de mieloperoxidase no fluido gengival que indivíduos periodontalmente saudáveis, porém menor atividade de peroxidase na saliva da parótida.
- Após tratamento periodontal ocorreu redução da atividade de peroxidase na saliva da parótida e mieloperoxidase no fluido gengival em pacientes portadores de periodontite crônica.
- A atividade de mieloperoxidase presente no fluido gengival apresenta uma correlação negativa em relação à atividade de peroxidase salivar da parótida em pacientes portadores de periodontite crônica. Apenas a atividade de mieloperoxidase no fluido gengival está correlacionada a todos os parâmetros clínicos periodontais avaliados (profundidade clínica de sondagem, nível clínico de inserção e sangramento à sondagem).

REFERÊNCIAS¹

Araujo MW, Hovey KM, Benedek JR, et al. Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis of inter- and intraexaminer variability. *J Periodontol*. 2003 Dec;74(12):1736-40.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):1-6. Review.

Armitage GC, Jeffcoat MK, Chadwick DE, et al. Longitudinal evaluation of elastase as a marker for the progression of Periodontitis. *J Periodontol* 1994;65:120-8.

Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein the principle-dye binding. *Anal Biochem*. May 7;72:248-54.

Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*. 1982 Mar;78(3):206-9.

Buchmann R, Hasilik A, Nunn ME, Van Dyke TE, Lange DE. PMN responses in chronic periodontal disease: evaluation of gingival crevicular fluid enzymes and elastase-alpha-1-proteinase inhibitor complex. *J Clin Periodontol*. 2002; Jun;29(6):563-72.

Cao CF, Smith QT. Crevicular fluid myeloperoxidase at healthy, gingivitis and periodontitis sites. *J Clin Periodontol*. 1989 Jan;16(1):17-20.

Carlsson J. Salivary peroxidase: an important part of our defense against oxygen toxicity. *J Oral Pathol*. 1987 Sep;16(8):412-6.

Duncan C, Dougall H, Johnston P, et al. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. *Nat Med*. 1995 Jun;1(6):546-51.

Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol* 2000;71:1535-45.

Geiszt M, Witta J, Baffi J, Lekstrom K, Leto TL. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J*. 2003 Aug;17(11):1502-4. Epub 2003 Jun 3.

Gerson C, Sabater J, Scuri M, et al. The lactoperoxidase system functions in bacterial clearance of airways. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000 Jun;22(6):665-71.

Gomes DA, Pires JR, Zuza EP, et al. Myeloperoxidase as inflammatory marker of periodontaldisease: experimental study in rats. *Immunol Invest*. 2009;38(2):117-22.

Gonçalves D, Correa FO, Khalil NM, de Faria Oliveira OM, Orrico SR. The effect of non-surgical periodontal therapy on peroxidase activity in diabetic patients: a case-control pilot study. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(9):799-806. Epub 2008 Jul 22.

Güven Y, Satman I, Dinççağ N, Alptekin S. Salivary peroxidase activity in whole saliva of patients with insulin-dependent (type-1) diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*. 1996 Sep;23(9):879-81.

Hänström L, Johansson A, Carlsson J. Lactoperoxidase and thiocyanate protect cultured mammalian cells against hydrogen peroxide toxicity. *Med Biol*. 1983;61(5):268-74.

Henskens YMC, Van den Keijbus PAM, Veerman ECI, et al. Protein composition of whole and parotid saliva in healthy and periodontitis subjects. Determination of cystatins, albumin, amylase and IgA. *J Periodonl Res*. 1996;31:57-65.

Henskens YMC, Van der Velden U, Veerman ECL, Nieuw Amerongen AV. Protein, albumin and cystatin concentrations in saliva of healthy subjects and of patients with gingivitis or periodontitis. *J Periodont Res*. 1993 Jan;28(1):43-8.

Henskens YMC, Veerman ECI, Mantel MS, Van der Velden U, Nieuw Amerongen AV. Cystatins S and C in human whole saliva and in glandular salivas in periodontal health and disease. *J Dent Res*. 1994, Oct; 73(10):1606-14.

Hernández M, Gamonal J, Tervahartiala T, et al. Associations between matrix metalloproteinase-8 and -14 and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid from

subjects with progressive chronic periodontitis: a longitudinal study. *J Periodontol*. 2010 Nov;81(11):1644-52. Epub 2010 Jul 27.

Ihalin R, Loimaranta V, Tenovuo J. Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva. *Arch Biochem Biophys*. 2006 Jan 15;445(2):261-8. Epub 2005 Aug 2.

Ishihara Y, Nishihara T, Kuroyanagi T, et al. Gingival crevicular interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist levels in periodontally healthy and diseased sites. *J Periodontal Res*. 1997;32:524-9.

Iwamoto Y, Inoue M, Tsunemitsu A, Matsumura, T. Some Properties of the Salivary Antibacterial Factor (S. A.Factor). *Arch Oral Biol*. 1967 Aug;12(8):1009-12.

Jin LJ, Leung WK, Corbet EF, Söder B. Relationship of changes in interleukin-8 levels and granulocyte elastase activity in gingival crevicular fluid to subgingival periodontopathogens following non-surgical periodontal therapy in subjects with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2002;29:604-14.

Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva--a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(2):197-212.

Krause G, Kumar R, Meyers A, Prasad KN. Effect of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) on human nontumorigenic and tumorigenic parotid acinar cells in culture. *Cancer Lett*. 1996;108:73-9.

Lamster IB. Evaluation of components of gingival crevicular fluid as diagnostic tests. *Ann Periodontol*. 1997 Mar;2(1):123-37.

Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Mar;1098:216-29.

Lenox JA, Kopczyk RA. A clinical system for scoring a patients oral hygiene performance. *J Am Dent Assoc*. 1973 Apr;86(4):849-52.

Makinen KK, Tenovuo J. Chromatographic separation of human salivary peroxidases. *Acta Odontol Scand*. 1976;34(3):141-50.

Marcaccini AM, Meschiari CA, Zuardi LR, et al. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 2010 Feb;37(2):180-90. Epub 2009 Dec 7.

Miozza V, Borda E, S-Borda L, Busch L. Increase nitric oxide synthase activity in parotid glands from rats with experimental periodontitis. *Oral Dis*. 2010 Nov;16(8):801-6.

Miozza V, Sánchez G, Sterin-Borda L, Busch L. Enhancement of carbachol-induced amylase secretion in parotid glands from rats with experimental periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2011 Dec;56(12):1514-20. Epub 2011 Jul 8.

Nagler RM, Klein I, Zarzhevsky N, Drigues N, Reznick AZ. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radic Biol Med*. 2002 Feb 1;32(3):268-77.

Narumiya S, Sugimoto Y, Ushkubi F. Prostanoid receptors: structure, properties and functions. *Physiol Rev*. 1999;79:1193-226.

O'Brien PJ. Peroxidases. *Chem Biol Interact*. 2000 Dec 1;129(1-2):113-39.

Offenbacher S, Farr DH, Goodson JM. Measurement of Prostaglandin E in crevicular fluid. *J Clin Periodontol*. 1981;8:359-67.

Offenbacher S, Odle BM, Van Dyke TE. The use of crevicular fluid Prostaglandin E2 levels as a predictor of periodontal attachment loss. *J Periodont Res*. 1986;21:101-12.

Ohta Y, Kongo M, Kishikawa T. Melatonin exerts a therapeutic effect on cholestatic liver injury in rats with bile duct ligation. *J Pineal Res*. 2003 Mar;34(2):119-26.

O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. *J Periodontol*. 1972 Jan;43(1):38.

Oram JD, Reiter B. The Inhibition of Streptococci by Lactoperoxidase.Thiocyanate and Hydrogen Peroxide. The Oxidation of Thiocyanate and the Nature of Inhibitory Compound. *Biochem J*. 1966 Aug;100(2):382-8.

Ortiz GC, Rahemtulla B, Tsurudome SA, Chaves E, Rahemtulla F. Quantification of human myeloperoxidase in oral fluids. *Eur J Oral Sci*. 1997 Apr;105(2):143-52.

Oshima K, Takada K, Tsujimoto A. Prostaglandins synthesis by murine salivary glands. *Arch Oral Biol.* 1987;32:751–3.

Page RC. Milestones in periodontal research and the remaining critical issues. *J Periodont Res.* 1999; 34:331–39.

Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest.* 1976 Mar;34(3):235-49.

Pal T, Bhattacharyya AK. Cyclic changes in salivary lactate dehydrogenase, peroxidase and leucine aminopeptidase during menstrual cycle. *Indian J Exp Biol.* 1989 Aug;27(8):695-8.

Palcanis KG, Larjava IK, Wells BR, et al. Elastase as an indicator of periodontal disease progression. *J Periodontol.* 1992;63:237-42.

Perry DA, Schmid MA, Takei HH. Fase I da terapia Periodontal. In: Newman MA, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA, editores. *Periodontia Clínica*. 10a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007. p. 725.

Petrides PE. Molecular genetics of peroxidase deficiency. *J Mol Med (Berl).* 1998 Sep;76(10):688-98.

Pruitt KM. The salivary peroxidase system: thermodynamic, kinetic and antibacterial properties. *J Oral Pathol.* 1987;16:417-20.

Pruitt KM, Mansson-Rahemtulla B, Baldone DC, Rahemtulla F. Steady-state kinetics of thiocyanate oxidation catalyzed by human salivary peroxidase. *Biochemistry.* 1988 Jan 12;27(1):240-5.

Pruitt KM, Mansson-Rahemtulla B, Tenovuo J. Detection of the hypothiocyanite (OSCN-) ion in human parotid saliva and the effect of pH on OSCN- generation in the salivary peroxidase antimicrobial system. *Arch Oral Biol.* 1983;28(6):517-25.

Pruitt KM, Tenovuo J, Mansson-Rahemtulla B, Harrington P, Baldone DC. Is thiocyanate peroxidation at equilibrium in vivo? *Biochim Biophys Acta.* 1986 Apr 22;870(3):385-91.

Reinhardt RA, Masada MP, Kaldahl WB, et al. Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1993;20:225-31.

Riva A, Puxeddu P, del Fiacco M, Testa-Riva F. Ultrastructural localization of endogenous peroxidase in human parotid and submandibular glands. *J Anat*. 1978 Sep;127(Pt 1):181-91.

Rüdin HJ, Overdiek HF, Rateitschak KH. Correlation between sulcus fluid rate and clinical and histological inflammation of the marginal gingiva. *Helv Odontol Acta*. 1970 Apr;14(1):21-6.

Saxén L, Tenovuo J, Vilja P. Salivary defense mechanisms in juvenile periodontitis. *Acta Odontol Scand*. 1990 Dec;48(6):399-407.

Schiött CR, Löe H. The origin and variation in the number of leukocytes in the human saliva. *J Periodontal Res Suppl*. 1969;(4):24-6.

Sermon J, Vanoirbeek K, De Spiegeleer P, Van Houdt R, Aertsen A, Michiels CW. Unique stress response to the lactoperoxidase-thiocyanate enzyme system in *Escherichia coli*. *Res Microbiol*. 2005 Mar;156(2):225-32. Epub 2004 Dec 15.

Shannon LM, Kay E, Lew JY. Peroxidase Isozymes From Horse Radish roots. I. Isolation and physical properties. *J Biol Chem*. 1966 May 10;241(9):2166-72.

Shin K, Tomita M, Lonnerdal B. Identification of lactoperoxidase in mature human milk. *J Nutr Biochem*. 2000 Feb;11(2):94-102.

Smith AJ, Smith G, Basu MK, Walsh TF. Changes in salivary peroxidase activity observed during experimentally-induced gingivitis. *J Clin Periodontol*. 1984 Jul;11(6):373-8.

Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis*. 2004;10:311-8.

Taba M Jr, Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent Clin North Am*. 2005 Jul;49(3):551-71, vi.

Tenovuo J. Human saliva: clinical chemistry and microbiology. Vol 2. Boca Raton: CRC Press; p. 1989. Vol. 2, p 256.

Tenovuo J, Anttonen T, Knuuttila ML. Peroxidases of inflammatory exudate. Isolation, partial characterization and correlation with leukocytes. *J Periodontal Res.* 1978 Jan;13(1):60-7.

Tenovuo J, Larjava H. The protective effect of peroxidase and thiocyanate against hydrogen peroxide toxicity assessed by the uptake of [3H]-thymidine by human gingival fibroblasts cultured in vitro. *Arch Oral Biol.* 1984;29(6):445-51.

Tenovuo J, Makinen KK. Concentration of thiocyanate and ionizable iodine in saliva of smokers and nonsmokers. *J Dent Res.* 1976 Jul-Aug;55(4):661-3.

Tenovuo J, Pruitt K M. Relationship of the human salivary peroxidase system to oral health. *J Oral Pathol.* 1984 Dec;13(6):573-84.

Tenovuo J, Söderling E, Sievers G. The peroxidase system in human tears. In: Peters H, editor. *Protides of the biological fluids*. Oxford, UK: Pergamon Press; 1985. Vol. 32, p. 107-10.

Thomas EL. Lactoperoxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate: equilibria between oxidized forms of thiocyanate. *Biochemistry.* 1981 May 26;20(11):3273-80.

Thomas EL, Bates KP, Jefferson MM. Hypothiocyanite ion: detection of the antimicrobial agent in human saliva. *J Dent Res.* 1980 Sep;59(9):1466-72.

Thomas EL, Bates KP, Jefferson MM. Peroxidase antimicrobial system of human saliva: requirements for accumulation of hypothiocyanite. *J Dent Res.* 1981 Apr;60(4):785-96.

Thomas EL, Jefferson MM, Joyner RE, Cook GS, King CC. Leukocyte myeloperoxidase and salivary lactoperoxidase: identification and quantitation in human mixed saliva. *J Dent Res.* 1994 Feb;73(2):544-55.

Thomas EL, Learn DB, Jefferson MM, Weatherred W. Superoxide-dependent oxidation of extracellular reducing agents by isolated neutrophils. *J Biol Chem.* 1988 Feb 15;263(5):2178-86.

Ueda T, Sakamaki K, Kuroki T, Yano I, Nagata S. Molecular cloning and characterization of the chromosomal gene for human lactoperoxidase. *Eur J Biochem.* 1997 Jan 15;243(1-2):32-41.

van der Vliet A, Eiserich JP, Halliwell B, Cross CE. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem*. 1997 Mar 21;272(12):7617-25.

Van Haeringen NJ, Ensink FTE, Glasius E. The peroxidasethiocyanate-hydrogenperoxide system in tear fluid and saliva of different species. *Exp Eye Res*. 1979 Mar;28(3):343-7.

Wei PF, Ho KY, Ho YP, Wu YM, Yang YH, Tsai CC. The investigation of glutathione peroxidase, lactoferrin, myeloperoxidase and interleukin-1b in gingival crevicular fluid: implications for oxidative stress in human periodontal diseases. *J Periodontal Res*. 2004 Oct; 39(5):287-93.

Wolff LF, Smith QT, Snyder WK, et al. Relationship between lactate dehydrogenase and myeloperoxidase levels in human gingival crevicular fluid and clinical and microbial measurements. *J Clin Periodontol*. 1988 Feb;15(2):110-5.

Yamalik N, Caglayan F, Kilinc K, Kilinc A, Tumer C. The importance of data presentation regarding gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. *J Periodontol*. 2000 Mar;71(3):460-7.

Zhong Y, Slade GD, Beck JD, Offenbacher S. Gingival crevicular fluid interleukin-1beta, prostaglandin E2 and periodontal status in a community population. *J Clin Periodontol*. 2007;34:285-93.

Anexo A - Parecer do Comitê de Ética

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 52/2008

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NA SALIVA TOTAL DE PACIENTES PORTADORES DE PERIODONTITE CRÔNICA ANTES E APÓS TRATAMENTO PERIODONTAL**", de responsabilidade da Pesquisadora Rogéria Pereira Gonçalves e sob orientação dos Professores Doutores Francisco Emílio Pustiglioni, Marcelo Nicolas Muscará e Ana Vitória Imbroni.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 12 de maio de 2008.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

Anexo B - Adendo Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

DECLARAÇÃO

Protocolo 52/08

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e aceitou o adendo referente à inclusão das coletas de saliva e fluido do sulco gengival e a mudança do título da pesquisa para: **"AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES FUMANTES E NÃO FUMANTES PORTADORES DE PERIODONTITE CRÔNICA ANTES E APÓS TRATAMENTO PERIODONTAL"**, de responsabilidade da Pesquisadora Rogéria Pereira Gonçalves, sob orientação do(a) Professor(a) Doutor(a) Prof. Dr. Francisco Emílio Pustiglioni.

São Paulo, 15 de junho de 2009.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador

Anexo D - Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Avaliação da biomarcadores de estresse oxidativo de pacientes portadores de periodontite crônica antes e após tratamento periodontal

As informações abaixo são para esclarecer e pedir sua participação voluntária neste estudo que tem por finalidade avaliar componentes (MPO, PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA, ARGINASE) que estão presentes na sua saliva total, saliva parótida e Fluido do Sulco Gengival.

Esta substâncias tem grande participação na doença periodontal que o(a) Sr.(a) apresenta, sua colaboração será de grande valia para a pesquisa e além disso o(a) Sr.(a) terá como benefício todo o tratamento periodontal que necessita e sem correr risco algum.

Primeiramente iremos coletar uma pequena quantidade (5mL) de sua saliva total e da parótida e fluido do sulco gengival. Daremos inicio ao tratamento periodontal, depois de um mês de finalizado iremos coletar a mesma quantidade de sua saliva para uma nova avaliação para verificar se houve ou não na quantidade dos componentes avaliados.

A coleta da saliva consiste em apenas cuspir em um recipiente, para a coleta da saliva da parótida usaremos um pequeno aparelho que coletará este fluido em sua boca, já para a coleta do fluido é feita simplesmente com a penetração de uma tira de papel entre sua gengiva e dente. O exame periodontal e a coleta com a tira podem gerar um leve desconforto.

- Participando desta pesquisa o(a) Sr. não terá despesa alguma em relação ao tratamento periodontal;
- Sua identidade será mantida e sigilo e os dados levantados serão direcionados á apenas esta pesquisa;
- Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Avenida Lineu Prestes 2227, 05508-000 São Paulo)
- Qualquer dúvida em relação ao andamento desta pesquisa contacte Rogéria Pereira Gonçalves no telefone (11) 77473372;
- Poderá desistir de participar da pesquisa ou poderá desistir dela a qualquer momento, sem qualquer penalidade ou perda dos benefícios aos quais já tinha direito;

“Após ler essas informações e ter minhas dúvidas esclarecidas suficientemente pelo pesquisador concordo em participar de forma voluntária neste estudo.”

São Paulo,/2010

Assinatura Paciente

.....
Assinatura Responsável

Nome: Tel:
Endereço:nocompto.....
Bairro: CEP: UF: RG:
Nome Responsável:

Anexo E- Periograma

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA
DISCIPLINAS DE PERIODONTIA

PACIENTE: _____ Nº: _____

IDADE: _____ SEXO: _____ RAÇA: _____ DATA DO EXAME: ____/____/____

FICHA INICIAL () REAVALIAÇÃO () FINAL ()

UEC – MG
PCS – SS
NCI

VESTIBULAR

PALATINA

UEC – MG
PCS – SS
NCI

UEC – MG
PCS – SS
NCI

LINGUAL

VESTIBULAR

UEC – MG
PCS – SS
NCI

Índice de
Sangramento: ____%

PSR