***AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO-
SINTASE INDUZÍVEL (iNOS) EM GENGIVITES ASSOCIADAS À
PLACA DENTOBACTERIANA E PERIODONTITES CRÔNICAS
LOCALIZADAS***

ALINE CARVALHO BATISTA

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Bauru, Universidade de
São Paulo, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Odontologia, área de Patologia Bucal.*

(Edição Revisada)

BAURU

2001

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO-
SINTASE INDUZÍVEL (iNOS) EM GENGIVITES ASSOCIADAS À
PLACA DENTOBACTERIANA E PERIODONTITES CRÔNICAS
LOCALIZADAS**

ALINE CARVALHO BATISTA

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Bauru, Universidade de
São Paulo, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Odontologia, área de Patologia Bucal.*

(Edição Revisada)

Orientadora:

Profa. Dra. Vanessa Soares Lara

BAURU

2001

Batista, Aline Carvalho

B321a

Avaliação da expressão da enzima óxido nítrico-sintase induzível (iNOS) em gengivites associadas à placa bacteriana e periodontites crônicas localizadas / Aline Carvalho Batista - - Bauru, 2001.

90p. : il.; 30cm.

Dissertação (Mestrado) - - Faculdade de Odontologia de Bauru. USP.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Soares Lara

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Bauru, 26 de novembro de 2001

Projeto de Pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru na reunião do dia 13 de março de 2001.

ALINE CARVALHO BATISTA

<i>Nascimento</i>	<i>12 de setembro de 1975</i>
<i>1994 - 1997</i>	<i>Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade do Sagrado Coração de Bauru – S.P.</i>
<i>1998 - 1999</i>	<i>Curso de Extensão Universitária em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial na Universidade do Sagrado Coração de Bauru – S.P.</i>
<i>2000 - 2001</i>	<i>Mestrado em Odontologia, Área de Patologia Bucal, na Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.</i>
<i>Associações</i>	<i>SOBE – Sociedade Brasileira de Estomatologia.</i> <i>SBP – Sociedade Brasileira de Patologia.</i>

Dedico este trabalho a meu pai e a minha querida mãe, exemplos de amor, dedicação, luta, honestidade e perseverança. Por estarem sempre ao meu lado, em todas as situações, incentivando, apoiando e amparando-me com suas palavras e preces.

A Deus, pela vida e por colocar no meu caminho pessoas sábias, capacitadas, inteligentes que muito me ensinaram e prepararam, e foram ao mesmo tempo companheiras, generosas e amigas.

“...Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar uma alma. E começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança. Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida.

Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa, por isso sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pode ser a última vez que as vejamos.

Descobre que se leva muito tempo para tornar-se a pessoa que se quer ser, e que o tempo é curto. Aprende que não importa aonde já chegou, mas onde está indo. Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as consequências.

Aprende que paciência requer muita prática.

Descobre que algumas vezes a pessoa que você espera que o chute quando você cai é uma das poucas que o ajuda a levantar-se. Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas, do que com quantos aniversários você já celebrou. Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha. Aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens. Aprende que o mundo não pára para que você o conserte. Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás.

Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar...

Que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais.

E que realmente a vida tem valor.

E que você tem valor diante da vida...”

Willian Shakespeare

Nossa vida é como um livro em branco onde, em cada página, estaremos escrevendo a nossa história.

Vivemos derrotas, esforços, lutas, desafios, vitórias, méritos e medos que são superados ou comemorados com as pessoas que estão ao nosso lado.

Gostaria de dividir o que conquistei com pessoas muito especiais que confiaram, investiram e acreditaram em mim. Deram-me esperança e asas para voar. E assim agradecer imensamente todos que tive o privilégio de conviver estes anos...

*À minha orientadora Professora Doutora Vanessa Soares Lara,
Responsável pelo meu crescimento profissional e pelas minhas conquistas. Agradeço a confiança, o apoio, o incentivo, as oportunidades proporcionadas e a amizade. Nesta convivência muitas sementes foram espalhadas e muitos frutos ainda serão colhidos. Obrigada por tudo.*

Ao Professor Doutor Hugo Nary Filho, exemplo de luta e generosidade, pelo constante incentivo, apoio e amizade. Obrigado por ter acreditado em mim.

Aos professores da Disciplina de Patologia de Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo:

Professor Doutor Alberto Consolaro, exemplo de dedicação ao ensino e pesquisa, por tudo aquilo que tem me ensinado, pela confiança e pelas oportunidades que me proporcionou.

Professor Doutor Luís Antônio de Assis Taveira e Professora Doutora Denise Tostes de Oliveira pelo estímulo, incentivo e alegre convivência.

Aos funcionários da Disciplina de Patologia de Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo:

Bernadete, por se preocupar sempre comigo, minha mãezinha...

Cristina, por ser essa pessoa tão linda, dedicada e generosa....

Fatiminha, pela amizade e força nos momentos difíceis...

Sr Valdir, pelo carinho e dedicação... minha eterna gratidão.

Aos colegas da Pós-graduação em Patologia Bucal Tânia, Simone, Sandra, Braz, Daniel, Jussara, Telma, Laurindo e Tarcília,

À Simone, pelo carinho e companheirismo,

À Tânia, exemplo de bondade e luta, pelos ensinamentos de vida e pela ajuda e apoio “nunca” negados,

À Tarcília, pela amizade, apoio, sugestões e contribuições no decorrer do referido trabalho. Obrigado pelo desprendimento para a realização deste trabalho e pelos valiosos ensinamentos,

Às coleguinhas Camila e Carol, obrigada por tudo!!!

Aos novos colegas Rosário, Álica, Lídia, Rosa e Valdomiro, que tornaram o Departamento mais alegre...

Aos verdadeiros amigos, vocês estarão sempre no meu coração. Haverá sempre uma doce lembrança das dificuldades, lutas, bons e alegres momentos que passamos juntos.

Aos meus irmãos Micheline, Caroline e Luiz Antônio, pela eterna torcida...

Ao meu avô Lorico (in memorian), aos meus tios e tias e a minha avó Dica que mesmo distantes estão sempre vibrando com minhas vitórias...

Ao Otávio Teodoro Martins (in memorian), pelos momentos alegres...

À Dona Edilza por sua luz, pelas orações e constante apoio...

Aos meus grandes amigos Danielinha, Juliane, Alessandra, Daniela Gouveia, Tatiana, Raquel, Liziane, Carla, Etyenne, Mariana, Izabel Cristina, Ruth, Ana Carla, Cláudia, Jaqueline e Serginho, irmãos que a vida me deu, e por isso tão valiosos...

À Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Universidade do Coração - USC e aos professores Aparício Dekon, Roberto Kawakami, Luis Eduardo Padovan,

Mariza Matsumoto, Paulo Domingos, Ricardo Falcão e Eduardo Gonçalves, agradeço pela colaboração e valiosa amizade,

Ao Departamento de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru- FOB-USP, aos professores e aos pós graduandos Fábio Luís, Flávio Seabra, Marinelle, Renata Freitas, Pedro, Daniel, Elonice e Luciana Gentile pela contribuição. Muito obrigado!!!

Ao Professor Doutor José Roberto Pereira Lauris do Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, pelo valioso auxílio nas análises estatísticas deste trabalho...

À funcionária Ivânia, do Departamento de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, pelo empenho e colaboração.

Ao funcionário André, da Disciplina de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, sempre pronto a ajudar,

Ao Departamento de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, aos professores e funcionários, pelos inúmeros auxílios prestados,

Aos funcionários da biblioteca Cybele, Rita, César e demais funcionários, pela paciência e dedicação,

Ao Aurélio e Gianne da pós-graduação que estão sempre com um sorriso no rosto e prontos para ajudar.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	<i>xi</i>
RESUMO	<i>xiv</i>
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	6
3 PROPOSIÇÃO	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Seleção e caracterização da amostragem	25
4.2 Técnica Imuno-histoquímica	28
4.3 Análise Subjetiva	31
4.4 Análises Quantitativas	31
4.4.1 Contagem de Células por mm ²	31
4.4.2 Frequência Relativa (Porcentagem)	32
4.5 Análise Estatística	33
5 RESULTADOS	34
5.1 Análise Subjetiva	35
5.2 Análises Quantitativas	53
5.2.1 Contagem de Células por mm ²	53
5.2.2 Frequência Relativa (Porcentagem)	56
6 DISCUSSÃO	62
6.1 Do Título do Trabalho	63
6.2 Da Metodologia	65

6.3	<i>Dos Resultados</i>	65
7	<i>CONCLUSÕES</i>	76
	<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	78
	<i>ABSTRACT</i>	93
	<i>APÊNDICE</i>	

LISTA DE ABREVIATURAS

mm	<i>Micrometer</i> <i>Micrometro</i>
bFGF ou FGF-2	<i>Basic fibroblast growth factor</i> <i>Fator de crescimento fibroblástico básico</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> <i>Soro-albumina bovina</i>
DAB	<i>Diaminobenzidine</i> <i>Diaminobenzidina</i>
HE	<i>Haematoxilin eosin</i> <i>Hematoxilina e eosina</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IL	<i>Interleukin</i> <i>Interleucina</i>
L-NMMA	<i>N^ε-monometil – L – arginina</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i> <i>Lipopolissacarídeo</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> <i>Complexo maior de histocompatibilidade</i>

mm²	<i>Square milimetre</i> <i>Milímetro quadrado</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> <i>Matriz metaloproteinase</i>
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i> <i>Ácido ribonucléico mensageiro</i>
NO	<i>Nitric oxide</i> <i>Óxido nítrico</i>
NO₂⁻	<i>Nitrite</i> <i>Nitrato</i>
NO₃⁻	<i>Nitrate</i> <i>Nitrato</i>
NOS	<i>Nitric oxide sintase</i> <i>Óxido nítrico sintase</i>
NOSc ou cNOS	<i>Nitric oxide sintase constitutive</i> <i>Óxido nítrico sintase constitutível</i>
NOSi ou iNOS	<i>Nitric oxide sintase inducible</i> <i>Óxido nítrico sintase induzível</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> <i>Moléculas reativas do oxigênio</i>

RT-PCR

*Reverse transcription – polymerase chain
reaction*

TNF

*Tumor necrosis factor
Fator de necrose tumoral*

RESUMO

RESUMO

Na doença periodontal associada à placa dentobacteriana, produtos bacterianos difundem-se através dos tecidos periodontais, induzindo mecanismos de defesa não específicos e específicos, com síntese de vários mediadores pró-inflamatórios, incluindo o óxido nítrico (NO). A enzima responsável pela produção de NO, a NO sintase (NOS), foi identificada em vários tipos celulares e possui ação direta sobre o metabolismo ósseo, bem como sobre fenômenos destrutivos teciduais e imunopatológicos. Com o objetivo de analisar a presença de NO na doença periodontal, realizamos um estudo quantitativo geral e proporcional com análise estatística de células iNOS positivas em amostras de tecidos gengivais clinicamente saudáveis, gengivites associadas à placa dentobacteriana e periodontites crônicas localizadas, através da técnica imuno-histoquímica. Significante aumento do número de células iNOS positivas por mm² foi observado em amostras de gengivites e periodontites, comparadas ao grupo controle. Em todos os grupos, a maioria das células iNOS positivas eram mononucleares apresentando fraca a moderada imunorreatividade. Por outro lado, as células polimorfonucleares iNOS positivas demonstraram intensa imunomarcção, independente do estágio da doença, e apenas a porcentagem de células polimorfonucleares iNOS positivas apresentaram significativo aumento comparada àquela do grupo controle. Nossos resultados indicam que, nos tecidos periodontais, o NO aumenta na presença de doença inflamatória. Neste contexto, o NO pode estar associado com a regulação da destruição

tecidual e reabsorção óssea ou ainda com fenômenos imunopatológicos. Nossos resultados indicam também uma via adicional de ativação nas células inflamatórias na doença periodontal, em especial os polimorfonucleares neutrófilos, que expressam iNOS significativamente, provavelmente representando uma importante origem de óxido nítrico nesta doença.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As doenças periodontais associadas à placa dentobacteriana são lesões inflamatórias crônicas que podem afetar apenas o tecido gengival ou todo o tecido periodontal de suporte, levando assim a perda do dente. O seu agente etiológico primário é a placa dentobacteriana; várias espécies bacterianas residem neste biofilme microbiano formado na superfície dentária, dentre elas: Porphyromonas gingivalis, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides forsythus, Prevotella intermedia, Campylobacter rectus, Eubacterium nodatum, Treponema denticola, Streptococcus intermedia, Prevotella nigrescens, Peptostreptococcus micros, Fusobacterium nucleatum e Eikenella corrodens²⁴. Os componentes e produtos bacterianos agredem o tecido periodontal adjacente, induzindo a formação de um infiltrado inflamatório intenso, com predominância de polimorfonucleares neutrófilos (PMNs), plasmócitos, linfócitos e macrófagos, bem como síntese, secreção e ativação de uma série de mediadores químicos pró-inflamatórios como interleucina (IL)-1, fator de necrose tumoral (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e óxido nítrico (NO)^{6,10,38,57}.

O NO é um radical livre produzido a partir do aminoácido L-arginina através da ação de isoenzimas, globalmente denominadas NO sintases (NOS). Três diferentes isoformas são conhecidas: NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (bNOS) e NOS induzível (iNOS). A eNOS e bNOS são constitutivas ou basais (cNOS) e produzem baixas concentrações de NO por

um curto período de tempo. Entretanto, a iNOS, identificada em vários tipos celulares como macrófagos e PMNs, é expressa em resposta a estímulos inflamatórios, tais como IL-1, TNF- α , IFN- γ e lipopolissacarídeos (LPS), sendo produzida em altas quantidades e por longo período de tempo⁴⁰. Quando o NO é localmente produzido em altas concentrações, pode agir como molécula citotóxica ou citotástica contra células infectadas por fungos, bactérias, protozoários, bem como células tumorais e células próximas à região de produção de NO^{44,46}, podendo resultar em extensa destruição tecidual⁴⁰.

O NO possui também importante participação na regulação da resposta imune e do metabolismo ósseo, agindo diretamente sobre células clásticas^{15,22,54,73,74}. A presença deste gás na doença periodontal pode refletir a participação de um mediador adicional na regulação da reabsorção óssea responsável pela progressão da doença.

No microambiente da doença periodontal, a presença de estímulos inflamatórios capazes de induzir a produção de NO por células inflamatórias é bem estabelecida^{38,74,96,97}. A presença de altas quantidades de L-arginina e L-citrulina em tecido gengival inflamado *in vivo*⁵⁷ e a expressão de iNOS em macrófagos, linfócitos e PMNs em periodontites induzidas experimentalmente em ratos⁵², bem como em fibroblastos, células epiteliais⁴¹, macrófagos e células endoteliais em periodontite humana⁴⁷, revelam a possível participação do NO na doença periodontal.

Este gás parece desempenhar um papel benéfico, bem como destrutivo, na doença periodontal. Dentre os efeitos benéficos podemos incluir atividade microbicida³ e a modulação da resposta imune⁴⁴. Por outro

lado, podem ocorrer efeitos destrutivos como a ação citotóxica nos tecidos adjacentes, incluindo osso alveolar^{40,51}. Esta citotoxicidade mediada por NO pode ocorrer em combinação com a sua capacidade de ativação de metaloproteinases liberadas por macrófagos ativados, PMNs e fibroblastos residentes^{40,44,61,66,68}.

Apesar de vários autores ressaltarem a importância da participação do NO na doença periodontal^{3,38,41,47,52,57}, sua função na patogênese desta doença, se fundamental na eliminação bacteriana ou se contribui para a destruição tecidual ou ambos, permanece desconhecida. Em tecidos humanos, poucos autores estudaram NO na doença periodontal, entre eles MATEJKA et al.⁵⁷ que descreveram níveis significativamente elevados de substratos de NOS, L-arginina e L-citrulina, em amostras de tecido gengival inflamado, comparadas com controles, e KENDALL et al.⁴¹, LAPPIN et al.⁴⁷ e HIROSE et al.³⁸ que observaram maior expressão de iNOS em amostras de periodontite em relação à mucosa gengival clinicamente saudável. Ainda não foi realizada uma análise quantitativa das diferentes células iNOS positivas (iNOS) nos diferentes estágios da doença periodontal humana, considerando principalmente a presença ou não de reabsorção óssea associada.

Neste estudo, nosso objetivo foi identificar e quantificar a expressão de iNOS em amostras de gengivites associadas à placa dentobacteriana e periodontites crônicas localizadas, através da técnica imuno-histoquímica do tipo imunoperoxidase, relacionando esta molécula com a regulação da reabsorção óssea e destruição tecidual durante a

progressão da doença periodontal, bem como com fenômenos imunopatológicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

A patogenia das doenças periodontais envolve mecanismos imunopatológicos e inflamatórios contra microorganismos bucais colonizadores da superfície da placa dentobacteriana, dentre eles: *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Streptococcus intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum* e *Eikenella corrodens*²⁴. Além do fator essencial, ou seja a placa dentobacteriana, é importante a participação de fatores de risco adquiridos do hospedeiro, como os hormonais, genéticos ou o fumo, para a instalação e progressão da doença³⁵. Esses fatores de risco atuam no metabolismo dos tecidos periodontais, alteram a função leucocitária e a produção e atuação dos anticorpos, deixando o periodonto mais ou menos vulnerável à ação da placa dentobacteriana⁷⁰.

Doença periodontal associada à placa dentobacteriana, a mais freqüente causa de perda dentária em adultos, caracteriza-se por destruição do ligamento periodontal, perda da crista óssea alveolar, migração apical do epitélio e formação de bolsa periodontal^{50,67}. Embora a presença de periodontopatógenos seja um pré-requisito, a progressão da doença é dependente do tipo de resposta do hospedeiro contra estes microorganismos que colonizam a superfície dentária³¹. Os produtos bacterianos iniciam uma resposta local que envolve a geração de prostaglandinas e citocinas,

responsáveis pelo recrutamento de células inflamatórias, liberação de enzimas proteolíticas e ativação dos clastos^{6,68}.

Na doença periodontal humana, a destruição tecidual está relacionada a mecanismos dependentes e independentes da inflamação, embora a maioria dos microorganismos gere reação inflamatória. A colonização e proliferação de microorganismos no interior do sulco gengival resultam em liberação de citocinas e outros mediadores químicos, bem como em destruição tecidual devido à liberação de produtos como LPS e enzimas que atuam diretamente sobre populações celulares residentes e migrantes^{10,97}. As células-alvo destes mediadores não são apenas células inflamatórias como leucócitos PMNs e macrófagos, mas também fibroblastos, células epiteliais juncionais e da bolsa, células endoteliais e possivelmente osteoblastos que revestem superfícies ósseas nas áreas afetadas¹⁰.

A gengivite associada à placa dentobacteriana tem sido considerada a forma mais comum de doença periodontal, sendo caracterizada por uma inflamação restrita ao tecido gengival que pode ter seu contorno aumentado devido ao edema ou fibrose, mas possui um possível papel como precursora da perda de inserção conjuntiva e reabsorção óssea^{5,55}. Microscopicamente, a gengivite associada à placa dentobacteriana caracteriza-se por uma lesão precoce ou estabelecida, onde uma infiltração inicial de neutrófilos é sucedida por uma grande infiltração progressiva de linfócitos^{67,71}. Segundo PAGE; SCHROEDER⁷¹, durante a passagem de gengivite (lesão estabelecida) para periodontite (lesão avançada) pode ser observado um predomínio de plasmócitos e neutrófilos no infiltrado inflamatório local.

Além da infiltração inflamatória, outros eventos biológicos ocorrem na gengivite tais como: início da proliferação do epitélio juncional, aumento dos vasos sanguíneos adjacentes a este epitélio e destruição das fibras colágenas^{67, 71}.

A periodontite crônica, diferentemente da gengivite, caracteriza-se por perda da inserção conjuntiva e de osso alveolar, pela presença de bolsa periodontal instalada e inflamação gengival crônica²⁴. A periodontite crônica é a mais freqüente forma de periodontite, ocorre em qualquer idade, mas é detectada comumente em adultos⁵. Pode ser classificada, de acordo com sua extensão, em localizada, quando o número de regiões envolvidas for menor ou igual a 30%, e generalizada, quando for maior ou igual a 30%. De acordo com a severidade, a periodontite crônica pode ainda ser leve, quando a perda de inserção conjuntiva for entre 1 e 2mm, moderada, entre 3 e 4mm, e severa, acima ou igual a 5mm²⁴. A destruição do tecido conjuntivo na doença periodontal avançada ocorre principalmente pela liberação e secreção de citocinas e enzimas proteolíticas pelos macrófagos, linfócitos e PMNs, dentre outras células^{10,69,71,83}.

A progressão da doença periodontal está diretamente relacionada com a persistência da placa dentobacteriana, com o recrutamento de células inflamatórias, produção de citocinas, imunorregulação, diferenciação de clastos e conseqüente perda óssea⁶. ASSUMA et al.⁶, através de um modelo de periodontite experimental em primatas, observaram que inicialmente o número de células inflamatórias no tecido conjuntivo superficial próximo ao epitélio era relativamente alto e não havia presença de células inflamatórias

próximas ao tecido ósseo, o que é consistente com inflamação crônica tipicamente encontrada na gengivite. Nas avaliações seguintes, após 2, 4 e 6 semanas, houve um grande aumento do número de células inflamatórias tanto no tecido conjuntivo superficial, como próximo ao osso e ligamento periodontal, além da diferenciação de clastos e perda óssea. As principais células verificadas no último período avaliado foram PMNs, macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Todavia, os tecidos acometidos pela doença periodontal também abrigam células residentes, como por exemplo os mastócitos, que possuem um considerável potencial destrutivo, o qual não se limita desta maneira às células migrantes tradicionalmente presentes durante a progressão desta doença^{10,33,92}.

As células imunes e inflamatórias presentes na doença periodontal são constantemente estimuladas por componentes microbianos, especialmente LPS e, frente a estes estímulos, sintetizam diversas citocinas pró-inflamatórias e imunorreguladoras como TNF- α , IL-1 α e β , INF- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-13^{13,29,30,39,56,68,96}. Tais citocinas, associadas ao LPS, são responsáveis pela perpetuação do processo inflamatório e iniciação, progressão e modulação da resposta imune presente na doença periodontal humana²⁹.

Em níveis aumentados na doença periodontal, as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 α e IL-1 β ^{21,58,79} participam na regulação da imunidade inata¹, no recrutamento de células inflamatórias^{10,20,54,63}, na diferenciação e proliferação de clastos^{6,84}, bem como atuam efetivamente na patogênese da doença periodontal estimulando a reabsorção óssea alveolar^{6,96}.

Além de citocinas pró-inflamatórias, diversas citocinas imunorreguladoras como o IFN- γ , a IL-2, IL-4, IL-10 e IL-13 são sintetizadas, durante a doença periodontal crônica, por linfócitos T, células Natural Killer (NK) e macrófagos; tais citocinas modulam a resposta imune e contribuem para a progressão da periodontite⁹⁶.

É bem estabelecido que células T helper tipo 1 (Th1) sintetizam IL-2 e IFN- γ que agem na ativação de células T citotóxicas e macrófagos que, por sua vez, através de um mecanismo de feed-back positivo, estimulam a proliferação e diferenciação de células Th1^{1,29}. Por outro lado, as células T helper tipo 2 (Th2) sintetizam IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13 que atuam na supressão da ativação de macrófagos, estimulam a produção de imunoglobulinas por plasmócitos (principalmente IgG e IgE) e estimulam a proliferação de células Th2^{1,29}. Na doença periodontal humana, alguns autores observaram o predomínio da resposta imune Th2 sobre a resposta Th1^{29,30,75,98,99}, com baixos níveis de IL-2 e IFN- γ ²⁹, e maior expressão de IL-4⁹⁹, IL-6, IL-10 e IL-13^{30,38,98,99}, bem como altos níveis de IgG em sítios de periodontite ativa^{64,75}. Evidenciou-se, ainda, maior proporção de linfócitos B e plasmócitos em relação aos linfócitos T^{30,65,80,81,99}, predomínio de linfócitos T helper (CD4⁺) sobre os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺)^{30,99} e deficiência no recrutamento e ativação de macrófagos¹⁶. Em conjunto, estes dados sugerem a ativação e participação da resposta imune via células Th2 no desenvolvimento e progressão da doença periodontal humana^{30,80,81,99}.

Em contraste, elevada expressão de resposta Th1 com importante produção de IFN- γ foi observada em lesões periodontais crônicas avançadas,

quando comparadas com amostras controles de tecido gengival clinicamente saudável⁶⁵. Possivelmente, a expressão de determinadas citocinas, como o IFN- γ , varia nos diferentes estágios e formas de periodontite, podendo resultar em alternâncias entre resposta imune Th1 e Th2 durante a progressão desta doença. Embora extensivamente estudados, os fenômenos imunorregulatórios envolvidos na patogênese da doença periodontal ainda não estão completamente elucidados, permanecendo inúmeras divergências.

No microambiente da doença periodontal, além da presença de diversas citocinas, tem sido observada a produção de NO, o qual age diretamente na manutenção e progressão da inflamação, bem como na destruição tecidual. As citocinas inflamatórias, como IL-1 α e β , TNF- α , IL-6 e IFN- γ , são potentes estimuladores da produção de NO que, por sua vez, atua sobre o metabolismo de diversas células^{15,53,74,89}. A ação sinérgica de citocinas inflamatórias com LPS é muito mais potente quanto à estimulação da produção de NO, do que citocinas e LPS atuando isoladamente^{53,74,86}.

O LPS de importantes periodontopatógenos como de *Porphyromonas gingivalis*, de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e de *Treponema denticola* são capazes de estimular macrófagos murinos a produzir NO *in vitro*^{12,26,77,83}, aumentando a produção deste gás em 20 a 30 vezes, comparativamente ao controle²⁶. Adicionalmente, a capacidade dos PMNs humanos de expressar iNOS, bem como de sintetizar e secretar NO, foi evidenciada *in vivo* e *in vitro* a partir de amostras de lesões periapicais inflamatórias crônicas e de exsudatos inflamatórios coletados de sítios com reabsorção óssea e inflamação crônica⁸⁶.

Por muitos anos, o NO foi considerado apenas um poluente ambiental; as primeiras evidências da síntese deste gás em mamíferos foram em 1978 e 1981 por TANNENBAUM et al.⁸⁷ e GREEN et al.³², respectivamente. Estes autores observaram que a quantidade de nitrato e nitrito, presente na urina e outras secreções de pacientes saudáveis, foi quatro vezes maior que a quantidade ingerida destas moléculas e, assim, sugeriram que nitrito e nitrato eram sintetizados de forma endógena em humanos^{32,87}. Os achados de TANNENBAUM⁸⁷ e GREEN³² foram confirmados em 1985 por STUEHR e MARLETTA⁸⁵ que demonstraram produção, por macrófagos de ratos, de nitrito e nitrato em resposta a LPS de *Escherichia coli*.

Em sequência, um estudo realizado por HIBBS et al.³⁶, em 1987, demonstrou que macrófagos murinos ativados sintetizam L-citrulina e nitrito na presença de L-arginina e, no ano seguinte, estes mesmos autores evidenciaram que macrófagos murinos ativados por LPS sintetizam NO e que esta molécula é precursora de moléculas estáveis como nitrito e nitrato³⁷. Simultaneamente, PALMER; FERRIGE; MONCADA⁷² demonstraram experimentalmente a liberação de NO por células endoteliais e a participação desta molécula em atividades biológicas tal como o relaxamento aórtico de ratos⁷². O NO foi considerado “a molécula do ano” em 1992, pela revista “Science”^{17,45} e foi definitivamente reconhecido como um importante mediador biológico, participando de fenômenos inflamatórios e imunológicos⁶².

A molécula NO constitui um radical livre sintetizado na presença de O₂ a partir do aminoácido L-arginina, que é convertido em L-citrulina e NO por um grupo de isoenzimas, coletivamente chamadas NO sintases (NOS). As

NOS existem como três isoformas diferentes, denominadas NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (bNOS) e NOS induzível (iNOS). A iNOS é expressa em resposta aos estímulos inflamatórios como o LPS, IL-1, TNF α , TNF β e IFN γ , principalmente por ação sinérgica, produzindo NO por longo período de tempo^{15,38,83}.

O NO pode ser inibido por L-N⁶ arginina monometil (L-NMMA), L-metil arginina (L-NAME) e aminoguanidina e, em meio aeróbio, espontaneamente sofre oxidação convertendo-se em moléculas estáveis como o nitrato (NO₃⁻) e nitrito (NO₂⁻). Estes metabólitos são observados em fluidos biológicos como plasma, urina e fluido sinovial^{22,32,43}. Porém, o NO pode reagir com moléculas de oxigênio ou com outras biomoléculas, originando compostos citotóxicos como o peroxinitrito (ONOO⁻), o qual tem sido considerado mais tóxico do que seu precursor NO^{40,44,66}.

A síntese de NO tem sido observada em macrófagos^{12,26,49,83}, bem como em outras células como neutrófilos^{23,66,86,93}, linfócitos T helper⁸⁹, fibroblastos^{41,27}, células epiteliais^{4,78}, osteoclastos²⁵, osteoblastos^{25,53}, condrócitos^{11,53}, células de Langerhans⁷⁸, células endoteliais^{47,76} e, recentemente, em mastócitos^{9,42}, podendo ter vários efeitos dependendo do tipo de célula que produz, do sítio de liberação e da concentração produzida^{59, 60}.

Todavia, a detecção de NO por macrófagos humanos não está completamente estabelecida, demonstrando discretos níveis de NO por estas células estimuladas com citocinas *in vitro* quando comparadas com macrófagos de ratos^{19,95}.

O NO é um gás capaz de percorrer livremente dentro da célula, através da membrana celular e entre as células, estando envolvido na comunicação intracelular e intercelular, sendo capaz de se difundir mantendo seu potencial de ação^{40,45}. Ao contrário de outros mensageiros intercelulares, o NO não se liga a receptores e sua meia-vida corresponde a segundos, sendo que seus efeitos são transitórios e locais⁴⁰. No entanto, estudo *in vitro* observou a produção de NO em cultura de osteoblastos, bem como de macrófagos de ratos, estimulados por citocinas e LPS, por até 72 horas após a estimulação^{26,53}.

Dentre as funções do NO, observa-se a manutenção da homeostasia tecidual, incluindo vasodilatação, neurotransmissão e inibição da agregação e adesão plaquetárias⁴⁰. O NO também apresenta importante função na resposta de defesa, podendo atuar como molécula citotóxica frente a fungos, bactérias, protozoários, bem como células tumorais e células próximas do sítio de produção⁶⁰. Esta função deve-se à sua capacidade de inibição da atividade enzimática intracelular, como por exemplo enzimas envolvidas com a respiração mitocondrial e síntese de DNA^{37,40,43,44}. Tais efeitos do NO parecem ser devido à sua ligação com grupamentos ferro-sulfur das enzimas^{37,44}. Além disso, o NO é capaz de mediar dano no DNA e morte celular via apoptose, induzindo fragmentação de DNA¹¹.

Adicionalmente, o NO atua sobre células ósseas possuindo significativo efeito na modulação da reabsorção óssea²². Em condições patológicas, incluindo a doença periodontal, o NO atua sobre células das linhagens osteoblástica e osteoclástica, funcionando como um sinal parácrino

e autócrino na modulação do metabolismo ósseo, com efeitos bifásicos de sua produção sobre a reabsorção óssea^{22,15,74}. Estudos *in vitro* demonstraram que IL-1, TNF- α e INF- γ são potentes estimuladores da produção de NO e altas concentrações desta molécula inibem o metabolismo ósseo local, suprimindo a reabsorção óssea; em contraposição, NO em baixas a moderadas concentrações potencializa a atividade clástica e conseqüente reabsorção óssea local^{15,22,53,74}.

A geração de radicais livres derivados do oxigênio (ROS), particularmente superóxido (O_2^-), está associada com a formação de novos osteoclastos e com o aumento da reabsorção óssea *in vitro* e *in vivo*²⁸. O superóxido em combinação com NO originará um composto altamente tóxico denominado peroxinitrito, o qual está associado com o aumento da reabsorção óssea alveolar em modelo experimental de periodontite em ratos⁵².

O NO é um importante mediador citotóxico no microambiente ósseo e, juntamente com citocinas e fatores de crescimento, pode ser responsável pela deficiente formação óssea observada em sítios inflamatórios crônicos, visto que concentrações elevadas de NO possuem um efeito citotóxico significativo sobre células da linhagem osteoblástica¹⁸.

Dessa forma, fica claro que o NO apresenta uma função importante no metabolismo ósseo, modulando a atividade blástica e clástica de acordo com sua concentração. Por outro lado, o NO também apresenta importante papel imunorregulador, sendo produzido pelas e atuando sobre as principais células do sistema imune como macrófagos e linfócitos T^{2,83,89}. A

produção de NO por células T helper e sua participação na modulação da resposta imune celular permanecem controvertidas. Estudo *in vitro* demonstrou produção de NO por células Th1, mas não por células Th2; além disso, o NO inibiu a secreção de IL-2 e INF- γ por células Th1 e não causou nenhum efeito na produção de IL-4 por células Th2⁸⁹. De acordo com TAYLOR ROBINSON et al.⁸⁹, o NO produzido por células Th1 participa de um mecanismo de feed-back negativo inibindo a produção de IL-2 e INF- γ , prevenindo, assim, a proliferação de células Th1, de células CD8⁺ e de macrófagos; adicionalmente, as células Th2 proliferam na presença da citocina IL-4, cuja produção não foi afetada por NO. De acordo com estes achados, as células Th1 e Th2 podem ser distinguidas por diferentes padrões de citocinas produzidas e diferente susceptibilidade ao NO.

Em doenças inflamatórias crônicas, como a inflamação asmática, altas concentrações de NO, mediada por iNOS, leva a uma inibição da proliferação de células Th1 com decréscimo da produção de IL-2 e INF- γ , resultando em aumento do número de células Th2 com conseqüente elevação da produção de IL-4, IL-5 e IL-10⁷. Em adição, IL-4 produzida por linfócitos Th2, dentre outras funções, inibe a atividade da NOS e a síntese de NO por macrófagos murinos ativados por INF- γ e LPS⁴⁹.

Pode-se sugerir que a supressão de células Th1 e de suas citocinas IL-2 e INF- γ , por NO, resultará em uma maior susceptibilidade à infecção por LPS; uma vez demonstrado que ratos deficientes de iNOS apresentaram intensa resposta Th1 com maior expressão de INF- γ e menor de IL-4, o que resultou em resistência à infecção por LPS⁹⁴. Em contraposição, recentemente

foi demonstrada inibição, mediada por NO, da proliferação de ambos os subtipos de linfócitos T helper⁹⁰, bem como da secreção de citocinas associadas tanto com a resposta Th1 (IL-2 e INF- γ) como Th2 (IL-5, IL-10 e IL-4) *in vitro*⁸.

O NO também contribui para a supressão da resposta imune graças à inibição da expressão pelos macrófagos de moléculas classe II do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), prejudicando a apresentação antigênica⁸². Esta imunossupressão tem sido observada em amostras de periodontite avançada humana¹⁶.

O óxido nítrico é uma molécula mensageira multifuncional envolvida na regulação da resposta inflamatória com efeitos sobre o metabolismo ósseo e sobre as respostas imunes adaptativa e inata⁴⁰ e, assim, é capaz de contribuir com a destruição tecidual presente em doenças inflamatórias crônicas. Esta citotoxicidade mediada por NO poderá ocorrer em combinação com a sua capacidade de ativar metaloproteinases, incluindo collagenases e gelatinases, liberadas por macrófagos ativados, PMNs e fibroblastos residentes^{40,44,61,66,68}. As metaloproteinases (MMPs) são sintetizadas e secretadas na forma inativa (proMMPs) e posteriormente ativadas pelas citocinas IL-1 e TNF- α , pelas endotoxinas bacterianas, e pelo NO e seus reativos nitrito e peroxinitrito (ONOO⁻)^{61,66}.

Polimorfonucleares neutrófilos sintetizam uma metaloproteinase denominada matriz metaloproteinase-8 (proMMP-8) ou procollagenase neutrofílica humana, a qual desempenha um importante papel na remodelação e destruição da matriz extracelular⁶⁶. Adicionalmente, PMNs

sintetizam NO, a partir da enzima iNOS, estimulados por mediadores inflamatórios e LPS^{23,66,86,93}. Assim, sob condições patológicas, o NO e seus intermediários NO_2^- e peroxinitrito, sintetizados por PMNs, participam da ativação da MMP-8 previamente secretada por estas próprias células na sua forma inativa⁶⁶.

Vários estudos sugerem que a periodontite apresenta um comportamento cíclico, caracterizado por períodos de exarcebação durante o qual observa-se progressiva perda óssea e destruição tecidual, seguida por períodos de remissão^{68,91}. Períodos de progressiva destruição tecidual envolvem significativa atividade proteolítica, com síntese, secreção e ativação de enzimas proteolíticas tais como MMP-1 ou collagenase intersticial, MMP-8 ou collagenase neutrofílica, MMP-3 e gelatinase^{68,91}. O aumento da expressão de MMPs está associado com a progressão da doença periodontal^{68,91}; todavia, as vias de ativação das MMPs ainda não foram completamente esclarecidas.

Adicionalmente, o NO e seus reativos nitrito e peroxinitrito também podem contribuir com a destruição tecidual participando da supressão da síntese de matriz extracelular⁸⁸, da inibição da proliferação fibroblástica e indução de apoptose nestas células *in vitro*²⁷.

Na doença periodontal, LOHINAI et al.⁵², em 1998, foram os primeiros a estudar NO e observaram a presença de iNOS em macrófagos, linfócitos e PMNs em periodontites induzidas experimentalmente em ratos; demonstraram, ainda, que ratos tratados com inibidor seletivo de iNOS apresentaram menor perda óssea adjacente à doença, quando se comparava com o sítio controle. Adicionalmente, MATEJKA et al.⁵⁷ demonstraram

presença de altos níveis de L-arginina e de L-citrulina em tecido gengival de pacientes com moderada periodontite, sugerindo a produção e participação do NO na doença periodontal humana.

Em lesões periodontais humanas, a presença de iNOS foi primeiramente demonstrada por KENDALL et al.⁴¹, em 2000, com maior expressividade desta enzima em fibroblastos, células inflamatórias e células epiteliais basais. Neste mesmo ano, LAPPIN et al.⁴⁷ observaram o aumento da expressão de iNOS em amostras de periodontites quando comparadas ao grupo controle de tecido gengival clinicamente saudável; neste estudo, os autores verificaram que as principais fontes de iNOS nos tecidos periodontais eram os macrófagos e células endoteliais, não observando imunomarcagem no epitélio, em linfócitos e PMNs.

Em adição, HIROSE et al.³⁸, em recente estudo, observaram significativo aumento da expressão de IL-6 e iNOS em amostras obtidas de pacientes com periodontite.

Em resumo, o NO atua no metabolismo ósseo, estimulando reabsorção óssea de acordo com sua concentração^{15,22,53,74}, estimula a produção e ativação de citocinas imunorreguladoras e de células T helper, participando na modulação da resposta imune adaptativa^{8,82,89,90,94}, bem como ativa metaloproteinases e inibe a proliferação de fibroblastos^{27,61,66}. Estes fenômenos, nos quais o NO está envolvido, são também observados na doença periodontal crônica avançada; a reabsorção óssea, fenômenos imunorregulatórios e degradação de matriz de colágeno estão diretamente relacionados com a patogênese e progressão desta doença. Todavia, embora

há evidências da participação deste gás na destruição tecidual incluindo reabsorção óssea, e em fenômenos imunopatológicos, sua função na doença periodontal não está completamente esclarecida. Desta forma, objetivamos pesquisar as células que produzem NO, assim como comparativamente observar a expressão de iNOS em diferentes estágios da doença periodontal, correlacionando severidade da doença e síntese de NO.

3 PROPOSIÇÃO

Considerando a provável participação do NO na patogênese da doença periodontal humana, propusemo-nos, por meio da utilização de imuno-histoquímica, identificar e quantificar:

- *A expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), em gengivites associadas à placa bacteriana e periodontites crônicas localizadas*

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção e caracterização da amostragem

Para este estudo, foram selecionadas 13 amostras de tecido gengival clinicamente saudável, provenientes de plastia gengival após exodontia de pré-molares com indicação ortodôntica e de terceiros molares inclusos; 19 de Gengivite associada à placa dentobacteriana, oriundas de gengivoplastias, sendo uma das amostras proveniente de peça cirúrgica retirada devido a presença de tumor odontogênico (selecionando margens livres do tumor) e 19 de Periodontite crônica localizada, oriundas de curetagem e/ou excisão de bolsas periodontais. Os casos referem-se a espécimes enviados ao Serviço de Anatomia Patológica do Departamento de Estomatologia, Área Patologia, da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, nos últimos dois anos. O diagnóstico final, realizado previamente, foi baseado nos aspectos microscópicos, seguindo a classificação de PAGE; SCHROEDER⁷¹, considerando-se também as informações clínicas relatadas pelo profissional requisitante como localização e presença ou não de perda óssea (informações clínicas iniciais).

Com o objetivo de melhor caracterizar e classificar a amostra, foram obtidas informações clínicas adicionais mais detalhadas como: 1) presença ou não de placa dentobacteriana em associação ao tecido gengival; 2) aumento do contorno, consistência e coloração gengivais; 3) presença ou não de perda de inserção conjuntiva; 4) presença ou não de perda óssea

(caso tal informação não tivesse sido previamente relatada); 5) breve história médica e, 6) número de regiões afetadas pela doença periodontal.

A presença de perda óssea e placa dentobacteriana associada a um quadro microscópico e, geralmente, a um laudo já emitido de Doença periodontal em fase avançada de Page, ou seja, a presença de tecido gengival intensamente infiltrado por plasmócitos e linfócitos focalmente distribuído e separado por travas de tecido conjuntivo fibroso, em adição a presença de projeções epiteliais hiperplásicas com intensa exocitose, permitiu-nos considerar tratar-se de periodontite crônica. Foram selecionadas as amostras correspondentes a lesões localizadas, onde aproximadamente 4 a 10 sítios estavam afetados pela doença (<30%). Assim, as amostras selecionadas foram caracterizadas como periodontites crônicas localizadas.

Os quadros microscópicos compatíveis com Doença periodontal em fase precoce e fase estabelecida de Page, ou seja, a presença de tecido gengival intensamente infiltrado por linfócitos e plasmócitos ora em focos separados por travas de tecido conjuntivo fibroso, ora difusamente distribuído na região subepitelial, puderam ser associados com a informação clínica obtida posteriormente quanto à presença de placa e ausência de perda óssea, caso tal informação não tivesse sido relatada na ficha clínica inicial enviada com a peça cirúrgica. Assim, esta associação permitiu a caracterização de gengivites associadas à placa dentobacteriana.

Raros casos apresentavam incompatibilidade entre os aspectos microscópicos e a informação clínica quanto à perda óssea; os mesmos foram retirados de nossa amostragem.

Assim, com base nas informações clínicas iniciais e ou adicionais e características microscópicas, as lâminas foram divididas em três diferentes grupos experimentais, denominados como grupos I (Tecido gengival clinicamente saudável - controle), II (Gengivite associada à placa dentobacteriana) e III (Periodontite crônica localizada). As amostras de cada grupo foram analisadas, a partir das respectivas fichas clínicas, quanto a aspectos gerais do paciente como gênero, idade e raça, bem como a procedência das mesmas.

As amostras consistiram de 13 casos de tecido gengival clinicamente saudável (Grupo I), 19 casos de gengivite associada à placa bacteriana (Grupo II) e 19 casos de periodontite crônica localizada; houve maior prevalência do gênero feminino nos grupos avaliados, sendo que a proporção foi de 7:6 no grupo I, 14:5 no grupo II e 15:4 no grupo III.

Quanto à idade dos pacientes no momento do tratamento, observou-se que no grupo I a idade variou de 15 a 72 anos de idade, no grupo II a variação ficou entre 16 e 54 anos e no grupo III apresentou-se entre 19 e 74 anos. No que diz respeito à raça, houve grande prevalência da raça branca sobre as demais raças em todos os grupos avaliados. E quanto à procedência das peças cirúrgicas, aproximadamente 41% dos espécimes foram enviados por docentes da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Universidade do Sagrado Coração (USC), 23% foram

enviados por docentes e pós-graduandos do Departamento de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo (FOB-USP), 30% foram enviados por profissionais de clínicas particulares e o restante foi enviado por profissionais do Hospital de Reabilitação de Anomalias Crâniofaciais (HRAC - USP), bem como de outras instituições. Estas informações estão representadas no Quadro 3 (Apêndice).

4.2 Técnica imuno-histoquímica

A partir dos casos selecionados, emblocados em parafina, realizaram-se cortes seriados com aproximadamente 3 μ m de espessura, em micrótomo (Leica); em seguida, estes foram estirados em água e montados em lâminas silanizadas (DAKO, S3003, Glostrup-Denmark). Os cortes sobre as lâminas silanizadas foram submetidos à técnica imuno-histoquímica do tipo Imunoperoxidase (Avidina-Biotina-Peroxidase) para identificação da expressão da enzima iNOS, cujos passos foram os seguintes:

Parte I

1- Desparafinização e hidratação dos cortes, obedecendo à seqüência:

a- xilol- 5 minutos

b- álcool absoluto I- 2 minutos

c- álcool absoluto II- 2 minutos

d- álcool absoluto III- 2 minutos

- e- álcool etílico 95%- 2 minutos
- f- lavagem em tampão fosfato (PBS) (Quadro 1 – Apêndice)- 3 vezes.
- 2- Incubação em solução de peróxido de hidrogênio (MERCK) a 3% em PBS, por 40 minutos, para o bloqueio da peroxidase endógena.
- 3- Lavagem em PBS- 3 vezes.
- 4- Incubação, por 20 minutos, em tampão citrato, pH 6,0 (SIGMA, P4809, Saint Louis - USA) aquecido previamente a 95°C, com auxílio de Steammer Cuisine 700 HL-SPEED (T-FAL), para exposição antigênica.
- 5- Resfriamento progressivo à temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos.
- 6- Lavagem em PBS- 3 vezes.
- 7- Incubação em soro de leite a 3% em água destilada (leite desnatado Molico), por 20 minutos, para o bloqueio das ligações protéicas inespecíficas.
- 8- Incubação com os anticorpos policlonais de coelho anti-iNOS humano (Santa Cruz Biotechnology, SC-651, Califórnia – USA), a uma diluição de 1:500 em PBS adicionado a soro de albumina bovino (PBS-BSA) a 1%, em câmara úmida, a uma temperatura de 4°C, por no mínimo 18 horas.

Parte II

- 1- Lavagem rigorosa em PBS- 3 vezes.
- 2- Incubação com os anticorpos biotinilados de cabra (1:100 em PBS-BSA 1%) anti-IgG de camundongo/coelho (DAKO, K0492, Glostrup-Denmark), por 1 hora, à temperatura ambiente.
- 3- Lavagem em PBS- 3 vezes.
- 4- Incubação com complexo avidina-biotina-peroxidase (DAKO, K0492, Glostrup-Denmark), por 45 minutos, à temperatura ambiente.
- 5- Lavagem em PBS- 3 vezes.
- 6- Revelação da reação, utilizando 1 pastilha de 3.3' - DAB (diaminobenzidina) e 1 de uréia de peróxido de hidrogênio (SIGMA - FAST, D4293, Saint Louis - USA) diluídas em solução de 10 ml de PBS, resultando em 0,7 mg/ml de DAB e 0,2 mg/ml de H_2O_2 , por 5 minutos, à temperatura ambiente e protegida da luz.
- 7- Interrupção da revelação com incubação em água destilada (3 vezes).
- 8- Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, por 5 a 7 minutos, à temperatura ambiente.
- 9- Lavagem, por 5 minutos, em água corrente.
- 10- Incubação, por 1 segundo, em água amoniacal (diferenciador).
- 11- Lavagem imediata em água corrente, por 10 minutos.
- 12- Incubação em álcool 95%.
- 13- Incubação em álcool absoluto (4 vezes).

14 -Incubação em xilol (4 vezes).

15 -Montagem das lâminas, utilizando meio de montagem não aquoso Permount.

O controle negativo das reações foi obtido pela substituição dos anticorpos primários por PBS-BSA 1% ou por soro normal de coelho (Dako, K0902, Glostrup-Denmark) a 1:500 em PBS-BSA 1%.

4.3 Análise Subjetiva

As lâminas submetidas à imuno-histoquímica foram avaliadas com auxílio de um microscópio (CARL ZEISS, Germany), quanto à intensidade do infiltrado inflamatório, bem como às células inflamatórias predominantes e sua distribuição. Observou-se, também, a presença de células iNOS, sua localização, distribuição e intensidade de marcação.

4.4 Análises Quantitativas

4.4.1 Contagem de células por mm²

O número de células iNOS, assim como o número total de células inflamatórias, foram quantificados por meio de análise morfométrica, utilizando microscópio óptico ao qual foi adaptado uma ocular Kpl (8x), contendo um retículo de integração (CARL ZEISS, Germany). Utilizou-se uma objetiva de 100x, resultando em um aumento final de 800x. O diâmetro (d) do retículo de integração, obtido por meio de uma lâmina milimetrada,

correspondia a 0,15mm. Determinou-se a área do retículo (A), pela expressão matemática: $A = (\pi \cdot d^2)/4$, considerando $\pi = 3,14$; o que resultou em $A = 0,0176625\text{mm}^2$.

Para cada amostra, foram analisados 10 campos microscópicos consecutivos (área total = $0,176625\text{mm}^2$), priorizando os focos de infiltrado inflamatório, com exceção do grupo controle. Registrou-se o número total de células inflamatórias e o número de células iNOS encontrados na área total percorrida e dividiu-se este número por $0,176625\text{mm}^2$, obtendo-se o número de células por milímetro quadrado (mm^2).

4.4.2 Frequência Relativa (Porcentagem)

As lâminas submetidas à imuno-histoquímica foram também avaliadas quanto às porcentagens de células iNOS em relação ao infiltrado inflamatório total, bem como de células mononucleares (MNs) iNOS e PMNs iNOS*. Utilizou-se para esta análise o retículo de integração de 25 pontos (CARL ZEISS, Germany), considerando-se apenas as células coincidentes a estes pontos. As proporções foram expressas em porcentagens (médias e desvios padrão). Adicionalmente, foram obtidas as proporções das porcentagens de PMNs:MNs iNOS e PMNs iNOS:iNOS.

Todas as contagens foram feitas por dois examinadores. As médias dos valores observados estão registrados no Quadro 2 (Apêndice) .

4.5 Análise Estatística

As médias dos números de células iNOS por mm² e respectivos desvios padrão, observados em cada grupo, foram analisados e trabalhados estatisticamente, por meio de Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. As porcentagens de MNs iNOS⁺, PMNs iNOS⁺ e total de células iNOS⁺ foram analisadas e trabalhadas estatisticamente, por meio do teste Kruskal Wallis seguido por teste de Dunn. O valor de p foi considerado estatisticamente significativo quando menor do que 0,05.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados serão demonstrados de forma descritiva, bem como por meio de Quadros, Tabelas, Figuras e Gráficos.

5.1 Análise Subjetiva

Grupo I- Controle

Todos os cortes microscópicos do grupo controle demonstraram mucosa bucal constituída por epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado, algumas vezes hiperplásico. Subjacente, o tecido conjuntivo fibroso apresentava-se discretamente infiltrado por células inflamatórias predominantemente mononucleares, com distribuição difusa. Observou-se, dentre as células inflamatórias, escassos polimorfonucleares neutrófilos iNOS, alguns deles no interior dos vasos sangüíneos (Figuras 1 e 2).

Grupo II- Gengivite associada à placa bacteriana

Os cortes microscópicos referentes aos casos de Gengivite associada à placa bacteriana revelaram mucosa bucal constituída por epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado hiperplásico, apresentando na região do epitélio juncional pequenas projeções e infiltração epitelial por polimorfonucleares neutrófilos (Figura 3). Logo abaixo do

epilégio, nota-se moderado a intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear distribuído ora aleatoriamente, ora em focos separados por travas de tecido conjuntivo fibroso. As células iNOS⁺ estavam presentes no infiltrado inflamatório principalmente na região subepitelial, no interior do epitélio sulcular (Figura 4) e de vasos sangüíneos, e em íntimo contato com biofilmes microbianos. A imunomarcacão parecia ser quantitativamente menor nos planos mais profundos, distante dos focos de infiltrado inflamatório, quando se comparava com as áreas mais próximas ao epitélio. As células inflamatórias polimorfonucleares iNOS⁺ apresentavam intensa imunomarcacão (Figura 3 e 4). Periféricamente, notou-se a presença de fragmentos de biofilmes microbianos em aproximadamente 60% dos casos.

Grupo III- Periodontite crônica localizada

Os cortes microscópicos deste grupo revelaram mucosa bucal constituída por epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado hiperplásico com áreas de intensa exocitose e desorganização; na região do epitélio da bolsa periodontal notaram-se inúmeras projeções epiteliais (Figura 5A). Subjacente, no tecido conjuntivo fibroso, foi observado um intenso infiltrado inflamatório predominantemente linfoplasmocitário subepitelial (Figura 5B) e distribuído em focos separados por travas de tecido conjuntivo fibroso (Figura 6A). As células iNOS⁺ pareciam mais numerosas, em relação ao grupo II, e estavam presentes difusamente nos focos de infiltrado inflamatório, no interior de vasos sangüíneos, invadindo o epitélio da bolsa periodontal e em íntimo contato com este epitélio (Figuras 6B e 7), bem como

com os biofilmes microbianos. As células polimorfonucleares iNOS⁺ apresentavam intensa imunomarcação (Figuras 6B e 7). Não se observando imunomarcação em células endoteliais, fusiformes, epiteliais e mononucleares (Figura 6B e 7). PerifERICAMENTE, observou-se a presença de fragmentos de biofilmes microbianos (Figura 8) e pequenos fragmentos de cimento nos casos examinados.

As principais características microscópicas observadas nos três diferentes grupos estão representados esquematicamente nas Figuras 9, 10 e 11.

Fotomicrografias de Tecido Gengival Clinicamente

Saudável (Grupo I)

FIGURA 1 – Amostra de tecido gengival clinicamente saudável com discreto infiltrado inflamatório predominantemente MN (A e B: Imuno-histoquímica, aumento original = x100).

FIGURA 2 - Presença de escassas células PMNs iNOS, no interior de vasos sanguíneos (seta) (A e B: Imuno-histoquímica, aumento original = x100).

Fotomicrografias de Gengivite Associada à Placa
Dentobacteriana (Grupo II)

FIGURA 3 – Epitélio juncional com pequenas projeções (setas) e moderado infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear. Observam-se ainda, dentina (**) e cimento (*). Em C, maior aumento do epitélio sulcular e células inflamatórias presentes em B. (A, B e C: H.E., aumento original = x12.5, x25 e x100, respectivamente). Em D, observa-se intensa marcação para iNOS em PMNs dispersos no infiltrado inflamatório (Imuno-histoquímica, aumento original = x250).

FIGURA 4 – PMNs iNOS intensamente imunomarcados, presentes na região subepitelial (A e C), na superfície do epitélio juncional (C e D), bem como no seu interior (B). Em C, maior aumento da fotomicrografia D (Imuno-histoquímica, aumento original = x250 – A, B e C, e x100 – D).

Fotomicrografias de Periodontite Crônica

Localizada (Grupo III)

FIGURA 5 – Inúmeras projeções do epitélio da bolsa periodontal e intenso infiltrado inflamatório mononuclear predominantemente plasmocitário subepitelial. Em B, maior aumento da fotomicrografia A (A e B: H.E., aumento original = x25 e x100, respectivamente).

FIGURA 6 – Focos de intenso infiltrado inflamatório predominantemente plasmocitário (A). Em B, observam-se inúmeros PMNs iNOS intensamente imunomarcados, no interior de vasos sanguíneos próximos ao epitélio da bolsa periodontal (A: H.E., B: Imuno-histoquímica, aumento original = x25 e x250, respectivamente).

FIGURA 7 – Inúmeros PMNs iNOS intensamente imunomarcados, dentro e fora dos vasos sanguíneos. Em B, maior aumento da fotomicrografia A (A, B e C: Imuno-histoquímica, aumento original = x100 - A, x250 - B e C).

FIGURA 8 – Biofilmes microbianos adjacentes ao epitélio da bolsa (A) (A: H.E., aumento original = x100).

Principais Características Microscópicas
Observadas nos Três Grupos

Representação esquemática modificada de PAGE; SCHROEDER (1990)

FIGURA 9 – Representação esquemática das células inflamatórias iNOS⁺ (destacadas em amarelo escuro), de sua distribuição e intensidade de marcação no tecido gengival clinicamente saudável (grupo I). Neste grupo, observam-se escassas células inflamatórias iNOS⁺ aleatoriamente distribuídas. Os PMNs iNOS⁺ estavam presentes fora e no interior de vasos sanguíneos.

Representação esquemática modificada de PAGE; SCHROEDER (1990)

FIGURA 10 – Representação esquemática das células inflamatórias iNOS⁺ (destacadas em amarelo escuro), de sua distribuição e intensidade de marcação na gengivite associada à placa bacteriana (grupo II). Em maior quantidade, as células iNOS⁺ estão presentes no infiltrado inflamatório principalmente na região subepitelial, no interior do epitélio sulcular e de vasos sangüíneos, e em íntimo contato com biofilme microbiano. Os PMNs iNOS⁺ presentes apresentam intensamente marcados.

Representação esquemática modificada de PAGE-SCHROEDER (1990)

FIGURA 11 – Representação esquemática das células inflamatórias iNOS⁺ (destacadas em amarelo escuro), de sua distribuição e intensidade de marcação na periodontite crônica localizada (grupo III). Neste grupo, nota-se uma amplificação do infiltrado inflamatório e das células iNOS⁺, as quais estão presentes preferencialmente nos focos de infiltrado inflamatório, no interior do epitélio hiperplásico da bolsa periodontal e de vasos sanguíneos, bem como em íntimo contato com biofilmes microbianos. Os PMNs iNOS⁺ apresentam intensa marcação.

5.2 Análises Quantitativas

5.2.1 Contagem de células por mm²

Na análise quantitativa do número total de células inflamatórias por mm², verificamos um aumento significativo com a instalação e progressão da doença periodontal. Nossos dados revelaram que, do grupo I (736,02 ± 560,81) (média ± desvio padrão) para o grupo II (3351,79 ± 1304,98), houve um aumento de aproximadamente 4 vezes no número de células inflamatórias, e do grupo I para o grupo III (5694,63 ± 2277,64) o aumento foi de aproximadamente 8 vezes. O número de células inflamatórias também aumentou significativamente ($p < 0.0001$) do grupo II para o grupo III.

A análise imuno-histoquímica revelou um significativo aumento no número de células iNOS por mm² nas amostras de gengivite associada à placa dentobacteriana (Grupo II), 40.52 ± 39.00, e de periodontite crônica localizada (Grupo III), 51.55 ± 36.64, quando comparadas ao controle caracterizado por tecido gengival clinicamente saudável (Grupo I), 9.09 ± 23.00 ($p = 0.0049$). Não houve diferenças significantes entre os grupos II e III, quanto ao número de células iNOS por mm². Estes valores, bem como o número total de células inflamatórias, estão representados no Quadro 2 (Apêndice), na Tabela 1 e no Gráfico 1.

TABELA 1 - Número total de células inflamatórias e de células iNOS⁺ por mm² em amostras de tecido gengival clinicamente saudável (Grupo I), gengivite associada à placa dentobacteriana (Grupo II) e periodontite crônica localizada (Grupo III)

Grupos	Células inflamatórias (mm ²) (média ± desvio padrão)	Células iNOS ⁺ (mm ²) (média ± desvio padrão)
Clinicamente saudável	736.02 ± 560.81 ^a	9.09 ± 23.00 ^A
Gengivite	3351.79 ± 1304.98 ^b	40.52 ± 39.00 ^B
Periodontite	5694.63 ± 2277.64 ^c	51.55 ± 36.64 ^B

Grupos com letras diferentes possuem diferença estatisticamente significativa entre si, $p < 0.0001$ e $p = 0.0049$, respectivamente (ANOVA e teste de Tukey, $p < 0.05$).

Grupos com letras diferentes possuem diferença estatisticamente significativa entre si, $p < 0.0001$ e $p = 0.0049$, respectivamente; ANOVA seguido por teste de Tukey, $p < 0,05$.

GRÁFICO 1 - Número total de células inflamatórias e de células iNOS positivas por mm² em amostras de tecido gengival clinicamente saudável (Grupo I), gengivite associada à placa dentobacteriana (Grupo II) e periodontite crônica localizada (Grupo III).

5.2.2 Frequência Relativa (Porcentagem)

Na contagem proporcional das células iNOS, observamos que estas células representaram 1.28% do infiltrado inflamatório no grupo I e aproximadamente 6% nos grupos II e III (Tabela 2). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos II e III quanto às porcentagens de células iNOS⁺ ($p > 0.05$). Assim, houve um aumento da expressão de iNOS com a amplificação do infiltrado inflamatório e foi contínuo com o aumento da severidade da doença periodontal (Tabela 2).

Quando diferentes tipos morfológicos celulares eram analisados, notou-se que apenas os PMNs iNOS⁺ apresentavam intensa imunomarcação nos três grupos analisados e que estas células aumentavam significativamente, na presença de doença periodontal (gingivite ou periodontite), quando se comparava como o grupo controle ($p < 0.05$). (Tabela 2 e Gráfico 2). Interessantemente, um pequeno aumento de PMNs iNOS⁺ do grupo II (5.53 ± 4.80) para o grupo III (6.40 ± 2.97) foi observado.

Adicionalmente, foi calculada a proporção da porcentagem de PMNs iNOS⁺:iNOS⁻. Esta revelou um aumento progressivo com a instalação e severidade da doença periodontal. A proporção, acima citada, referente às amostras de doença periodontal apresentavam-se duas a três vezes maiores que o grupo controle (Tabela 2).

Os controles negativos, utilizados em todas as reações, não demonstraram imunomarcação positiva, quando da substituição do anticorpo primário por PBS-BSA 1% (Figura 12). Quando da utilização de soro

normal de coelho, observou-se marcação em fibroblastos e células endoteliais, epiteliais e mononucleares; indicando que discretas marcações observadas nestas células, na incubação com o anticorpo primário, na realidade, eram falsos positivos (Figura 13) e que somente a marcação visualizada nos PMNs deve ser considerada.

TABELA 2 - Distribuição de células iNOS positivas, de PMNs iNOS positivos e de MNs iNOS positivos em amostras de tecido gengival clinicamente saudável (Grupo I), gengivite associada à placa dentobacteriana (Grupo II) e periodontite crônica localizada (Grupo III)

<i>Grupos</i>	<i>% PMNs iNOS⁺ (média ± d.p.)</i>	<i>Proporção da % iNOS⁺:iNOS⁻ PMNs</i>
<i>Clinicamente saudável</i>	<i>1.28 ± 1.61</i>	<i>1.39</i>
<i>Gengivite</i>	<i>5.53 ± 4.80*</i>	<i>3.01</i>
<i>Periodontite</i>	<i>6.40 ± 2.97*</i>	<i>3.33</i>

** Representa diferença estatisticamente significativa, quando comparado ao grupo controle (Grupo I) (Kruskal Wallis e teste de Dunn, $p < 0.05$);*

% = porcentagem

d.p. = desvio padrão

GRÁFICO 2- Porcentagem de PMNs iNOS positivos em amostras de tecido gengival clinicamente saudável (Grupo I), gengivite associada à placa dentobacteriana (Grupo II) e periodontite crônica localizada (Grupo III).

*Representa diferença estatisticamente significativa quando comparado ao Grupo I (controle); Kruskal Wallis seguido por teste de Dunn, $p < 0,05$.

FIGURA 12 – Fotomicrografia do controle negativo, por meio da substituição do anticorpo primário por PBS-BSA 1%, ilustrando ausência de imunomarcção positiva em gengivite associada à placa dentobacteriana (Imunohistoquímica, aumento original = x100).

FIGURA 13 – Fotomicrografias do controle negativo, por meio da substituição do anticorpo primário por soro normal de coelho, demonstrando marcação em células mononucleares (*), células endoteliais e fibroblastos (seta) (A). Em B, nota-se marcação em plasmócitos (A e B: Imuno-histoquímica, aumento original = x250 e x100, respectivamente).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 do Título do Trabalho

O estudo da etiologia, patogênese e tratamento de doenças, como a doença periodontal, de maneira ordenada, criteriosa e universal, apenas é possível adotando-se uma sistemática de classificação corretamente aplicada. Classificações como a de 1989, discutida no Workshop Mundial de Periodontia Clínica da Academia Americana de Periodontologia (AAP), e a de 1993, descrita no Primeiro Workshop Europeu de Periodontologia, apresentavam falhas que foram revisadas e reformuladas, em 1999, no Workshop Internacional para Classificação de Doenças Periodontais⁵. Entre as principais modificações, está a adição de um grupo de doenças classificado como “doenças gengivais” e subclassificado em doenças gengivais induzidas ou não por placa dentobacteriana. As doenças induzidas incluem as gengivites associadas à placa dentobacteriana, que podem ou não ser modificadas por fatores locais, e as doenças gengivais modificadas por fatores sistêmicos, medicamentos, desnutrição e outros. As doenças gengivais não induzidas por placa dentobacteriana incluem as doenças gengivais de origem viral, fúngica ou genética, aquelas associadas às alterações muco-cutâneas, alérgicas, traumáticas, e outras⁵⁵.

No presente estudo, os casos selecionados que não apresentavam perda óssea estavam associados à placa dentobacteriana, porém não estavam associados com fatores sistêmicos, medicamentos e desnutrição. Baseado na mais recente classificação das doenças periodontais (1999), estes

casos foram considerados gengivites associadas à placa dentobacteriana, mesmo que nem todos os fatores locais fossem totalmente conhecidos durante a caracterização das amostras. Visto que tais amostras são oriundas de arquivos de um serviço de Anatomia Patológica, muitas vezes torna-se impossível a obtenção de todas as informações necessárias para uma subclassificação das doenças periodontais.

A classificação de 1999 apresenta revisões terminológicas como a substituição de “periodontite do adulto” por “periodontite crônica”, uma vez que dados epidemiológicos e clínicos sugerem que a forma de periodontite comumente encontrada entre os adultos pode também ser observada em adolescentes. A periodontite crônica pode ser subclassificada de acordo com sua extensão, em localizada, quando o número de regiões envolvidas for menor ou igual a 30%, e generalizada, quando for maior ou igual a 30%^{5,24}.

Outras modificações feitas no Workshop Internacional para Classificação de Doenças Periodontais⁵, em 1999, incluem a substituição da terminologia “periodontite de início precoce” por “periodontite agressiva”, bem como “gengivite e periodontite ulcerativas necrosantes” por “doenças periodontais necrosantes”, e ainda a inclusão do grupo denominado “abscessos periodontais”. Uma vez que possuem características clínicas e microbiológicas específicas, estes três grupos de doenças são independentes do grupo “periodontite crônica”. No presente trabalho, as amostras associadas com perda óssea e com a presença de placa dentobacteriana, que eram localizadas e demonstravam predominância de células inflamatórias

mononucleares foram selecionadas e então consideradas como periodontites crônicas localizadas.

6.2 da Metodologia

A metodologia utilizada neste estudo foi imuno-histoquímica do tipo imunoperoxidase que consiste de uma técnica altamente específica e sensível, cujas etapas devem ser rigorosamente seguidas e os resultados cautelosamente interpretados.

A padronização da técnica e dos anticorpos a serem utilizados, a escolha de controles positivos e a utilização de controles negativos apropriados são procedimentos essenciais para o sucesso da metodologia. Em nosso estudo, seguimos rigorosamente todas as etapas de padronização e a utilização, em cada reação, dos controles necessários. Os controles negativos foram realizados tanto pela substituição dos anticorpos policlonais de coelho anti-iNOS humano por PBS-BSA 1%, revelando possíveis reações inespecíficas dos anticorpos secundários, bem como pela substituição dos anticorpos anti-iNOS por soro normal de coelho, eliminando assim falsos positivos advindos da incubação com os anticorpos primários. Tais controles garantem, desta maneira, a especificidade e fidelidade dos resultados imuno-histoquímicos apresentados.

6.3 dos Resultados

Os produtos bacterianos solúveis desempenham papel fundamental na patogênese da doença periodontal inflamatória crônica, resultando em

ativação celular e formação de um intenso infiltrado inflamatório, com produção de citocinas pró-inflamatórias dentre outros mediadores^{70,71,97}. O óxido nítrico tem sido considerado importante molécula sinalizadora em uma grande variedade de tecidos; este gás pode desempenhar relevante papel como mediador citotóxico na resposta imune não específica, podendo apresentar efeitos benéficos ou destrutivos, nos fenômenos patológicos teciduais^{40,44,59}.

O LPS de bactérias gram-negativas juntamente com TNF- α , IL-1 e IFN- γ têm demonstrado ser importantes estímulos para a produção de NO em uma variedade de células humanas e animais, como macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, linfócitos T, osteoclastos e osteoblastos^{12,23,25,41,53,74,77,83}.

Os fenômenos inflamatórios nos tecidos periodontais, assim como em outros tecidos conjuntivos, são acompanhados pela produção de NO. A partir de modelo experimental de periodontite em ratos, LOHINAI et al.⁵² verificaram aumento da produção local de NO e presença de iNOS em macrófagos, linfócitos e polimorfonucleares, além da íntima relação entre a presença desta molécula e a presença de perda óssea alveolar. MATEJKA et al.⁵⁷, em 1998, observaram alto conteúdo de L-arginina e de L-citrulina em tecido gengival de pacientes com moderada periodontite e, recentemente, KENDALL et al.⁴¹, em 2000, demonstraram pela primeira vez a presença de iNOS em doença periodontal humana através de imunomarcação em fibroblastos, células inflamatórias e células epiteliais, sugerindo assim a produção e participação do NO na doença periodontal humana.

No presente trabalho, analisando amostras de tecidos gengivais humanos com doença periodontal, por meio de imuno-histoquímica, notou-se, independente se gengivite ou periodontite, um significativo aumento no número de células iNOS⁺ em relação ao tecido gengival clinicamente saudável. Estes resultados corroboram com prévios estudos, em tecidos humanos, os quais similarmente verificaram aumento da expressão de iNOS em doença periodontal^{41,47,38}.

O NO tem sido considerado um mediador multifuncional produzido por, e agindo sobre, a maioria das células do corpo. Vários estudos *in vitro* descrevem o efeito do NO sobre a atividade de células ósseas^{22,73,74}. Tais efeitos podem ser estimuladores ou inibidores, de acordo com diferentes níveis de concentração e modelos experimentais utilizados^{15,40,53,73}. Alguns estudos observaram que a presença de NO, adjacente a sítios de inflamação crônica, aumenta a reabsorção óssea alveolar^{51,52}; enquanto outros demonstraram que a produção de NO, estimulada por citocinas inflamatórias, pode funcionar como um mediador para controle da atividade clástica, evitando excessiva reabsorção óssea, principalmente na presença de alta concentração local de NO^{15,53,74}. Em vista disto, torna-se difícil predizer se a produção aumentada de NO durante a inflamação representa estímulo para o aumento da perda óssea ou para sua inibição¹⁵. Infelizmente, não foi possível examinar as concentrações de NO em nossas amostras. Mas, acreditamos que as células iNOS⁺ possam desempenhar um papel crítico na ativação da reabsorção óssea localizada, que acompanha e contribui para a

progressão da doença periodontal. Isto ocorreria, provavelmente, juntamente com outros estimuladores da reabsorção óssea.

Apesar dos estudos in vitro demonstrarem que altas concentrações de NO inibem atividade clástica enquanto baixas a moderadas potencializam a reabsorção óssea local, não há evidências in vivo do efeito tempo-dependente das altas concentrações desta molécula sobre as células clásticas^{15,48,53,73}. LAURENT et al.⁴⁸ propõem que a grande diferença entre a atividade NOS constitutiva, fisiologicamente produzida, e a NOS induzível não está na concentração de NO gerada, mas na duração da expressão da enzima responsável e conseqüente síntese de NO.

No presente trabalho, observamos aumento da porcentagem de células iNOS⁺ na doença periodontal quando comparada com o grupo controle. Entretanto, notou-se manutenção da expressão de iNOS independentemente da presença ou não de perda óssea, visto que a porcentagem de células iNOS⁺, tanto na gengivite quanto na periodontite, foi mantida em aproximadamente 6%. Assim, acreditamos que a permanência da expressão de iNOS e a conseqüente síntese contínua de NO têm um importante papel na regulação, possivelmente na ativação, da reabsorção óssea alveolar presente nos estágios mais tardios da doença periodontal. Considerando que durante a resposta inflamatória crônica na doença periodontal existe exposição contínua e por longo período a agentes bacterianos, a contínua expressão de iNOS observada em nosso estudo parece-nos um achado de grande coerência.

Em ambientes de intensa e duradoura inflamação, como a doença periodontal, há a presença de diversas citocinas capazes de estimular a reabsorção óssea^{6,96} e simultaneamente induzir o aumento da produção de NO que, por sua vez, em altas concentrações é capaz de inibir a reabsorção óssea in vitro^{15,53,73}. Infelizmente, não é a inibição da reabsorção óssea que observamos durante a progressão da doença periodontal, embora a doença apresente fases de remissão alternadas por períodos de intensa destruição tecidual^{68,91}. De qualquer forma, isso constitui um paradoxo no estudo da biologia do tecido ósseo e até o presente momento permanece sem resposta. Talvez, o NO participe de um mecanismo de feed-back negativo nos processos de reabsorção óssea, ao atingir altas concentrações. Ainda, deve-se considerar a capacidade do NO em se difundir de suas células de origem a distâncias que variam em aproximadamente 0,4mm⁴⁵, bem como sua breve meia-vida de apenas segundos e rápida reação com o oxigênio, que impedem que altas concentrações sejam atingidas in vivo nas adjacências do sítio de produção. Assim acreditamos ocorrer na doença periodontal, com difusão de NO pelo periodonto e fluido sulcular, resultando, portanto, preferencialmente na ativação de células clásticas à sua inibição, ou ainda na alternância de ambos os fenômenos de acordo com uma maior ou menor concentração de NO produzido. Entretanto, a relação precisa entre a concentração de NO e os fenômenos que regulam o metabolismo do osso alveolar, nas doenças inflamatórias, permanece a ser estabelecida.

Em contrapartida, o NO e seus produtos, podem ter outros efeitos, além da ação sobre células ósseas, inibindo o crescimento e causando morte

de periodontopatógenos como *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens* e *Porphyromonas gingivalis in vitro*³, constituindo, assim, como uma importante molécula de defesa presente em doenças inflamatórias crônicas.

A capacidade de causar inibição enzimática, resultando em morte celular, faz do NO uma molécula envolvida também em fenômenos de destruição tecidual, uma vez que seus efeitos citotóxicos podem se estender para as células adjacentes, principalmente sob altas concentrações e atuação prolongada desta molécula^{14,40,43,44,61,66}. Além destes efeitos citotóxicos dependentes da sua atuação enzimática, o NO participa tanto da ativação de metaloproteinases^{61,66}, como da supressão de proteoglicanas e síntese de colágeno⁸⁸, e estes podem ser os mecanismos pelos quais o NO contribui para a perda precoce de colágeno em lesões gengivais⁶⁶. Além disso, o aumento de iNOS resulta na inibição da proliferação de fibroblastos e indução de apoptose nestas células²⁷, contribuindo para o predomínio da destruição sobre o reparo tecidual que é característica da periodontite⁴⁰.

Adicionalmente, o NO pode ainda ativar o recrutamento de fagócitos⁴⁰ e, por outro lado, modular o grau de inflamação e atuar na regulação dos fenômenos imunopatológicos, induzindo específica inibição da proliferação de células Th1⁹⁰ e conseqüente amplificação e perpetuação da resposta mediada por células Th2^{7,89,94}. Desta forma, o NO pode ser considerado uma molécula imunossupressora da resposta Th1.

Os linfócitos B e plasmócitos parecem desempenhar um papel mais importante do que os linfócitos T em lesões progressivas inflamatórias crônicas, como a doença periodontal^{80,80,81}. Todavia, há evidências da

participação de linfócitos T helper na doença periodontal humana^{98,99}, com maior proliferação e participação de linfócitos Th2 do que Th1 e aumento da expressão de IL-6, IL-10, IL-13⁹⁸ e IL-4⁹⁹.

Baseado na atuação do NO nas células do sistema imune e na maior participação e predomínio das células Th2 na progressão da doença periodontal, sugerimos ainda que o NO presente nesta doença pode estar participando dos fenômenos de supressão de células Th1^{89,90,94}, com concomitante redução dos níveis de IFN- γ e IL-2, levando a uma maior proliferação de células Th2^{89,94} e maior produção de IL-10, IL-4 e IL-13. Estas citocinas são responsáveis pela supressão de linfócitos Th1 e macrófagos, estimulação da proliferação de células Th2 e plasmócitos, e ativação de linfócitos B^{1,29,49}, que têm sido considerados os fenômenos imunes mais importantes para a progressão da doença periodontal. Assim, o NO, juntamente com outros fatores, pode contribuir para a progressão da doença periodontal através da regulação da resposta imune mediada por células T.

Entretanto, apesar das evidências que indicam a participação de NO na patogênese da doença periodontal humana, resultados conflitantes a respeito da função desta molécula nesta doença têm sido relatados.

Quanto às células produtoras de NO na doença periodontal, nossos dados demonstram que as células iNOS⁺ foram predominantemente PMNs, os quais demonstraram intensa positividade e, surpreendentemente, houve aumento na proporção de PMNs iNOS⁺:iNOS durante a progressão da doença. As células MNs apresentavam-se fracamente marcadas, entretanto quando da substituição do anticorpo policlonal de coelho anti-iNOS humana por soro

normal de coelho, o padrão de marcação mantinha-se nas células MNs, bem como nas células endoteliais, epiteliais e fibroblastos, revelando a presença de falsos positivos. Assim, apenas consideramos como imunomarcações verdadeiras àquelas observadas nos PMNs. Observouse ainda aumento da porcentagem dos PMNs iNOS⁺ nas doenças periodontais em comparação ao grupo controle. Esses resultados demonstram, desta maneira, uma importante participação dos PMNs, quanto à produção de NO em resposta a estímulos inflamatórios periodontais, quando comparados aos MNs, podendo tratar-se de uma maior responsividade dos PMNs.

Os presentes resultados são conflitantes com prévias observações realizadas por LAPPIN et al.⁴⁷, cujos dados demonstraram que as células que mais expressam iNOS, na doença periodontal humana, são os macrófagos e células endoteliais, enquanto que a maioria dos PMNs, linfócitos e células epiteliais não apresentaram expressão da enzima iNOS. No presente trabalho, de forma diferente, nós não observamos imunomarcação em células mononucleares, fibroblastos, células endoteliais e células epiteliais, o que acreditamos ter ocorrido em função da utilização de anticorpos de diferentes origens, possivelmente gerando variável especificidade.

As porcentagens de PMNs iNOS⁺ na doença periodontal, em nosso estudo, aumentaram significativamente em relação ao grupo controle. Porém, quando se comparava os grupos II (gengivite) e III (periodontite), observamos um sutil aumento da porcentagem de PMNs iNOS⁺ e uma diminuição da porcentagem de PMNs iNOS⁻. Nossos dados sugerem uma tendência para o aumento da expressão de iNOS pelos PMNs com o aumento

da severidade da doença periodontal. Este aumento pode estar associado como o menor recrutamento e participação dos macrófagos na doença periodontal, como realçado previamente por CHAPPLE; SRIVASTAVA; HUNTER¹⁶, em 1998. Esta suposta deficiência macrofágica na doença periodontal, freqüentemente discutida na literatura, pode resultar da supressão da resposta Th1 causada pelo NO, dentre outros fatores^{89,90,94}. Considerando isto uma verdade, o NO, além de participar dos fenômenos previamente discutidos, seria ainda um dos responsáveis pela maior participação dos PMNs na sua própria produção.

Apesar de em menor número do que os MNs, nós acreditamos que os PMNs são mais importantes quanto à produção e compartimentalização de NO na doença periodontal. Sendo assim, sugerimos que o NO proveniente dos PMNs, em conjunto com várias enzimas destrutivas, constitui um dos responsáveis pela destruição periodontal, além da atuação na regulação da reabsorção óssea e de fenômenos imunopatológicos e antimicrobianos. Não podemos descartar a possibilidade da expressão de iNOS, identificada neste estudo, representar apenas um sinal de ativação celular em resposta a estímulos bacterianos e de citocinas.

O NO proveniente dos PMNs tem sido relacionado ainda com a ativação de metaloproteinases, especialmente a procolagenase neutrofílica humana (MMP-8)⁶⁶ que, provavelmente, atua como fator adicional na degradação de fibras colágenas e progressão da doença periodontal^{40,66}. Assim, os PMNs, através da síntese de NO, podem participar, em um primeiro momento, da eliminação de microorganismos patogênicos e, com a

persistência de estímulos inflamatórios, estas células participariam de fenômenos destrutivos por meio também da ativação excessiva de metaloproteinases.

Em resumo, nossos resultados claramente demonstram que o número de células iNOS⁺ é mais elevado na doença periodontal do que no tecido gengival clinicamente saudável, e que a produção de NO parece ser contínua nos diferentes estágios da doença periodontal. Assim, as células inflamatórias apresentam uma via adicional de ativação na doença periodontal, com ênfase aos PMNs que expressaram iNOS significativamente, provavelmente representando uma importante fonte de óxido nítrico nesta doença.

As células produtoras de NO e seus possíveis efeitos na doença periodontal estão representados no esquema hipotético na Figura 14.

FIGURA 14 – Representação esquemática das células inflamatórias responsáveis pela síntese de NO quando estimuladas por produtos bacterianos, bem como a possível ação deste gás na patogênese da doença periodontal. Provavelmente, o NO, na doença periodontal, participa de fenômenos imunorregulatórios e destrutivos, atuando especialmente na supressão de células Th1 e macrófagos, na regulação da reabsorção óssea e na degradação de fibras colágenas.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, podemos concluir que:

- 1. o número total de células iNOS positivas é mais elevado na doença periodontal do que no tecido gengival clinicamente saudável,*
- 2. o número total de células iNOS positivas não apresenta diferença significativa entre os grupos Gengivite e Periodontite,*
- 3. na doença periodontal, a porcentagem de células iNOS positivas é maior quando comparada com o grupo controle. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos II e III quanto às porcentagens de células iNOS positivas. Assim, o aumento da expressão de iNOS foi proporcional à amplificação do infiltrado inflamatório,*
- 4. apenas os PMNs apresentaram intensa imunomarcção para a iNOS,*
- 5. os PMNs iNOS positivos aumentaram paralelamente com a progressão da doença periodontal.*

A partir de nossas conclusões, podemos sugerir que:

- 1. as células polimorfonucleares apresentam uma via adicional de ativação na doença periodontal. O NO produzido pode estar envolvido na patogênese da doença periodontal, atuando em fenômenos imunorreguladores, antimicrobianos ou destrutivos.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1 ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Effector mechanisms of immune responses. In: ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and Molecular Immunology**. 4.ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, c2000. Cap. 11-14, p.235-339.
- 2 AGARWAL, S. et al. Synthesis of proinflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to lipopolysaccharides and interleukin-1-beta. **J. Periodontal Res.**, v.30, n.6, p.382-9, Nov. 1995.
- 3 ALLAKER, R.P. et al. Antimicrobial effect of acidified nitrite on periodontal bacteria. **Oral microbiol. Immunol.**, v.16, n.4, p.253-6, Aug. 2001.
- 4 ARANY, I. et al. Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by differentiation and cytokines in human keratinocytes. **Biochem. biophys. Res. Commun.**, v.220, n.3, p.618-22, Mar. 1996.
- 5 ARMITAGE, G.C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann. Periodontol.**, v.4, n.1, p.1-6, Dec. 1999.

* Normas recomendadas para uso no âmbito da Universidade de São Paulo, com base no documento "Referências Bibliográficas: exemplos", emanado do Conselho Supervisor do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, em reunião de 20 de setembro de 1990.

- 6 ASSUMA, R. et al. IL-1 e TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. **J. Immunol.**, v.160, n.1, p.403-9, Jan. 1998.
- 7 BARNES, P.J.; LIEW, F.Y. Nitric oxide and asthmatic inflammation. **Immunol. Today**, v.16, n.3, p.128-30, Mar. 1995.
- 8 BAUER, H. et al. Nitric oxide inhibits the secretion of T-helper 1 and T-helper 2 associated cytokines in activated human T cells. **Immunology**, v.90, n.2, p.205-11, Feb. 1997.
- 9 BIDRI, M. et al. Nitric oxide pathway is induced by FcεRI and up-regulated by stem cell factor in mouse mast cells. **Eur. J. Immunol.**, v.27, n.11, p.2907-13, Nov. 1997.
- 10 BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. **J. Periodontal Res.**, v.28, n.6, p.500-10, Nov. 1993.
- 11 BLANCO, F.J. et al. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. **Amer. J. Path.**, v.146, n.1, p.75-85, Jan. 1995.
- 12 BLIX, I.J.; HELGELAND, K. LPS from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and production of nitric oxide in murine macrophages J774. **Eur. J. Oral Sci.**, v.106, n.1, p.576-81, Feb. 1998.
- 13 BOSTRÖM, L. et al. Clinical expression of TNF-α in smoking-associated periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v.25, n.10, p.767-73, Oct. 1998.

-
-
- 14 BRUCH-GERHARZ, D.; RUZICKA, T.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide in human skin: current status and future prospects. **J. invest. Derm.**, v.110, n.1, p.1-7, Jan. 1998.
- 15 CHAE, H.J. et al. Nitric Oxide is a regulator of bone remodelling. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.49, n.9, p.897- 902, Sept. 1997.
- 16 CHAPPLE, C.C.; SRIVASTAVA, M.; HUNTER, N. Failure of macrophage activation in destructive periodontal disease. **J. Pathol.**, v.186, n.3, p.281-6, Nov. 1998.
- 17 CULOTTA, E.; KOSHLAND, D.C. NO news is good news. **Science**, v.258, n.5090, p.1862-5, Dec. 1992.
- 18 DAMOULIS, P.D.; HAUSCHKA, P.V. Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts. **J. Bone Miner. Res.**, v.12, n.3, p.412-22, Mar. 1997.
- 19 DENIS, M. Human monocyte/macrophages: NO or no NO? **J. Leukoc. Biol.**, v.55, n.5, p.682-4, May 1994.
- 20 DuFOUR, A. et al. Regulation of differentiation of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by rhIL-1 e rhTNF- α . **J. Periodontal Res.**, v.28, n.6, p.566-8, Nov. 1993.
- 21 ELEY, B.M.; COX, S.W. Advances in periodontal diagnosis, 5 potential inflammatory and immune markers. **Brit. dent. J.**, v.184, n.5, p.220-3 Mar. 1998.
- 22 EVANS, D.M.; RALSTON, S.H. Nitric oxide and bone. **J. Bone Miner. Res.**, v.11, n.3, p.300-5, Mar. 1996.

-
-
- 23 FIERRO, I.M. et al. Induction of NOS in rat blood PMNs in vivo and in vitro: modulation by tyrosine kinase and involvement in bactericidal activity. **J. Leukoc. Biol.**, v.65, n.4, p.508-14, Apr. 1999.
- 24 FLEMMIG, T.F. Periodontitis. **Ann. Periodontol.**, v.4, n.1, p.32-7, Dec. 1999.
- 25 FOX, S.W.; CHOW, J.W.M. Nitric oxide synthase expression in bone cells. **Bone**, v.23, n.1, p.1-6, July 1998.
- 26 FROLOV, I. et al. In vivo exposure to *Porphyromonas gingivalis* up-regulates nitric oxide but suppresses tumour necrosis factor- α production by cultured macrophages. **Immunology**, v.93, n.3, p.323-8, Mar. 1998.
- 27 GANSAUGE, S. et al. Exogenous, but not endogenous nitric oxide increases proliferation rates in senescent human fibroblasts. **FEBS Lett.**, v.410, n.2, p.160-4, June 1997.
- 28 GARRETT, I.R. et al. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. **J. clin. Invest.**, v.85, n.3, p.632-9, Mar. 1990.
- 29 GEMMELL, E.; SEYMOUR, G.J. Modulation of immune responses to periodontal bacteria. **Curr. Opin. Periodont.**, p.28-38, 1994.
- 30 GEMMELL, E.; SEYMOUR, G.J. Cytokine profiles of cells extracted from humans with periodontal disease. **J. dent. Res.**, v.77, n.1, p.16-26, Jan. 1998.

-
-
- 31 GENCO, R.J. Host responses in periodontal diseases: current concepts. **J. Periodont.**, v.634, n.4, p.338, Apr. 1992.
- 32 GREEN, L.C. et al. Nitrate biosynthesis in man. **Proc. natl. Acad. Sci. (Wash.)**, v.78, n.12, p.7764-8, Dec. 1981.
- 33 GÜNHAN, M. et al. Mast cells in periodontal disease. **Ann. Dent.**, v.50, n.1, p.25-9, 1991.
- 34 HAPPONEN, R.P.; HEIKINHEIMO, K. Introduction to immunocytochemistry. **Proc. Finn. Dent. Soc.**, v.85, n.2, p.61-7, 1989.
- 35 HART, T.C.; KORNAMEAN, K.S. Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. **Periodont. 2000**, v.12, p.202-15, June 1997.
- 36 HIBBS, J.B., TAINTOR, R.R., VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, v.235, n.4784, p.473-6, Jan. 1987.
- 37 HIBBS, J.B. et al. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. biophys. Res. Commun.**, v.157, n.1, p.87-94, Nov. 1988.
- 38 HIROSE, M. et al. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. **J. Periodont.**, v.72, n.5, p.590-7, May 2001.
- 39 HÖNIG, J. et al. Increased interleukin-1 beta (IL-1 beta) concentration in gingival tissue from periodontitis patients. **J. Periodontal Res.**, v.24, n.6, p.362-7, Nov. 1989.

-
-
- 40 KENDALL, H.K.; MARSHALL, R.I.; BARTOLD, P.M. Nitric oxide and tissue destruction. **Oral Dis.**, v.7, n.1, p.2-10, Jan. 2001
- 41 KENDALL, H.K. et al. Nitric oxide synthase type-II is synthesized by human gingival tissue and cultured human gingival fibroblasts. **J. Periodontal Res.**, v.35, n.4, p.194-200, Aug. 2000.
- 42 KODA, W. et al. Evidence of the participation of peribiliary mast cells in regulation of the peribiliary vascular plexus along the intrahepatic biliary tree. **Lab. Invest.**, v.80, n.7, p.1007-17, July 2000.
- 43 KOLB, H.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. **Immunol. Today**, v.13, n.5, p.157-60, May 1992.
- 44 KRÖNCKE, K.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection- how, why, when, and where? **Nitric Oxide**, v.1, n.2, p.107-20, Jan. 1997
- 45 LANCASTER, J.R. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. **Nitric oxide**, v.1, n.1, p.18-30, Feb. 1997.
- 46 LANGREHR, J.M. et al. Nitric oxide – a new endogenous immunomodulator. **Transplantation** v.55, n.6, p.1205-12, June 1993.
- 47 LAPPIN, D.F. et al. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. **J. Periodontal Res.**, v.35, n.6, p.369-73, Dec. 2000.

-
-
- 48 LAURENT, M.; LEPOIVRE, M.; TENU, J. Kinetic modelling of the nitric oxide gradient generated in vitro by adherent cells expressing inducible nitric oxide synthase. **Biochem. J.**, v.314, n.15, p.109-13, Feb. 1996.
- 49 LIEW, F.Y. et al. A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (T_h2) cells of T_h1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v.21, n.10, p.2489-94, Oct. 1991.
- 50 LISTGARTEN, M.A. Pathogenesis of periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v.13, n.5, p.418, May 1986.
- 51 LOHINAI, Z.M.; SZABÓ, C. Role of nitric oxide physiology and patophysiology of periodontal tissues. **Med. Sci. Monit.**, v.4, n.6, p.1089-95, 1998.
- 52 LOHINAI, Z. et al. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature induced periodontitis in the rat. **Brit. J. Pharmacol.**, v.123, n.3, p.353-60, Feb. 1998.
- 53 LÖWIK, C.W.G.M. et al. Inducible production of nitric oxide in osteoblast-like cells and in fetal mouse bone explants is associated with suppression of osteoclastic bone resorption. **J. clin. Invest.**, v.93, n.4, p.1465-72, Apr. 1994.
- 54 MANOLAGAS, S.C. Role of cytokines in bone resorption. **Bone**, v.17, n.2, p.63S-67S, Aug. 1995.

-
-
- 55 MARIOTTI, A. Dental plaque-induced gingival diseases. **Ann. Periodontol.**, v.4, n.1, p.7-17, Dec. 1999.
- 56 MASADA, M.P. et al. Measurement of interleukin-1 α and 1 β in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. **J. Periodontal Res.**, v.25, n.3, p.156-63, May 1990.
- 57 MATEJKA, M. et al. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. **J. Periodontal Res.**, v.33, n.8, p.517-8, Nov. 1998.
- 58 MEYLE, J. Neutrophil chemotaxis and serum concentration of tumor necrosis factor- α (TNF). **J. Periodontal Res.**, v.28, n.6, p.491-3, Nov. 1993.
- 59 MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. **New Engl. J. Med.**, v.329, n.27, p.2002-12, Dec. 1993.
- 60 MONCADA, S. et al. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v.43, n.2, p.109-41, June 1992.
- 61 MURRELL, G.A.; JANG, D.; WILLIAMS, R.J. Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. **Biochem. biophys. Res. Commun.**, v.206, n.1, p.15-21, Jan. 1995.
- 62 NUSSLER, A.K.; BILLIAR, T.R. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. **J. Leukoc. Biol.**, v.54, n.2, p.171-8, Aug. 1993.

- 63 OFFENBACHER, S. Periodontal diseases: pathogenesis. **Ann. Periodontol.**, v.1, n.1, p.821-78, Nov. 1996.
- 64 OKADA, H.; KIDA, T.; YAMAGAMI, H. Identification and distribution of immunocompetent cells in inflamed gingiva of human chronic periodontitis. **Infect. Immun.**, v.41, n.1, p.365-74, July 1983.
- 65 OKADA, H. et al. Diagnostic strategies of periodontitis based on the molecular mechanisms of periodontal tissue destruction. **Oral Dis.**, v.2, n.1, p.87-96, Mar. 1996.
- 66 OKAMOTO, T. et al. Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.342, n.2, p.261-74, June 1997.
- 67 PAGE, R.C. Current understanding of the aetiology and progression of periodontal disease. **Int dent J.**, v.36, n.3, p.153-61, Sept. 1986.
- 68 PAGE, R.C. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. **J. Periodontal Res.**, v.26, n.3, p.230-42, May 1991.
- 69 PAGE, R.C. Periodontal diseases: a new paradigm. **J. dent. Educ.**, v.62, n.10, p.812-21, Oct. 1998.
- 70 PAGE, R.C.; KORNAMAN, K. S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontol. 2000**, v.14, p.9-11,

June 1997.

- 71 PAGE, R.C.; SCHROEDER, H.E. Structure and pathogenesis. In: SCHLUGER, S. et al. **Periodontal disease:** basic phenomena, clinical management, and occlusal and restorative interrelationships. 2.ed. Philadelphia, Lea & Febiger, c1990. Cap.7, p.183-220.
- 72 PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v.327, n.4, p.524-6, June 1987.
- 73 RALSTON, S.H. Nitric oxide and bone: what a gas! **Br. J. Rheumatol.**, v.36, n.8, p.831-8, Aug. 1997.
- 74 RALSTON, S.H. et al. Nitric oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. **J. Bone Miner. Res.** v.10, n.7, p.1040-9, July 1995.
- 75 REINHARDT, R.A. et al. IgG subclasses in gingival crevicular fluid from active versus stable periodontal sites. **J. Periodont.**, v.60, n.1, p.44-50, Jan. 1989.
- 76 ROSBE, K. et al. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase activity in upper respiratory epithelium. **Laryngoscope**, v.106, n.9-1, p.1075-9, Sept. 1996.
- 77 ROSEN, G. et al. Activation of murine macrophages by lipoprotein and lipooligocaccharide of *Treponema denticola*. **Infect. Immun.**, v.67, n.3, p.1180-6, Mar. 1999.

-
-
- 78 ROSS, R. et al. Involvement of NO in contact hypersensitivity. **Int. Immunol.**, v.10, n.1, p.61-9, Jan. 1998.
- 79 ROSSOMANDO, E.F.; KENNEDY, J.E.; HADJIMICHAEL, J. Tumour necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. **Arch. Oral Biol.**, v.35, n.6, p.431-4, 1990.
- 80 SEYMOUR, G.J. Possible mechanisms involved in the immunoregulation of chronic inflammatory periodontal disease. **J. dent. Res.**, v.66, n.1, p.2-9, Jan. 1987.
- 81 SEYMOUR, G.J. Importance of the host response in the periodontium. **J. Clin. Periodontol.**, v.18, n.6, p.421-6, July 1991.
- 82 SICHER, S.C.; VAZQUEZ, M.A.; LU, C.Y. Inhibition of macrophage Ia expression by nitric oxide. **J. Immunol.**, v.153, n.3, p.1293-300, Aug. 1994.
- 83 SHAPIRA, L. et al. Experimental stress suppresses recruitment of macrophages but enhanced their *P. gingivalis* LPS- stimulated secretion of nitric oxide. **J. Periodont.**, v.71, n.3, p.476-479, Mar. 2000.
- 84 STASHENKO, P. et al. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. **J. Periodont.**, v.62, n.8, p.504-9, Aug. 1991.
- 85 STUEHR, D.J.; MARLETTA, M. A. Mammalian nitrate biosynthesis:

- mouse macrophage produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proc. natl. Acad. Sci. (Wash.)**, v.82, n.22, p.7738-42, Nov. 1985.
- 86 TAKEICHI, O. et al. Cytokine regulation on the synthesis of nitric oxide in vivo by chronically infected human polymorphonuclear leucocytes. **Immunology**, v.93, n.2, p.275-80, Feb. 1998.
- 87 TANNENBAUM, S.R.; FETT, D.; YOUNG, V.R. Nitrite and nitrate are formed by endogenous synthesis in the human intestine. **Science**, v.200, n.30, p.1487-9, June 1978.
- 88 TASKIRAN, D. et al. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. **Biochem. biophys. Res. Commun.**, v.200, n.1, p.142-48, Apr. 1994.
- 89 TAYLOR-ROBINSON, A. W. et al. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. **Eur. J. Immunol.**, v.24, n.4, p.980-4, Apr. 1994.
- 90 VAN DER VEEN, R.C. et al. Nitric oxide inhibits the proliferation of T-helper 1 and 2 lymphocytes without reduction in cytokine secretion. **Cell. Immunol.**, v.193, n.2, p.194-201, May 1999.
- 91 VAN DER ZEE, E.; EVERTS, V.; BEERTSEN W. Cytokine modulate routes of collagen breakdown. Review with special emphasis on mechanisms of collagen degradation in the periodontium and the burst hypothesis of periodontal disease progression. **J. Clin.**

Periodontol., v.24, n.5, p.297-305, May 1997.

- 92 WALSH, L.J. et al. Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. **J. Oral Pathol. Med.**, v.24, n.6, p.266-72, July 1995.
- 93 WEBB, J.L.; POLAK, J.M.; EVANS, T.J. Effect of adhesion on inducible nitric oxide synthase (iNOS) production in purified human neutrophils. **Clin. Exp. Immunol.**, v.123, n.1, p.42-8, Jan. 2001.
- 94 WEI, X. et al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature**, v.375, n.1-6530, p.408-11, June 1995.
- 95 WEINBERG, J.B. et al. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. **Blood**, v.86, n.2, p.1184-95, Aug. 1995.
- 96 WIEBE, S.H. et al. Osteoclast activation in inflammatory periodontal diseases. **Oral Dis.**, v.2, n.2, p.167-80, June 1996.
- 97 WILSON, M.; REDDI, K.; HENDERSON, B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. **J. Periodontal Res.**, v.31, n.6, p.393-407, Aug. 1996.
- 98 YAMAMOTO, M. et al. Molecular and cellular mechanisms for periodontal disease: role of Th1 and Th2 type cytokines in

*induction of mucosal inflammation. **J. Periodontal Res.**, v.32, n.1, p.115-9, Jan. 1997.*

- 99 YAMAZAKI, K.; NAKAJIMA, T.; HARA, K. *Immunohisto logical analysis of T cell functional subsets in chronic inflammatory periodontal disease. **Clin. Exp. Immunol.**, v.99, n.3, p.384-91, Mar. 1995.*

ABSTRACT

Study of the expression of nitric oxide inducible synthase enzyme (iNOS) in plaque-induced gingivitis and localized chronic periodontitis

ABSTRACT

In periodontal disease, bacterial products of the subgingival plaque diffuse through the periodontal tissue, inducing non-specific and specific defense mechanisms, with the consequent synthesis of various pro-inflammatory mediators, including nitric oxide (NO). The enzyme responsible for NO production, the NO synthase (NOS), has been identified in several cell types and the NO has a direct action on osseous metabolism and may also take on the tissue destruction and in immunopathological phenomena. In order to further characterize the presence of NO in human periodontal disease, we undertook a general and proportional quantitative study with statistical analysis of iNOS positive cells in samples of clinically healthy gingival tissues, plaque-induced gingivitis and localized chronic periodontitis using immunohistochemistry. A significant increase in the number of iNOS⁺ cells per mm² was found in the samples of the gingivitis and periodontitis compared to those of the control. In all groups almost all of the iNOS⁺ cells were mononuclear demonstrating weak to moderate immunoreactivity. Conversely, polymorphonuclear cells showed intense immunoreactivity for iNOS independent of the disease stage, and only the percentage of iNOS polymorphonuclear cells in the inflammatory infiltrate demonstrated a

significant increase when compared with the control. Taken together, our results indicate that NO augments in the presence of periodontal disease, which may be associated with the regulation of tissue destruction, bone resorption and immunopathological phenomena. In addition, our findings also suggest that the inflammatory cells present an additional activation pathway on inflammatory cells in the periodontal disease, specially of the polymorphonuclear cells, that it express significant iNOS and probably represent an important source of nitric oxide in human periodontal disease.

Apêndice

APÊNDICE 1

SORO-ALBUMINA BOVINA (BSA)	
Produto	Quantidade
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,38g
K_2HPO_4	6,96g
NaCl	7,2g

Quadro 2: Análise quantitativa das células imunomarcadas para a enzima iNOS nos diferentes grupos analisados					
TECIDO GENGIVAL CLINICAMENTE SAUDÁVEL (GRUPO I)					
LÂMINAS	Médias das análises dos examinadores 1 e 2				
	Médias das porcentagens			Médias dos números de células por mm ²	
	% Células iNOS ⁺	%PMN iNOS ⁺	%MN iNOS ⁺	Infiltrado inflamatório total	Células inflamatórias iNOS ⁺
1	2.85	2.85	0	713.48	0
2	4.75	4.75	0	1743.81	0
3	1.35	1.35	0	1047.42	5.66
4	0	0	0	883.23	5.66
5	0	0	0	1200.00	0
6	2.15	2.15	0	973.81	0
7	2.7	2.7	0	1698.51	84.26
8	0	0	0	503.96	0
9	0	0	0	141.56	0
10	0	0	0	203.85	11.32
11	0	0	0	90.60	0
12	0	0	0	169.87	0
13	2.85	2.85	0	164.21	11.32
GENGIVITE ASSOCIADA À PLACA DENTOBACTERIANA (GRUPO II)					
1	6.82	6.82	0	3906.58	147.2
2	3.4	3.4	0	3782.02	62.28
3	7.53	7.53	0	2548.13	33.97
4	1.25	1.25	0	3453.64	11.32
5	8.13	8.13	0	2434.88	45.30
6	1.1	1.1	0	3397.50	33.97
7	7.45	7.45	0	3736.73	45.29
8	20.42	20.42	0	2944.50	22.65
9	4.1	4.1	0	5707.00	39.63
10	2.3	2.3	0	1254.64	113.23

Continuação Quadro 2

11	5.00	5.00	0	2525.12	28.31
12	14.26	14.26	0	3091.30	50.95
13	1.55	1.55	0	6205.24	11.32
14	4.04	4.04	0	1709.84	5.66
15	1.30	1.30	0	2525.12	5.66
16	4.35	4.35	0	3397.50	0
17	2.95	2.95	0	1777.78	0
18	4.73	4.73	0	4246.88	84.93
19	4.5	4.5	0	5039.63	28.31
PERIODONTITE CRÔNICA LOCALIZADA (GRUPO III)					
1	3.60	3.60	0	5559.80	11.32
2	8.02	8.02	0	9003.39	79.26
3	10.68	10.68	0	5118.19	73.60
4	4.40	4.40	0	5106.06	84.92
5	2.87	2.87	0	4812.45	16.98
6	6.69	6.69	0	9239.91	79.26
7	9.93	9.93	0	9907.99	73.60
8	4.7	4.7	0	9794.76	11.32
9	9.11	9.11	0	3566.88	56.62
10	4.00	4.00	0	4314.22	0
11	9.25	9.25	0	3091.30	50.95
12	8.96	8.96	0	6771.41	141.54
13	4.01	4.01	0	2276.01	0
14	5.68	5.68	0	5876.86	56.62
15	2.05	2.05	0	5096.26	56.62
16	1.50	1.50	0	3159.23	5.66
17	9.29	9.29	0	5436.01	56.62
18	6.90	6.90	0	5084.93	73.60
19	9.93	9.93	0	4982.31	50.95

Quadro 3: Informações gerais contidas nas fichas clínicas referentes às amostras

TECIDO GENGIVAL CLINICAMENTE SAUDÁVEL (GRUPO I)				
Número	Gênero	Idade	Raça	Procedência do espécime
1	F	43	Branca	Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais Dra. Carmen Daniela G. da Silva
2	M	49	Negra	Faculdade de Odontologia de Três Corações Dr. Adair Ribeiro
3	M	37	Branca	Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais Dra. Carmen Daniela G. da Silva
4	F	30	Negra	Clínica de Cirurgia (USC) Dr. Paulo Domingos Ribeiro Jr.
5	M	72	Amarela	Clínica Particular Dr. Cássio Roberto R. dos Santos
6	M	42	Negra	Clínica de Cirurgia (USC) Dr. Ricardo Falcão Tuler
7	F	53	Branca	Clínica de Periodontia (FOB-USP) Dra. Marinele R. de Campos
8	F	15	Branca	Clínica de Periodontia (FOB-USP) Dra. Luciana C. Gentile
9	F	20	Branca	Clínica de Cirurgia (USC) Dr. Roberto M. Kawakami
10	M	71	Branca	Clínica de Periodontia (FOB-USP) Dr. Pedro Teixeira G. Coesta
11	F	20	Branca	Clínica de Cirurgia (USC) Dr. Roberto M. Kawakami
12	F	21	Branca	Clínica de Cirurgia (USC) Dr. Ricardo Falcão Tuler
13	M	18	Branca	Clínica Particular Dr. Sérgio L. V. Bruzadin
GENGIVITE ASSOCIADA À PLACA DENTOBACTERIANA (GRUPO II)				
1	F	24	Branca	Clínica de Periodontia (FOB-USP) Dr. Fábio Luis de M. Lima
2	F	32	Branca	Clínica de Cirurgia (USC) Dr. Hugo Nary Filho
3	F	47	Branca	Clínica de Periodontia (FOB-USP)

Continuação Quadro 3

4	F	20	Branca	Dr. Pedro Teixeira G. Coesta Clínica Particular Dr. José Antônio Rebouças de Carvalho Jr.
5	F	25	Branca	Clínica de Cirurgia (USC) Dr. Ricardo Falcão Tuler
6	F	23	Negra	Clínica de Cirurgia (USC) Dr. Paulo Domingos Ribeiro Jr.
7	F	34	Branca	Clínica de Periodontia (UERJ) Dr. Andréia Lombardi da Silva
8	F	25	Branca	Clínica de Cirurgia (FOB-USP) Dr. Osny Ferreira Jr.
9	M	52	Branca	Clínica de Cirurgia (USC) Dr. Aparício Fiúza de Carvalho Dekon
10	F	18	Branca	Clínica de Periodontia (FOB-USP) Dra. Luciana C. Gentile
11	F	17	Branca	Clínica de Periodontia (FOB-USP) Dr. Renata Rodrigues de Freitas
12	F	32	Branca	Clínica de Cirurgia (USC) Dr. Hugo Nary Filho
13	M	25	Branca	Clínica de Periodontia (FOB-USP) Dr. Flávio Seabra
14	F	18	Branca	Clínica de Periodontia (FOB-USP) Dra. Luciana C. Gentile
15	F	26	Branca	Clínica de Cirurgia (USC) Dr. Ricardo Falcão Tuler
16	M	54	Branca	Clínica Particular Dra. Eliene Bim Bahia
17	M	32	Branca	Clínica Particular Dr. João Batista G. Intra
18	M	17	Branca	Clínica de Cirurgia (USC) Dr. Hugo Nary Filho
19	F	16	Branca	Clínica de Periodontia (FOB-USP) Dr. Fábio Luis de M. Lima
PERIODONTITE CRÔNICA LOCALIZADA (GRUPO III)				
1	F	24	Branca	Clínica de Cirurgia (USC) Dr. Paulo Domingos Ribeiro Jr.

2	M	59	Branca	Clínica Particular Dr. José Antônio Rebouças de Carvalho Jr.
3	F	39	Branca	Clínica Particular Dr. Maurício Rigolizzo
4	F	69	Branca	Clínica de Cirurgia (USC) Dr. Eduardo S. Gonçalves
5	F	19	Branca	Clínica de Cirurgia (USC) Dra. Mariza Akemi Matsumoto
6	F	52	Branca	Clínica de Cirurgia (USC) Dr. Hugo Nary Filho
7	F	40	Branca	Clínica particular Dra. Gesilda Correia de Melo
8	F	43	Branca	Clínica de Cirurgia (USC) Dr. Ricardo Falcão Tuler
9	F	49	Branca	Clínica de Cirurgia (USC) Dra. Mariza Akemi Matsumoto
10	F	23	Negra	Clínica de Cirurgia (USC) Dr. Eduardo S. Gonçalves
11	F	44	Negra	Clínica Particular Dr. José Antônio Rebouças de Carvalho Jr.
12	M	47	Negra	Clínica particular Dr. Helano Carneiro
13	M	31	Amarela	Clínica de Periodontia (FOB-USP) Dr. Daniel Resende
14	F	58	Branca	Clínica Particular Dr. José Antônio Rebouças de Carvalho Jr.
15	F	38	Branca	Clínica de Cirurgia (USC) Dr. Eduardo S. Gonçalves
16	M	43	Branca	Clínica Particular Dr. José Antônio Rebouças de Carvalho Jr.
17	F	38	Branca	Clínica Particular Dr. José Antônio Rebouças de Carvalho Jr.
18	F	74	Branca	Clínica Particular Dra. Lidiane de Castro Pinto
19	F	20	Branca	Clínica de Cirurgia (USC) Dr. Ricardo Falcão Tuler