



CEPPE

Centro de Pós-Graduação e Pesquisa

MESTRADO EM ODONTOLOGIA

MARCELA ANDRADE TUCCI

**EXPRESSÃO GÊNICA DAS METALOPROTEINASES (MMPs) 1, 2, 8, 9 E SEUS
INIBIDORES TIMP-1 E TIMP-2 EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE CRÔNICA
FUMANTES E/OU DIABÉTICOS.**

Guarulhos

2012

MARCELA ANDRADE TUCCI

**EXPRESSÃO GÊNICA DAS METALOPROTEINASES (MMPS) 1, 2, 8,
9 E SEUS INIBIDORES TIMP-1 E TIMP-2 EM INDIVÍDUOS COM
PERIODONTITE CRÔNICA FUMANTES E/OU DIABÉTICOS.**

Dissertação apresentada à Universidade
Guarulhos para obtenção do título de mestre em
Odontologia
Área de Concentração: Periodontia.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Marta Ferreira Bastos

CO- ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Poliana Mendes Duarte

Guarulhos

2012

T886e

Tucci, Marcela Andrade

Expressão ressonância gênica da metaloproteinases (MMPS) 2, 8, 9 e seus inibidores TIMP-1 E TIMP-2 em Indivíduos com periodontite crônicas fumantes e/ou diabéticos / Marcela Tucci Andrade. Guarulhos, 2012.

126 f; 31 cm

Dissertação (Odontologia) – Centro de Pós - Graduação e Pesquisa,
Universidade de Guarulhos, 2012.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marta Ferreira Bastos


Bibliografia: f. 96 - 121

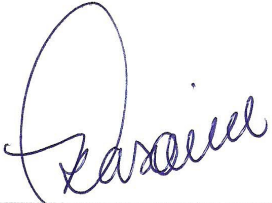
1. Periodontite 2. Crônica 3. Tabagismo 4. Diabete, 5. Metaloproteinases e TIMPs. I. Título. II. Universidade de Guarulhos.


CDD - 617

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada "EXPRESSÃO GÊNICA DAS METALOPROTEINASES (MMPS) 1, 2, 8, 9 E SEUS INIBIDORES TIMP-1 E TIMP-2 EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE CRÔNICA FUMANTES E/OU DIABÉTICOS" em sessão pública realizada em 27 de Fevereiro de 2012, considerou a candidata MARCELA ANDRADE TUCCI aprovada.

COMISSÃO EXAMINADORA:

1. Profa. Dra. Marta Ferreira Bastos (UnG) 

2. Prof. Dr. Renato Casarin (UNIP) 

3. Prof. Dr. Marcelo de Faveri (UnG) 

Guarulhos, 27 de Fevereiro de 2012.

“Logic Will get you from A to B. Imagination will take you everywhere.”

Albert Einstein

Dedico mais esta conquista aos meus pais Rose e Tucci por terem me ensinado desde cedo que o conhecimento é o único bem que ninguém nunca poderá tirar de mim.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente Deus por ter me dado força e sabedoria para que eu pudesse chegar até aqui e aos meus pais por lutarem e sonharem comigo sempre que busquei alcançar algo novo e por terem me proporcionado o tesouro mais precioso que poderiam me dar: o Conhecimento.

Aos meus avós, Antonio e Tereza, por terem me recebido em sua casa, me deram carinho e me apoiaram para seguir nessa luta.

Ao meu irmão Breno por ter me ajudado nesta pesquisa, pelos conselhos e momentos de alegria compartilhados.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a Marta Bastos, que acreditou no meu potencial, pelos ensinamentos passados e principalmente pela paciência em repetir todas as vezes quanto fossem preciso para que eu pudesse entender esse mundo tão maravilhoso da Biologia Molecular, muito obrigada.

Obrigada também para minha co-Orientadora Prof^a. Dr^a. Poliana Duarte por todas as orientações e auxílios na pesquisa e por todos os conselhos para ser uma profissional melhor.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Faveri e a Prof^a. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo pelas “dicas” e paciência na clínica de periodontia

Minha total gratidão aos professores do mestrado acadêmico em Odontologia Prof^a. Dr^a. Magda Feres, Prof. Dr. Jamil Awad Shibli, Prof. Dr. José Augusto Rodrigues, Prof^a. Dr^a. Alessandra Cassoni Ferreira, Prof^a. Dr^a. Claudia Ota Tsuzuki, Prof. Dr. André Figueiredo Reis, Prof. Dr. Cesar Augusto Galvão Arrais, Prof. Dr. Kenitiro Suguio por terem contribuído tão grandiosamente nos meus conhecimentos em odontologia.

Muito obrigada a minha parceira Ariane Siqueira que além de ser minha amiga dividiu essa tarefa comigo e por me ajudar a organizar “as coisas” sempre que o caos se instaurou. Agradeço também aos meus amigos da periodontia: Jadson, Rafael, Marcelo e Renata pelas horas de risadas juntos, e por dividirem suas experiências profissionais comigo.

Cintia, Cristina, Samanta e Izilvania muito obrigada pelo carinho com qual sempre me ajudaram.

Ao meu namorado Dafner, agradeço pelo amor e paciência a que me dedicas e a sua família que me recebeu como se fosse um deles.

Aos participantes da pesquisa, sem sua valiosa contribuição nada disso seria possível.

À FAPEAM e a FAPESP pelo apoio financeiro para que eu pudesse buscar o conhecimento e aprimoramento.

E finalmente agradeço a todos os meus amigos que, muitas vezes sem saber de que eu estava falando, me ouviram falar sem parar de meu trabalho e, mesmo sem entender muito, me deram força e coragem para continuar.

RESUMO

A periodontite crônica é uma doença multifatorial que atinge grande parte da população adulta. Contudo os mecanismos pelos quais alguns fatores de risco como o tabagismo e a Diabetes melito interferem na progressão desta doença, ainda não foram totalmente esclarecidos. O principal elemento perdido na destruição do tecido periodontal é o colágeno cujo *turnover* é mediado pelas metaloproteinases de matriz (MMP) e seus inibidores (TIMP). O presente estudo avaliou a expressão gênica das MMPs-1, 2, 8, 9 e TIMP-1 e 2 em sítios com periodontite crônica de indivíduos fumantes e/ou diabéticos tipo II descompensados (hemoglobina glicada > 7,9%). Sessenta e uma biopsias gengivais foram coletadas de indivíduos pertencentes aos seguintes grupos: Grupo I: não fumantes e não diabéticos com periodontite crônica (n=15); Grupo II: fumantes com periodontite crônica (n=17); Grupo III: diabéticos descompensados com periodontite crônica (n=17) e Grupo IV: diabéticos-fumantes com periodontite crônica (n=12). A expressão do RNAm para MMP-1, 2, 8, 9, TIMP-1 e 2 foram avaliados por PCR quantitativo. Indivíduos do Grupo I apresentaram os menores níveis de RNAm para MMP-8 quando comparados aos fumantes e/ou diabéticos. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para os níveis de RNAm para TIMP-2. Em geral, diabéticos (Grupo III e IV) apresentaram maiores níveis de RNAm para MMP-1, 2, 9 e TIMP-1 ($p < 0.05$), quando comparado com aos indivíduos do grupo II. Coletivamente, estes dados sugerem que, embora tabagismo e diabetes sejam reconhecidos como fatores de risco para a periodontite, os mecanismos imuno-inflamatório pelos quais interferem na patogênese da periodontite crônica parecem ser diferentes.

Palavras-chave: periodontite crônica, tabagismo, diabetes, metaloproteinases e TIMPs.

ABSTRACT

Chronic periodontitis is a multifactorial disease that affects mostly of the adult population. However the mechanisms by in which risk factors such as smoking and diabetes mellitus that interfere the progression of this disease were not totally clarified. The main lost element lost in the periodontal tissue destruction is the collagen, that turnover is mediate by matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors TIMPs. This study evaluated the gene expression of MMP-1, 2, 8, 9 and TIMP-1 and 2 in sites of smokers individuals with chronic periodontitis and/or uncompensated type II diabetics (glycosylated hemoglobin > 7, 9%). Sixty-one gingival biopsies were collected from individuals with the following medical conditions: no smokers and no diabetics risk factors for chronic periodontitis (n = 15), smokers with chronic periodontitis (n = 17), decompensated diabetics with chronic periodontitis (n = 17) and diabetic smokers with chronic periodontitis (n = 12). The mRNA expression for MMP-1, 2, 8, 9, TIMP-1 and 2 were evaluated by quantitative PCR. Individuals without risk factors had the lowest levels of mRNA for MMP-8 compared to smokers and/or diabetic. There were no significant differences between groups for levels of mRNA for TIMP-2. In general, diabetics had higher levels of mRNA for MMP-1, 2, 9, and TIMP-1 ($p < 0.05$) when compared to participants who smoked but were not diabetic. Diabetics and smokers, jointly or separately, increased the expression levels of MMP-8 at sites with chronic periodontitis. Collectively, these data suggest that although smoking and diabetes are recognized as risk factors for periodontitis, immune-inflammatory mechanism by which interfere in the pathogenesis of chronic periodontitis seem to be different.

Key words: chronic periodontitis, smoking, diabetes, metalloproteinases and TMPS.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	11
1.1 Doença Periodontal	11
1.2 Metaloproteínases de Matriz	13
1.3 Metaloproteínases de Matriz e a Doença Periodontal	17
1.4 Fatores de risco para a Doença Periodontal	18
2. PROPOSIÇÃO	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 População estudada	26
3.2 Exames clínicos e laboratoriais	27
3.3 Seleção do sítio de coleta	29
3.4 Grupos Experimentais	29
3.5 Tratamento proposto para os sujeitos da pesquisa	29
3.6 Avaliação da expressão gênica	30
3.7 Análise estatística	33
4. RESULTADOS	35
4.1 Características Clínicas	35
4.2 Expressão Gênica	37
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença Periodontal

O periodonto é um complexo tecidual com a função de inserir o dente no tecido ósseo e manter a integridade da superfície da mucosa oral, é estruturalmente composto por elementos fibrosos, incluindo o colágeno, elastina e as glicoproteínas (laminina, fibronectina, elastina, osteocalcina, osteopontina, sialoproteínas, osteonectina e tenascina). Pode ser dividido em: periodonto de proteção (gengiva) e periodonto de sustentação (ligamento periodontal, cemento e osso alveolar). Quando sadio apresenta coloração rósea, superfície opaca, consistência firme e ausência de sangramento (Lindhe et al., 2005).

O termo doença periodontal (DP) abrange uma variedade de condições que afetam a saúde do periodonto, as quais diferem entre si pela etiologia, história natural, progressão da doença e resposta à terapia. Quando a alteração afeta o periodonto de proteção designa-se gengivite e periodontite quando atinge também o periodonto de sustentação (American Academy of Periodontology, 1999).

São considerados agentes etiológicos primários da doença periodontal os microorganismos e seus subprodutos, na gengivite o biofilme é constituído por bactérias gram-positivas e gram-negativas e na periodontite basicamente por gram-negativas (Loesche et al., 1985). A Academia Americana de Periodontia considera somente a *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e o *Agregatibacter actinomycetemcomitans* como verdadeiros patógenos periodontais (Armitage, 1999).

Na tentativa de uma melhor caracterização do perfil microbiológico das DPs, diversos estudos têm realizado análises de indivíduos com periodontite crônica, sendo demonstrado que microorganismos ainda não cultivados como *Selenomonas sp. EW084*, *Prevotella sp. AH125*, *TM7 sp. AH040/BS002*, *Tannerella sp. BU063* e *Peptostreptococcus sp. DA014* apresentam-se em grandes quantidades, proporções e prevalências nos indivíduos com periodontite crônica quando comparados aos saudáveis. O que indica que outros microorganismos também podem estar

envolvidos no início e progressão das periodontites e, possivelmente, podem ser patógenos periodontais (Kumar et al., 2006; Paster et al., 2006; Favari et al., 2008; Colombo et al., 2009; Telles et al., 2011; Oliveira, 2011).

Os microorganismos envolvidos nas DPs podem fazer a destruição do periodonto de forma direta, por meio da invasão tecidual e produção e/ou liberação de substâncias nocivas, como lipopolissacarídeos, amônia, indol, sulfeto de hidrogênio e ácido butírico, os quais induzem à morte celular e necrose tecidual (Offenbacher, 1996), ou indiretamente via ativação da resposta inflamatória. Além disto, tem sido descrito que o *P. gingivalis* e o *A. actinomycetemcomitans* alteram a força de adesão dos anticorpos IgG e IgA interferindo na resposta de defesa a agressão (Kinane et al., 1999).

A gengivite é clinicamente caracterizada por vermelhidão do tecido periodontal, sangramento, edema, mudanças no contorno gengival, perda de adaptação do tecido aos dentes, e maior fluxo de fluido crevicular gengival (GCF). Observações histopatológicas têm levado à subdivisão da gengivite em 3 estágios: lesão inicial, na qual os componentes bacterianos e/ou seus produtos penetram o tecido conjuntivo subjacente e promovem as alterações de inflamação gengival. Os pequenos vasos sanguíneos do epitélio juncional passam a apresentar uma maior permeabilidade e com isso ocorre um aumento no número de neutrófilos que saem dos vasos e migram através epitélio juncional. Concomitante a isto também ocorre a perda de pequenas quantidades de colágeno (Schroeder; Listgarten, 1997).

Se o persistir, inicia-se o segundo estágio que é conhecido como lesão precoce, na qual o processo inflamatório rompe a união entre a porção mais coronal do epitélio juncional e a superfície da raiz e estende-se para o sulco gengival, formando uma bolsa rasa (Page; Kornman, 1997). Nesta fase, ainda não há formação da bolsa periodontal, porém foi formado um acesso que permite às bactérias interagirem com os tecidos conectivos e, assim ativar a produção de IL-8 pelas células epiteliais. Conseqüentemente, ocorre o aumento da expressão de moléculas de adesão, o que resulta no aumento da migração de leucócitos, formação do edema e de um infiltrado de células inflamatórias. O terceiro estágio denominado lesão estabelecida é caracterizado pela presença de linfócitos B e plasmócitos e pela ativação dos macrófagos (Schroeder; Listgarten, 1997).

A periodontite é clinicamente diferenciada da gengivite pela destruição do ligamento periodontal, com consequente contaminação do cemento radicular e reabsorção óssea da crista alveolar. O infiltrado inflamatório presente no tecido gengival inicia a destruição tecidual óssea por meio da liberação de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 β , fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e as prostaglandinas (Page, 1991). Os macrófagos ativados por lipopolissacárideos produzem a IL-1 β , metaloproteinases de matriz (MMPs) e prostaglandinas, que induzem a diminuição da produção de inibidores de metaloproteinases tecidual (TIMPs). O aumento dos níveis relativos de MMPs, promove a destruição de componentes da matriz extracelular (MEC), o que permite a disseminação do infiltrado celular e como consequência uma maior destruição tecidual (Page; Kornman, 1997).

1.2 Metaloproteinases de Matriz

As MMPs pertencem ao grupo das proteases, enzimas que catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas, e têm sido associadas à degradação de quase todos os componentes da MEC e das membranas basais (colágeno intersticial, a fibronectina, a laminina e a proteoglicana). São denominadas proteases zinco-dependentes, ou seja, catalisam a quebra das ligações peptídicas específicas e possuem o sítio catalítico coordenado por um átomo de zinco (Stamentovik, 2000; Visse; Nagase, 2003).

Podem ser secretadas ou permanecer ancoradas à membrana na forma de pró-enzimas, cuja ativação envolve a perda de um pró-peptídeo de cerca de 80 aminoácidos, presente no N-terminal. Este pró-peptídeo também tem sido chamado de zimogênio, e tem como característica a presença de um aminoácido, o cisteína, capaz de suprimir a atividade do zinco e consequentemente das MMPs (Koch et al., 2009).

Todas as MMPs apresentam uma alta similaridade de organização dos domínios proteicos, a qual pode ser observada em diferentes formas de vida como vírus, arqueobactérias, helmintos e plantas (Gomis-Rüth, 2003). Em humanos, são

reconhecidos 25 membros da família de MMPs, reunidos e subdivididos de acordo com a quantidade e característica dos domínios protéicos funcionais (Kerkelã; Saarialho-Kere, 2003). Quanto à atividade funcional, as MMPs podem ser divididas em: collagenases verdadeiras, responsáveis pela quebra do colágeno; gelatinases que fazem a desnaturação do colágeno e gelatinas; e estromielisinas que degradam moléculas de proteoglicanas (Overall, 2001).

Na porção N-terminal há um peptídeo sinal, responsável pelo direcionamento das MMPs para via secretória da síntese proteica, um pró-peptídeo (domínio zimogênico) de cerca de 80 aminoácidos, um domínio catalítico com cerca de 165 aminoácidos, um átomo de zinco altamente conservado e uma região flanqueadora constituída de 15 a 65 aminoácidos. No C-terminal pode ser encontrada a região tipo hemopexina, necessária para a degradação da estrutura em tripla hélice do colágeno. As MMPs que permanecem ligadas a membrana (MT-MMPs) apresentam também um domínio citosólico que permite sua ancoragem na membrana plasmática e as gelatinases apresentam também repetições de fibronectinas, responsáveis pela ligação com a gelatina. Uma representação esquemática dos domínios que constituem as diferentes classes de MMPs pode ser observada na Fig. 01 (Maskos, 2005; Sela- Passwell et al., 2010).

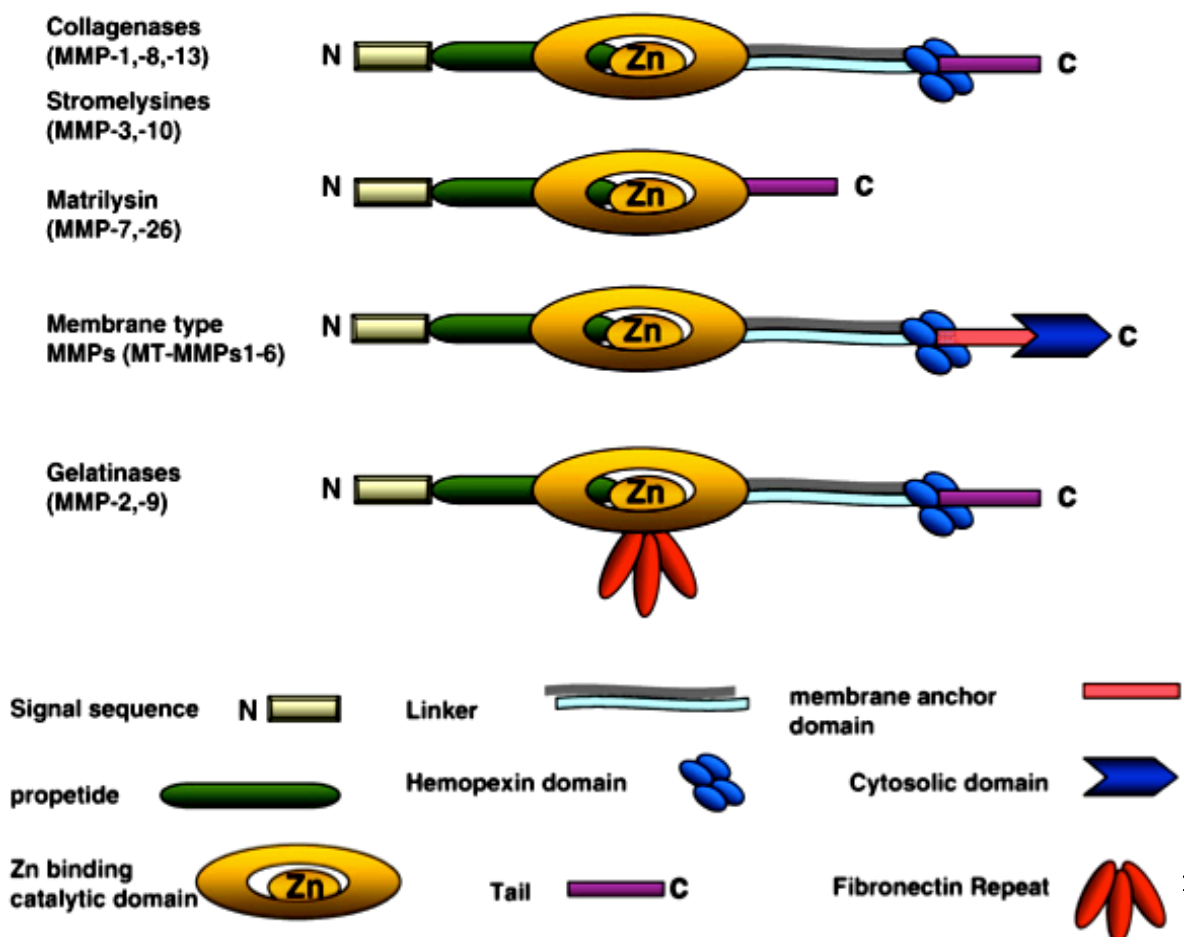


Figura 1: Organização dos domínios protéicos presentes nas diferentes classes de MMPs (Sela-Passwell et al., 2010).

A maioria das MMPs é expressa após estímulo de citocinas ou fatores de crescimento, essas enzimas são estocadas em grânulos presentes em células inflamatórias, principalmente nos neutrófilos. Uma vez secretadas ou ligadas à membrana, a atividade proteolítica das MMPs pode ser regulada por inibidores endógenos denominados TIMPs. Até o momento foram descritos quatro inibidores (TIMP-1 a TIMP- 4) que realizam a inibição da atividade catalítica das MMPs pela inserção de uma região bloqueadora no sítio catalítico da enzima, o que impede a entrada e degradação do substrato (Murphy, 1991). O equilíbrio entre a produção de MMPs e de TIMPs representa um ponto importante para manter a homeostase da MEC (Trenkove et al., 1999; Gill; Parks, 2008).

As MMPs são conhecidas por sua atividade regulatória em processos fisiológicos como reparo tecidual, ovulação, implantação de blastocisto, cicatrização e reabsorção óssea (Tallant et al., 2010), e desta forma, podem decompor e regular a atividade biológica de fatores de crescimento, citocinas, receptores de superfície celular e inibidores de protease (Tam et al., 2004; Page- McCaw et al., 2007).

Quando ocorre uma atividade descontrolada das MMPs/TIMPs em processos patológicos, estas enzimas podem degradar a MEC e regular funções celulares críticas como a proliferação, diferenciação e migração celular (Page- McCaw et al., 2007). Essa atividade foi descrita nos processos patológicos de metástases tumorais, destruição tecidual nos processos inflamatórios, artrite reumatóide, doença pulmonar obstrutiva crônica e distúrbios neurológicos (Yu; Stamenkovic, 2000; Sternlich; Werb, 2001).

A MMP-1 ou colagenase-1 foi a primeira MMP descrita e, a partir desta, gerou-se um grande número de estudos sobre o papel fisiológico e patológico das MMPs. Enquanto a pró MMP-1 pode ser ativada por processos proteolíticos envolvendo enzimas, como: triptase de mastócitos ou uroquinase e MMP-3, a enzima ativa pode ser inibida por TIMP-1 (Gruber et al., 1989). D'Armieto et al. (1991, 1992) sugeriram a participação da MMP-1 também em doenças pulmonares e distúrbios dermatológicos após estudos com ratos *knockout* para MMP-1. A atividade desregulada da MMP-1 tem sido descrita em processos patológicos como os encontrados nas fibroses e distúrbios de cicatrização (Iredale et al., 1998; Benbow et al., 1999; Brinckerhoff et al. 2000; Vincenti; Brinckerhoff, 2002).

A MMP-8 é conhecida como colagenase neutrofílica ou colagenase-2, e foi descrita pela primeira vez, em 1990, após clonagem realizada a partir de neutrófilos obtidos de um portador de leucemia granulocítica (Hasty et al., 1990). Ao contrário da MMP-1, a MMP-8 não é liberada imediatamente após a síntese, mas sim armazenada em grânulos específicos e que a liberam durante a resposta inflamatória (Schettler et al., 1991). A auto degradação proteolítica da MMP-8 tem sido descrita como responsável por gerar um fragmento de 40-kDa, que mantém a atividade catalítica, mas não a função de quebrar o colágeno fibrilar (Knäuper et al., 1996). Apresenta estrutura e função fisiológica muito semelhante a MMP-1, embora existam diferenças sutis na seletividade de substrato. A MMP-8 possui grande afinidade pelo o colágeno tipo I, enquanto a MMP-1 cliva preferencialmente colágeno tipo III (Balbin et al., 1998). A MMP-8 pode ser ativada pela remoção proteolítica do pró-domínio pela MMP-3 e MMP-7, e sua atividade é inibida tanto por TIMP-1 quanto por TIMP-2 (Knäuper et al., 1993; Dozier et al., 2006).

Estudos experimentais demonstraram que a atividade descontrolada da MMP-8 é capaz de degradar o inibidor da α 1-proteinase, enzima responsável por manter a elasticidade do pulmão. Desta maneira uma atividade desregulada da MMP-8 pode estar relacionada com doenças fibrosas como o enfisema (Desrochers et al., 1992). Além disto, a MMP-8 tem sido envolvida em vários processos inflamatórios destrutivos, como a arterosclerose, na qual foram observados níveis mais elevados da atividade destas enzimas em placas vulneráveis quando comparada as placas estáveis (Stadlmann et al., 2003; Herman et al., 2001; Molloy et al., 2004).

A MMP-2, conhecida como gelatinase A ou colagenase tipo IV, é uma das duas gelatinases humanas descritas, e possui capacidade de degradar gelatina, colágeno tipo I, IV e V, elastina e fibronectina. Foi inicialmente descrita em processo inflamatório, devido sua atividade na liberação de mediadores pró-inflamatórios, como a forma ativa da interleucina-1 β (Schönbeck et al., 1998), molécula que pode induzir à apoptose de células endoteliais e inibir a neovascularização (Shapiro et al., 2010).

A MMP-9 ou gelatinase B, também conhecida como colagenase tipo IV, é expressa na forma de uma pro-enzima 92-kDa que quando ativada é convertida para a forma de 83kDa, e pode ser ativada por MMP-3 ou diretamente por estresse

oxidativo (Ogata et al., 1992; Maeda et al., 1998). Esta enzima desempenha um papel importante na ativação de IL-8, IL-1 β e modifica o fator transformador do crescimento- β (TGF- β) (Chakrabarti; Patel, 2005). O desequilíbrio na atividade da MMP-9 foi relacionado com o desenvolvimento de doenças pulmonares e em distúrbios de fertilidade em mulheres (Dubois et al., 2000; Liu et al., 2000; Chakrabarti; Patel, 2005; Ezhilarasan et al., 2009).

O papel da MMP-9 na doença pulmonar obstrutiva crônica foi bem esclarecido, na qual o excesso desta enzima tem sido relacionado com a severidade e progressão da doença (Liu et al., 2000; Chakrabarti; Patel, 2005). Ezhilarasan et al. (2009) demonstraram em ratos *knockout*, para esta enzima, uma diminuição do número de neutrófilos, linfócitos e células dendríticas no fluido bronco alveolar. Outra atividade descrita para MMP-9 é a de remodelação do tecido endometrial durante os ciclos menstruais. Dubois et al. (2000) demonstraram que ratas fêmeas que não expressavam MMP-9 apresentavam fertilidade diminuída.

1.3 Metaloproteinases e a doença periodontal

A destruição dos tecidos periodontais resulta da ativação da resposta inflamatória do hospedeiro frente ao desafio bacteriano. Estudos têm demonstrado que uma atividade descontrolada de mediadores inflamatórios é capaz de estimular a reabsorção óssea e danificar os tecidos moles (Offenbacher, 1996; Chakrabarti; Patel, 2005; Almasri et al., 2007; Ramseier et al., 2009; Kaner et al., 2009; Ezhilarasan et al., 2009; Hernández et al., 2010; Watson et al., 2010)

Os fibroblastos gengivais, queratinócitos, macrófagos residentes e leucócitos polimorfonucleares, são capazes de expressar MMPs, porém níveis elevados destas enzimas no tecido periodontal podem provocar um desequilíbrio entre a produção e degradação do colágeno, que conseqüentemente pode levar a perda de inserção dental (Golub et al., 1997; Hernández et al., 2010). Entretanto, o significado patofisiológico do aumento da expressão das MMPs na periodontite crônica depende da regulação de sua atividade por enzimas ativadoras e inibidores endógenos (Sorsa et al., 2004).

Por meio da análise da expressão gênica por *Reverse Transcription polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), Kubota et al. (2008) avaliaram os níveis de expressão das MMP-1, 3, 9 e 13 e seus inibidores TIMP-1, 2, 3, e 4 em amostras de tecido gengival de indivíduos com periodontite crônica generalizada e sem doença periodontal. Estes autores demonstraram que níveis significativamente maiores de MMP-1 e TIMP-4, e das proporções MMP-1/TIMP-2, MMP-3/TIMP-2, MMP-9/TIMP-2 e MMP-1/TIMP-3 foram encontrados nas biópsias dos indivíduos com periodontite.

Mais recentemente, Isaza-Guzmán et al. (2011) avaliaram por ELISA, os níveis de MMP-9 e TIMP-1 em amostras de saliva de 103 indivíduos com e sem doença periodontal. Estes autores também observaram um aumento da concentração destas proteínas e da proporção de MMP-9/TIMP-1 nos indivíduos com periodontite crônica quando comparado aos que não tinham a doença.

Em relação à expressão de MMP-8 na DP os estudos são controversos. Segundo Kuula et al. (2009) haveria um papel protetor da MMP-8 na periodontite crônica. Os autores observaram que camundongos *knockout* para MMP-8 apresentaram uma maior perda óssea quando comparados aos animais que expressavam a MMP-8. Yakob et al. (2011), contudo não detectaram diferenças significativas nos níveis de MMP-8 no fluido crevicular gengival de indivíduos com e sem periodontite crônica.

Em contra partida, Ramseier et al. (2009) analisaram os níveis de várias citocinas pró-inflamatórias e de mediadores relacionados a reabsorção e remodelação óssea em amostras de saliva de indivíduos sistemicamente saudáveis com e sem doença periodontal. Os autores demonstraram níveis mais elevados de MMP-8 e 9 nos participantes do estudo que apresentavam periodontite crônica quando comparado aos indivíduos sem a doença. Gursoy et al. (2010) também encontraram níveis mais elevados de MMP-8 e TIMP-1 em amostras de saliva de indivíduos com bolsas ≥ 4 mm quando comparados aos indivíduos sem doença periodontal. Em análises do fluido crevicular de 38 indivíduos com e sem periodontite crônica por 4 métodos diferentes (*time-resolved immunofluorometric assay*, *specific chair-side dip-stick test*, *dento Analyzer device* e ELISA), Sorsa et al. (2010) encontraram um aumento nos níveis de MMP-8 em indivíduos com periodontite por todos os ensaios acima citados.

1.4 Fatores de risco para a doença periodontal

O termo fator de risco se refere a um comportamento pessoal associado a uma exposição ambiental ou uma característica inata associada com a probabilidade de uma doença acontecer e/ou de aumentar a gravidade desta doença (Loee et al., 1965).

A doença periodontal é multifatorial e a destruição periodontal depende diretamente da interação entre os fatores genéticos, ambientais, microbiológicos e da resposta do hospedeiro. Portanto, mesmo que a presença do microorganismo seja crucial para o aparecimento da doença periodontal, a progressão da doença é resultado da interação entre os microorganismos e influenciada ainda pelos fatores de risco como: gênero, tabaco, e algumas doenças sistêmicas como diabetes melito (Barbour et al., 1997; Ponte et al., 2001; Bergström, 2003; Rivera, 2003; Kumar et al., 2006; Southerland et al., 2006; Almasri et al., 2007; Ryder, 2007; Kaner et al., 2009; Watson et al., 2010; Kim et al., 2011).

1.4.1 Tabagismo

O tabagismo é uma toxicomania caracterizada pela dependência física e psicológica do consumo de nicotina, substância presente no tabaco. As partículas condensadas de cigarro são compostas por milhares de produtos químicos, tais como: nicotina, cádmio, fenol, hidrocarbonetos, nitrosaminas, metais pesados e produtos químicos cancerígenos. Estas substâncias são potentes indutores de respostas inflamatórias e são tóxicos para vários tipos de células como os fibroblastos (Gao et al., 2005).

O hábito de fumar cigarro é considerado a segunda causa de morte no mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 2009), e também, tem sido associada a diversos tipos de câncer (pulmão, boca, laringe, faringe, esôfago, estômago, pâncreas, bexiga, rim, colo do útero e leucemia

mielóide aguda), doença pulmonar obstrutiva crônica, doença coronariana, hipertensão arterial e acidente vascular encefálico (Doll et al., 2004; Danaei et al., 2005; Department of Health and Human Service, 2006).

O tabagismo é reconhecido como um fator de risco para a doença periodontal, e sabe-se que indivíduos que fumam apresentam maior perda óssea e bolsas periodontais, mais profundas do que não fumantes. Além disto, tem sido observado que o resultado do tratamento da doença periodontal é menos favorável em fumantes (Rivera, 2003; Fang et al., 2005; Bergström; Boström, 2001; Ryder, 2007).

Uma das hipóteses geradas para explicar a gravidade da periodontite crônica nestes indivíduos estaria relacionada a uma alteração na microflora periodontal, porém, estes estudos apresentaram resultados controversos. Algumas pesquisas sobre o efeito do cigarro na microflora subgengival durante a periodontite crônica demonstraram pouca ou nenhuma diferença entre as espécies bacterianas observadas em fumantes e não fumantes (Darby et al., 2000; Bergström; Boström, 2001; Van der Velden et al., 2003). Resultados contrários foram descritos por outros autores, que identificaram diferenças entre a microflora oral subgengival de indivíduos fumantes quando comparada aos não fumantes, com maior prevalência de *P. gingivalis* nos tabagistas (Haffajee; Socransky, 2001; Teixeira et al., 2009).

Tem sido demonstrado que o hábito de fumar promove alterações na vascularização do tecido gengival em decorrência da vasoconstrição local ou de alterações dos níveis de oxigênio, uma vez que a fumaça do cigarro possui monóxido de carbono (Scott et al., 2001). Do ponto de vista clínico, em fumantes pode ser observada uma diminuição da coloração vermelha da gengiva, um menor sangramento durante a sondagem periodontal e uma diminuição da quantidade de vasos sanguíneos (Palmer et al., 2005). Também tem sido descrito que o fumo provoca aumento na síntese de algumas citocinas inflamatórias, entre elas, o TNF- α e IL-8; e que os neutrófilos que expressam receptores celulares para estas citocinas apresentam-se desregulados em indivíduos fumantes (Zeilhofer; Schorr, 2000; Akgul; Edwards, 2003). Além disto, a atividade proteolítica destas células encontra-se modificada nos indivíduos tabagistas e o recrutamento de neutrófilos para o periodonto aumenta os níveis de MMPs e elastases locais que podem alterar o

turnover do colágeno, diminuindo a síntese do colágeno e elevar ainda mais a síntese de MMPs (Palmer et al., 2005).

A presença de níveis alterados de MMPs em doenças relacionadas a um deficiente *turnover* do colágeno nos tabagistas foi demonstrada por estudo de Kaner et al. (2009) que avaliaram marcadores biológicos para estudar os fatores de risco para o desenvolvimento de doenças pulmonares em indivíduos com HIV. A expressão gênica de MMP-1, 2, 7, 9, 10, 12 e 14 no fluido pulmonar (n=52) foi determinada por PCR e foram observados níveis elevados destas enzimas em pacientes fumantes, independente de terem ou não o enfisema pulmonar. Watson et al. (2010) observaram uma maior proporção entre MMP-9/ TIMP-1 nos indivíduos asmáticos tabagistas e estes apresentavam uma progressão mais rápida e uma forma mais grave da asma quando comparados aos asmáticos que não fumavam. Pérez et al. (2011) em um estudo com ratos *knockout* para MMP-9 observaram que quando os ratos eram expostos a fumaça do cigarro expressavam duas vezes mais MMP-9 do que os ratos que não eram submetidos a este procedimento.

A nicotina é um dos agentes farmacologicamente ativos presentes na fumaça condensada do cigarro, e tem sido utilizada para estudar os efeitos do tabagismo sobre o tecido periodontal e a sua relação com as MMPs e TIMPs. César Neto et al. (2004) induziram a doença periodontal por ligadura em 27 ratos Wistar, e observaram por *Western blot* que ratos submetidos ao cigarro apresentavam níveis mais altos de MMP-2 e maior perda óssea quando comparados aos ratos que não eram submetidos ao cigarro.

A fim de avaliar o efeito do tabagismo bem como sua associação com a *P. gingivalis* na atividade das células gengivais fibroblásticas *in vitro*, Zhou et al. (2007) analisaram por zimografia e *Western blot* que partículas condensadas do cigarro (250 µg/mL) podem aumentar a degradação do colágeno por meio da ativação das MMP-2, 14 e TIMP-2. Mais recentemente Zhang et al. (2010) avaliaram por *Western blot* a influencia de várias concentrações de partículas condensadas do cigarro (0-800 µg/mL) sobre a atividade fibroblástica *in vitro* e observaram que há uma redução da atividade fibroblástica, um aumento dos níveis de MMP-2, MMP-14, TIMP-1 e redução da expressão de MMP-1, 8 e 9 para células expostas a concentrações superiores a 400 µg/mL quando comparadas ao controle.

Renó et al. (2011) avaliaram por RT-PCR a expressão gênica de MMP-2, 8 e 9 em queratinócitos isolados de tecido gengival de indivíduos fumantes e ex-fumantes. Os autores observaram que os níveis destas enzimas foram maiores nos indivíduos fumantes quando comparados aos ex-fumantes. Com a metodologia de ELISA, Ozçaka et al. (2011) avaliaram os níveis séricos de MMP-8, 9, TIMP-1, elastase neutrofílica (NE) e mieloperoxidase (MPO) em amostras de indivíduos com periodontite crônica tabagistas ou não, antes de qualquer intervenção periodontal. Foi observado que a concentração de TIMP-1 foi maior em não fumantes que fumantes, e que os níveis de MMP-8 e a proporção de MMP-9/TIMP-1 foram maiores nos fumantes do que em não fumantes.

Mouzakiti et al. (2011) avaliaram a expressão de MMP-1, 3, 8, 9, 13 e TIMP-1 em biopsias de 60 indivíduos com e sem doença periodontal, fumantes e não fumantes por RT-PCR. Os autores observaram uma diminuição da expressão destas MMPs para os indivíduos fumantes independente da presença da doença periodontal. Porém indivíduos fumantes com doença periodontal apresentaram níveis maiores de MMP-8, proporção MMP-8/TIMP-1 e MMP-1/TIMP-1 quando comparados aos fumantes sem doença periodontal.

1.4.2 Diabetes melito

Diabetes melito (DM) é uma doença crônica caracterizada por deficiência parcial ou total na produção de insulina ou por resistência à sua ação. Isso leva à anormalidade no metabolismo glicídico, protéico e lipídico, o que resulta na hiperglicemia que induz alterações microvasculares relacionadas à espessura da camada basal, remodelação tecidual, adesão celular, inflamação, nível de citocinas e fatores de transcrição que são responsáveis pelas complicações oculares, renais, neuronais e periodontais nos diabéticos (Mealey; Ocampo, 2007; Roy et al., 2010; Amir et al., 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, 1999) a DM pode ser classificada em: Tipo I, na qual ocorre a destruição das células beta do pâncreas, usualmente causada por um processo autoimune (forma auto-imune;

tipo 1A) ou menos comumente de causa desconhecida (forma idiopática; tipo 1B). O diagnóstico é mais comum em crianças e adolescentes, porém 15 a 30% dos casos são diagnosticados após os 30 anos de idade.

A DM Tipo II, abrange de 85% a 90% do total de casos e é caracterizada por distúrbios da secreção e da ação da insulina. A maioria dos pacientes possui excesso de peso e a cetoacidose ocorre apenas em situações especiais, como infecções graves. O diagnóstico, na maioria dos casos, é feito a partir dos 40 anos de idade, embora possa ocorrer mais cedo, mas raramente em adolescentes. A etiologia específica deste tipo de diabetes ainda não foi totalmente estabelecida, porém sabe-se que no início da doença, a produção de insulina está aumentada, resultando em hiperinsulinemia. Com a progressão deste quadro, a produção de insulina diminui e os pacientes passam a exibir uma deficiência de insulina associada à resistência insulínica periférica (Rhodes, 2005). Outro tipo descrito é a DM gestacional, definida como uma diminuição na tolerância aos carboidratos, com graus variados de intensidade, e é diagnosticada pela primeira vez durante a gestação, podendo ou não persistir após o parto (The Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus, 1999; World Health Organization, 1999).

A periodontite crônica é a complicação oral mais importante nos indivíduos com DM tipo II, e é considerada a sexta complicação clássica do diabetes. A profundidade de sondagem e o número de dentes perdidos em sextantes com bolsas profundas são maiores nos diabéticos tipo II (Sonis et al., 1996). Um mecanismo molecular plausível para explicar a gravidade da doença nos diabéticos, se baseia no fato de que a hiperglicemia crônica pode gerar a glicosilação progressiva das proteínas corporais, formando os produtos finais avançados de glicosilação (AGEs). Quando estes compostos estão no tecido periodontal, se ligam ao seu receptor específico (RAGEs) e estimulam a produção de mediadores inflamatórios pelos macrófagos como a IL-1, IL-6, TNF- α e prostaglandina. Estes mediadores inflamatórios estimulam a transformação do colágeno em compostos menos solúveis, mais resistentes à ação de enzimas e menos flexíveis, o que contribui para a dificuldade de cicatrização encontrada em diabéticos (Han et al., 2006; Kumar et al., 2006; Amir et al., 2011). Os AGEs também ativam osteoclastos e collagenases, promovendo assim a destruição do osso e tecido conjuntivo,

aumentando a progressão e severidade da doença periodontal (Lalla et al., 2000; Katz et al., 2005; Takeda et al., 2006; Méndez et al., 2010; Costa et al., 2010; Amir et al., 2011).

Estas duas doenças apresentam uma associação bidirecional na qual, o diabetes favorece o desenvolvimento da doença periodontal e esta, quando não tratada, piora o controle metabólico do diabetes. Além do seu efeito deletério sobre a saúde oral e controle glicêmico, vários estudos têm demonstrado associação da doença periodontal com a doença coronariana, outra importante causa de morbidade e mortalidade em diabéticos (Faria Almeida et al., 2006).

Estudos recentes demonstraram que há um *turnover* deficiente do colágeno nas feridas dos diabéticos, que pode ser associado aos níveis das MMPs e seus inibidores. Muller et al. (2008) avaliaram níveis de MMP-1, 8 e 9 em feridas de diabéticos que apresentavam boa e má cicatrização por ELISA e observaram que as feridas com boa cicatrização apresentavam níveis maiores de MMP-1 quando comparadas as que possuíam uma cicatrização ruim. Além disto, os níveis de MMP-8 e 9 foram significativamente maiores nas feridas com má cicatrização.

A associação entre as MMPs, TIMPs e a gravidade da periodontite crônica em indivíduos com DM também tem sido avaliada e os estudos são bastante controversos. Kumar et al. (2006) encontraram níveis mais elevados de MMP-8 e MMP-9 e em tecidos gengivais de indivíduos com DM e periodontite crônica por *Western blot*. Hardy et al. (2011) por PCR, observaram também níveis mais altos de MMP-8 nos indivíduos diabéticos com periodontite crônica quando comparados aos que não tinham DM.

Em outro estudo recente, Kim et al. (2011) avaliaram os níveis de proteína C-reativa, MMP-14 e TIMP-2 em amostras de gengivas de indivíduos com periodontite crônica com e sem DM pela técnica de *Western blot*. Os autores detectaram níveis mais elevados de MMP-14 e TIMP-2 para os indivíduos periodontalmente saudáveis em relação aos com periodontite crônica independente da presença da DM.

Em contra partida, Costa et al. (2010) analisaram por ELISA os níveis de IL-6, MMP-8 e OPG de amostras de saliva de indivíduos diabéticos ou não, com e sem periodontite crônica. Foi possível observar um aumento de IL-6 e MMP-8 para os participantes da pesquisa que tinham periodontite crônica com ou sem DM. Em contra partida, Kardeşler et al. (2010) avaliaram os níveis de MMP-8, 13 e TIMP-1

por ELISA no fluido crevicular de indivíduos com periodontite crônica com e sem DM. Não foi observado diferença nos níveis das MMPs e inibidores estudados e também não foi possível estabelecer uma relação dos parâmetros clínicos com a expressão destas proteases.

Devido a alta prevalência das DP, da DM e do tabagismo na população mundial, associado ao fato de poucos estudos que avaliem a relação das MMPs e seus inibidores associados aos fatores de risco para a doença periodontal, novos estudos que forneçam um melhor entendimento sobre a participação destes mediadores na destruição dos tecidos periodontais são de grande importância.

2. PROPOSIÇÃO

O presente estudo avaliou os níveis de expressão gênica das MMPs 1, 2, 8, 9 e seus inibidores, TIMP 1 e 2 em biópsias de tecido gengival de indivíduos com periodontite crônica generalizada fumantes e/ou portadores de DM tipo II.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado na Clínica de Estudos Avançados e no Laboratório de Odontologia II da Universidade Guarulhos no período de janeiro a dezembro de 2011. O protocolo experimental utilizado no presente estudo teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Guarulhos (ANEXO 1).

Uma aluna de iniciação científica (AS) foi a responsável por informar verbalmente e por escrito sobre os objetivos, riscos e benefícios a que foram submetidos todos os participantes. Os indivíduos que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 2), em acordo com as diretrizes e normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº 196/96).

3.1 População estudada

3.1.1 Critérios de inclusão e exclusão gerais

Foram incluídos neste estudo um total de 61 indivíduos com periodontite crônica generalizada baseado nos critérios adotados pela Academia Americana de Periodontia (Armitage, 1999). Em relação à extensão, esses indivíduos tinham mais que 30% dos sítios com sinais clínicos de periodontite e apresentavam pelo menos 6 sítios não-contíguos com periodontite avançada (profundidade de sondagem e nível clínico de inserção > 4 mm). Os indivíduos incluídos eram do sexo masculino ou feminino, com idade mínima de 35 e máxima de 70 anos, provenientes das clínicas de periodontia dos cursos de graduação ou pós-graduação da Universidade Guarulhos.

Foram excluídos indivíduos gestantes e lactantes, obesos (IMC \geq 30 kg/m² e/ou circunferência da cintura > 102 cm para homens e > 88 para mulheres), bem como os que apresentavam doenças sistêmicas (osteoporose, desordens imunes, hepatite, etc), exceto DM. Também foram excluídos, indivíduos que tivessem recebido qualquer tratamento para periodontite ou que tivessem feito uso de qualquer tipo de antibiótico sistêmico nos últimos seis meses. Além disso foram considerados fatores de exclusão, o uso de corticóides, antiinflamatórios não-esteróides, drogas imunossupressoras, estrógeno e moduladores dos receptores de estrógeno, bem como medicamentos que pudessem influenciar o metabolismo ósseo (alendronato, calcitonina, etc), durante os seis meses anteriores ao estudo. Foram excluídos, ainda, indivíduos que relataram durante a anamnese, fazer uso contínuo de enxaguatórios, contendo antimicrobianos (por exemplo, clorexidina, óleos essenciais, cloreto cetilpiridíneo e triclosan), nos últimos três meses.

3.1.2 Critérios de inclusão e exclusão específicos

Os indivíduos diabéticos selecionados para o estudo apresentavam o diabetes do tipo II, e podiam fazer controle de dieta, uso de hipoglicemiantes e/ou

insulina. Os mesmos apresentaram taxa de HbA1c superior a 7,9% e foram incluídos no grupo de diabéticos mediante autorização médica para tratamento odontológico.

Os indivíduos fumantes incluídos deveriam consumir no mínimo 10 cigarros por dia por num período mínimo de 05 anos (Ammenheuser et al., 1997).

Diabético e fumantes deveriam apresentar concomitantemente as características acima descritas para diabéticos e fumantes.

3.2 Exames Clínicos e Laboratoriais

3.2.1 Avaliação clínica periodontal

A avaliação clínica foi realizada por meio de sondas periodontais manuais (Carolina do Norte, Hu-friedy Co Inc., Chigago, IL) por um mesmo examinador, treinado e calibrado. A calibração foi baseada na metodologia proposta por Araujo et al. (2003) para obtenção do erro padrão da medida. A variabilidade intra-examinador foi de 0,22 mm para profundidade de sondagem (PS) e 0,19 para nível clínico de inserção (NCI). Os parâmetros dicotômicos como sangramento a sondagem (SS) e supuração (SUP) foram calculados pelo teste Kappa-Light e a concordância intra-examinados foi > 87%.

Os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados em seis sítios por dente (mesio-vestibular, médio-vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual/palatino, médio-lingual/palatino, disto-lingual/palatino):

- IPV: Presença ou ausência de placa supragengival visível após secagem dos dentes (Ainamo e Bay, 1975);
- PS: Distância, em milímetros, entre a margem gengival livre e a porção mais apical do sulco/bolsa periodontal;
- NCI: Distância, em milímetros, entre a junção cimento-esmalte a porção mais apical do sulco/bolsa periodontal;
- SS: Presença ou ausência de sangramento até 20 segundos após a sondagem com sonda periodontal milimetrada;

- SUP: Presença ou ausência de supuração espontânea ou em até 20 segundos após a sondagem periodontal.

3.2.2 Exames laboratoriais

Os indivíduos diabéticos, selecionados para participar do estudo, foram encaminhados para realizar os exames de hemoglobina glicada e glicemia em jejum no laboratório de Análises Clínicas da Universidade Guarulhos. Os valores de referência para taxa de hemoglobina glicada adotados por esse laboratório foram de 4,5 a 8%. O valor de referência adotado para glicemia em jejum por este laboratório foi de 60 a 110 mg de glicose por decilitro de sangue (mg/dL).

3.3 Seleção do sítio de coleta de tecido gengival

Com objetivo de obter biópsia de uma área representativa do processo inflamatório periodontal, o tecido gengival foi removido ao redor de dentes com periodontite avançada, indicados para exodontia (bolsas maiores que 7 mm, sangramento à sondagem, mobilidade e comprometimento de 2/3 do suporte ósseo), ou por meio da coleta de tecido em dentes de bolsas >5mm, com sangramento a sondagem submetidos a cirurgia de raspagem.

3.4. Grupos experimentais

Os 61 indivíduos com periodontite crônica generalizada, selecionados para o desenvolvimento do presente estudo, foram divididos em 4 grupos experimentais, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão em:

- Grupo I: Indivíduos não fumantes e não diabéticos (n=15);
- Grupo II: Indivíduos sistemicamente saudáveis e fumantes (n=17);
- Grupo III: Indivíduos diabéticos e não fumantes (n=17);
- Grupo IV: Indivíduos diabéticos e fumantes (n=12).

3.5 Tratamento proposto para os sujeitos da pesquisa

Com o objetivo de contemplar os aspectos éticos, todos os sujeitos da pesquisa receberam tratamento bucal. Receberam inicialmente uma adequação do meio bucal, na qual foram realizados os seguintes procedimentos: selamento das cavidades abertas, remoção de restaurações e próteses em excesso, exodontias, remoção de cálculo supragengival, instruções de higiene bucal e instalação de próteses provisórias. Em seguida, esses indivíduos foram tratados por meio de raspagem e alisamento radicular (RAR) com curetas manuais e ultrassom. A partir deste período, os indivíduos passaram a fazer parte de um programa de manutenção periodontal, na qual serão realizadas raspagens subgengivais quando necessárias. Outras necessidades odontológicas foram encaminhadas para as clínicas odontológicas de graduação e pós-graduação da Universidade Guarulhos.

3.6 Avaliação da expressão gênica

3.6.1 Extração do RNA

No momento das cirurgias (exodontias), os tecidos gengivais foram removidos e acondicionados em uma solução de RNAlater® (Ambion Inc., Austin, TX), para

evitar a degradação do RNA. As amostras permaneceram incubadas a 4°C durante 24 horas e em seguida foram armazenadas a -20°C até o momento da extração. Primeiramente, a solução de RNA later foi aspirada e o tecido foi acondicionado em nitrogênio líquido para trituração. A amostra triturada foi então colocada no reagente TRIZOL (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, USA), homogeneizada durante 30 segundos e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Após este período, foi adicionado clorofórmio (Sigma, St. Louis, MO, USA), as amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 11.500 rpm por 15 minutos em uma temperatura de 4°C. A porção aquosa foi transferida para outro tubo, no qual foi adicionado isopropanol, agitado, incubado por 20 minutos a uma temperatura de -20°C e centrifugado da mesma forma como descrito acima. Depois de finalizado esse processo, foi formado um precipitado o qual foi lavado com etanol gelado a 75% e seco a temperatura ambiente. As amostras de RNA foram subsequentemente resuspensas em aproximadamente de 30 a 50 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e armazenadas a -70°C. Finalmente, a concentração de RNA foi determinada por meio de um espectrofotômetro. Em seguida, 1 µg do RNA total foi avaliado quanto a sua qualidade por meio de eletroforese em gel de agarose 1%.

3.6.2 Tratamento com DNase

As amostras de RNA total foram tratadas para a eliminação de qualquer resíduo de DNA com DNase (DNA-free™, Ambion Inc., Austin, TX, USA), conforme recomendação do fabricante. Nos tubos contendo o RNA total extraído foi adicionada a solução tampão e a DNase turbo, baseado na concentração de RNA previamente avaliada. Após agitação e centrifugação, os mesmos permaneceram incubados em a 37°C durante 30 minutos. Finalmente, foi acrescentado o inativador e a solução foi agitada e centrifugada. O RNA total foi novamente quantificado por meio de um espectrofotômetro.

3.6.3 Transcrição reversa

Cerca de 2 µg da amostra de RNA total livre de DNA foi utilizado para a síntese do cDNA. Para isto, as reações foram realizadas para um volume final de 40 µL utilizando o kit *First-strand cDNA synthesis* (Roche Diagnostic Co., Indianápolis, IN, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Inicialmente, as amostras foram incubadas por 10 minutos a 25°C e, em seguida, por 60 minutos a 42°C. Concluída a segunda etapa de incubação, as amostras foram incubadas por 5 minutos a 95°C e então por 5 minutos a 4°C para resfriamento. Os reagentes utilizados e suas respectivas concentrações foram: solução tampão (1x), MgCl₂ (5mM), desoxinucleotídeos (1mM), *primers* randomizados (3,2µg), inibidor de RNase (50U), e transcriptase reversa AMV (20U).

3.6.4 Análise da expressão gênica por *Real-time* PCR (RT-PCR)

3.6.4.1 Desenho dos *Primers*

Os *primers* para GAPDH (gene de referência), MMP-1, MMP 2, MMP-8, MMP-9 e seus inibidores TIMP-1 e TIMP-2 foram desenhados com o auxílio de um programa desenvolvido especificamente para elaboração de *primers* para o *LightCycler* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Todos os *primers* foram verificados quanto a sua especificidade por meio da verificação da curva de *Melting* utilizando-se sempre controles positivos e negativos. No quadro 1 podem ser observadas a sequência, porcentagem de resíduos de guanina (G) e citosina (C) e a temperatura de *Melting* (TM) dos *primers* utilizados no presente estudo.

Gene (nº de acesso no Genbank)	Seqüência	%GC	TM °C)
MMP-1 (NM_002421.3)	Forward: 5' AGCTGCTTACGAATTTGCC 3' Reverse: 5' GCAGCATCGATATGCTTCAC 3'	47,6 50	60,7 60
MMP-2 (NM_004530.4)	Forward: 5' CGCAGATGCCTGGAATG 3' Reverse: 5' GTCGGATTTGATGCTTCCAAAC 3'	58,8 45,5	61,1 60,8

MMP-8 (NM_002424.2)	Forward: 5'CTAGACAGTACCCTTGGCC 3' Reverse: 5'CTGCAAAGACCCTGGTAAG 3'	57,9 52,6	59,7 60,3
MMP-9 (NM_004994.2)	Forward: 5' GCTACCACCTCGAACTTTGAC 3' Reverse: 5' CTCAGTGAAGCGGTACATAGG 3'	52,4 52,4	60,4 60,1
TIMP-1 (NM_003254)	Forward: 5' CAGACCACCTTATACCAGCG 3' Reverse: 5' CCAGCAATGAGAACTCCTC 3'	55 50	61 59,7
TIMP-2 (NM_003255.4)	Forward: 5' CTGGGAGGGTATCCAGGAATC 3' Reverse: 5' CACCATACAGGAAGCGAAC 3'	57,1 52,6	60,7 60,4

QUADRO 1: Sequência de nucleotídeos, porcentagem de resíduos de guanina (G) e citosina (C) e temperatura de melting para os primers utilizados durante a reação de RT-PCR para os diferentes genes estudados.

3.6.4.2 Otimização das reações

A eficiência das reações para cada gene foi otimizada anteriormente ao início das reações propriamente ditas. Concentrações variando de 2 a 5mM de cada par de *primers* foram utilizadas para se determinar em quais condições a reação apresentava a melhor eficiência, conforme sugestões do fabricante do equipamento, escolheu-se a de 5 mM .

3.6.4.3 Reações de RT-PCR

As reações de RT-PCR foram realizadas com o sistema *LightCycler* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), utilizando o *kit FastStart DNA Master SYBR Green I* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). O perfil das reações foi determinado seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante do equipamento. Para cada uma das análises, água foi utilizada como controle negativo, e o produto das reações foi quantificado utilizando-se o programa do próprio fabricante (LightCycler Relative Quantification Software - Roche Diagnostics GmbH). Os níveis de expressão do gene GAPDH foram utilizados como referência (*housekeeping*) para a normalização dos valores.

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa Bioestat 3.0 (Sociedade Civil Mimirauá, CNPq, BR). Inicialmente, os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e, quando detectada ausência de normalidade dos valores, foram utilizados métodos estatísticos não paramétricos.

Os dados clínicos (IPV, SS, SUP, PS e NCI) foram coletados para boca toda e para o sítio de coleta da biópsia gengival. Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis para uma análise para IPV, SS, SUP. Em caso de detecção de diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais foi utilizado o teste de Dunn. O teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA) foi aplicado para Idade, PS e NCI e, em caso de diferenças significativas entre os grupos, as comparações foram realizadas pelo teste de Tukey. As diferenças na frequência dos gêneros foram avaliadas pelo teste exato de Fisher. Todos os dados demográficos e clínicos foram apresentados como média e desvio padrão, exceto gênero.

As comparações na expressão gênica das MMP-1, 2, 8, 9, TIMP- 1 e 2 foram realizadas por Kruskal Wallis e as comparações das diferenças significativas entre pares de grupos foram realizada pelo teste de Dunn.

Para todas as análises, o nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Características Clínicas

A população estudada foi composta por 61 indivíduos, dos quais 27 eram homens e 34 mulheres, com média de idade de $49,17 \pm 5,06$ anos. Todos os indivíduos apresentavam periodontite crônica generalizada e foram divididos segundo os critérios de inclusão e exclusão nos grupos I, II, III e IV. Os indivíduos pertencentes ao grupo II e IV apresentavam $12,9 \pm 7,5$ e $19,5 \pm 11,0$ anos de tabagismo e consumiam regularmente $15,5 \pm 3,7$ e $16,7 \pm 6,2$ cigarros por dia,

respectivamente. Os indivíduos pertencentes ao grupo de III e IV apresentaram glicemia em jejum de $155,7 \pm 26,1$ e $160,5 \pm 40,4$ mg/dL, e níveis de hemoglobina glicada de $9,3 \pm 1,8$ e $8,5 \pm 1,3\%$, respectivamente. As características epidemiológicas e os parâmetros clínicos periodontais estão apresentados na tabela 1.

A amostra foi homogênea em relação à frequência de gênero. Não foram detectadas diferenças estatísticas para a idade dos indivíduos do grupo I ($43,6 \pm 4,8$ anos) e II ($46,6 \pm 8,5$ anos) e entre os pacientes pertencentes aos grupos III ($55 \pm 4,9$ anos) e IV ($51 \pm 6,2$ anos) ($p > 0,05$). Porém os indivíduos diabéticos, fumantes ou não, apresentaram idade superior aos indivíduos pertencente aos grupos I e II ($p < 0,05$).

Em relação aos parâmetros clínicos coletados em boca toda não houve diferença significativa para IPV, SUP, PS e NCI. Entretanto, foram encontrados níveis mais elevados de SS em boca toda de indivíduos do grupo I ($64,2 \pm 23,4\%$) e III ($64,3 \pm 27,9\%$) quando comparados aos indivíduos do grupo II ($39,8 \pm 22,65\%$) e IV ($27,5 \pm 16,85\%$).

Não foram detectadas diferenças significativas para IPV, SS e NCI nos sítios de coleta das biópsias de tecido gengival utilizadas para análise de expressão gênica. Menores níveis de SUP para o sítio de coleta foram observados para os indivíduos do grupo IV ($6,9 \pm 24,0\%$) quando comparado ao grupo III ($28,4 \pm 30,5\%$) ($p < 0,05$). Indivíduos diabéticos não apresentaram diferenças significativas dos níveis de PS quando comparado aos demais grupos ($7,9 \pm 2,3$ mm). Porém, o grupo II e IV apresentaram níveis significativamente menores de PS ($6,5 \pm 2,1$ mm e $6,3 \pm 1,6$ mm, respectivamente) quando comparados aos sítios de indivíduos do grupo I ($8,4 \pm 1,7$ mm).

Tabela 1 – Características demográficas e parâmetros clínicos (média \pm DP) da população estudada.

	Grupo I (n=15)	Grupo II (n=15)	Grupo III (n=15)	Grupo IV (n=12)
Idade (anos)	$43,6 \pm 4,8^a$	$46,6 \pm 8,5^a$	$55,0 \pm 4,9^b$	$51,5 \pm 6,2^b$
M/F	6/9	9/8	7/10	5/7

HbA1c (%)		—	—	9,3 ± 1,8	8,5 ± 1,3
Glicemia em jejum (mg/dl)		—	—	155,7 ± 26,1	160,5 ± 40,4
IPV	Boca-total	69,05 ± 23,6	47,5 ± 17,9	72,2 ± 28,4	59,75 ± 24,9
(%)	Sítio coletado	83,3 ± 32,1	80,4 ± 32,4	98,0 ± 8,1	75,0 ± 45,2
SS	Boca-total	64,2 ± 23,4 ^a	32,7 ± 13,4 ^b	64,3 ± 27,9 ^a	27,5 ± 16,85 ^b
(%)	Sítio coletado	80,1 ± 21,1	92,1 ± 22,15	84,3 ± 20,0	84,7 ± 25,1
SUP	Boca-total	2,2 ± 3,1	1,5 ± 1,4	3,6 ± 3,2	1,3 ± 1,7
(%)	Sítio coletado	13,3 ± 22,9 ^{ab}	5,86 ± 10,1 ^{ab}	28,4 ± 30,5 ^a	6,9 ± 24,0 ^b
PS	Boca-total	4,2 ± 0,7	3,2 ± 1,2	3,8 ± 1,0	3,9 ± 1,3
(mm)	Sítio coletado	8,4 ± 1,7 ^a	6,8 ± 1,9 ^{ab}	8,0 ± 1,6 ^{ab}	6,3 ± 1,6 ^b
NCI	Boca-total	5,0 ± 1,0	3,7 ± 1,0	4,5 ± 1,3	4,5 ± 1,6
(mm)	Sítio coletado	9,7 ± 1,1	9,4 ± 2,0	9,4 ± 2,0	8,75 ± 2,9

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para Idade, PS e NCI (ANOVA e teste de Tukey; $p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para IPV, SS e SUP (Kruskal Wallis e teste de Dunn; $p < 0,05$). M: masculino; F: feminino; HbA1c: hemoglobina glicada; DM: diabetes melito; IPV: índice de placa visível; SS: sangramento à sondagem; SUP: supuração; PS: profundidade de sondagem; NCI: nível clínico de inserção.

4.2 Expressão Gênica

Os resultados de expressão gênica das MMP-1, 2, 8, 9, TIMP-1 e 2 em relação à expressão do gene de referência GAPDH estão ilustrados, respectivamente, na figura 2. Não foram detectadas diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais para expressão gênica de TIMP-2. O grupo II apresentou níveis menores de expressão gênica de MMP-1, 2, 9 e TIMP-1 ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo III. No entanto, estes grupos (II e III) não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos indivíduos do grupo I para MMP-1, 2, 9 e TIMP-1. Da mesma forma, o II e III não apresentaram

diferenças significativas para expressão de MMP-1, 2 e 9 quando comparados ao grupo IV. Porém, indivíduos do grupo III apresentaram níveis maiores de expressão de TIMP-1 quando comparados ao grupo IV. Com relação à expressão de MMP-8, foi observado que indivíduos do grupo I apresentaram níveis menores de expressão gênica desta enzima quando comparados aos demais grupos ($p < 0,05$).

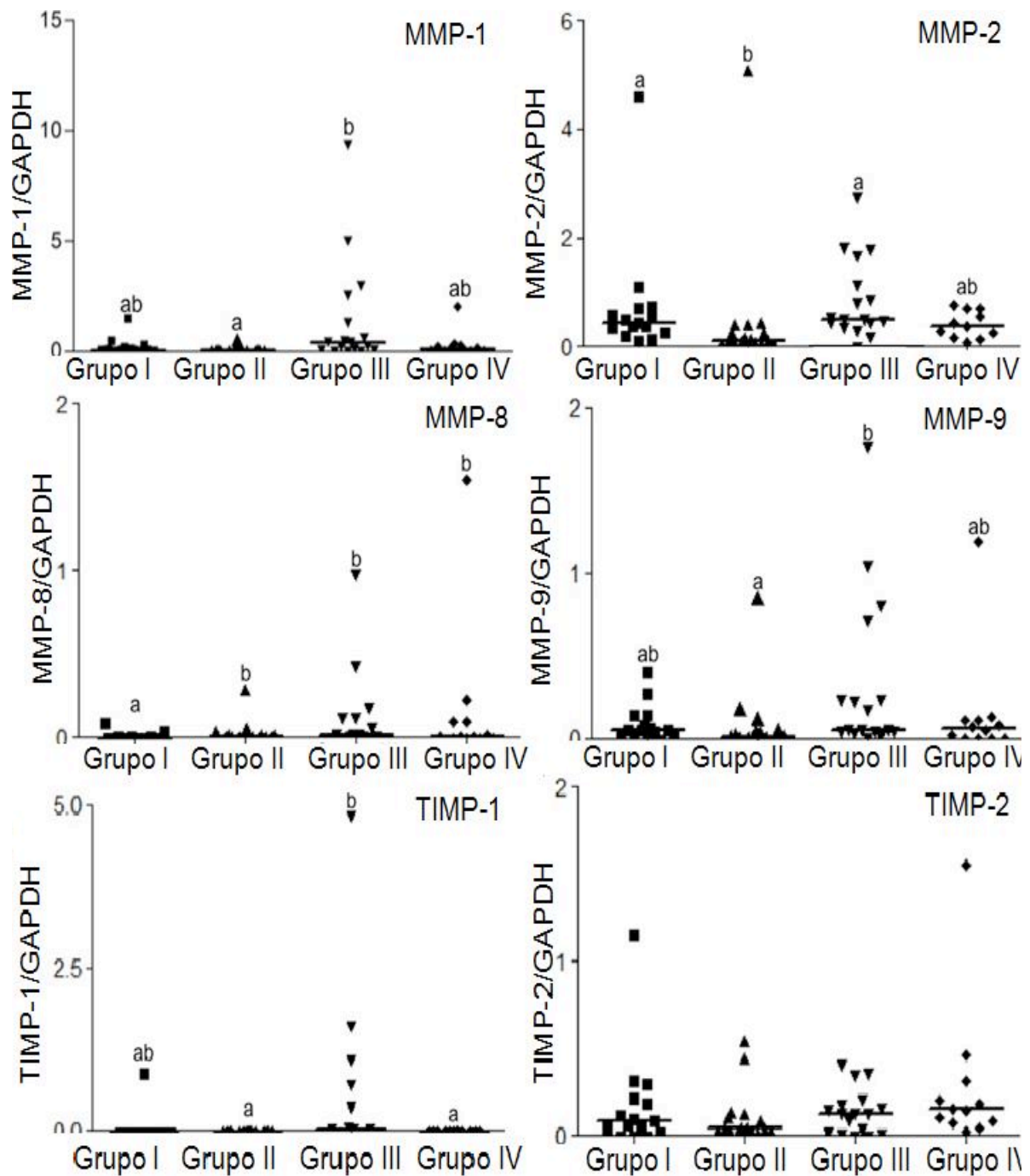


Figura 2: Níveis de expressão das MMPs e TIMPs no tecido gengival de indivíduos com ausência dos fatores de risco e fumantes e/ou diabéticos. GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). Letras diferentes demonstram diferenças

significativas entre os grupos (Kruskal Wallis e teste de Dunn; $p < 0,05$). A barra horizontal representa a mediana e os símbolos são os valores de expressão obtidos para cada biopsia gengival.

5. DISCUSSÃO

As MMPs representam uma família de endopeptidases envolvidas na degradação de constituintes da matriz extracelular, incluindo vários tipos de colágenos e componentes da membrana basal, tanto em processos biológicos quanto patológicos (Souza et al., 2005). Diversos estudos têm demonstrado o envolvimento destas enzimas e seus inibidores no dano aos tecidos periodontais observados durante a periodontite crônica (D' Armieto et al., 1992; D' Armieto et al., 1995; Liu et al., 2000; Molloy et al., 2004; Souza et al., 2005; Dozier et al., 2006; Koch et al., 2009; Tallant et al., 2010; Gomes et al., 2012). Na literatura científica já foi bem estabelecido que o uso do tabaco em cigarro ou outras formas, bem como a diabetes melito tipo II atuam como fatores de risco para a progressão e gravidade da periodontite crônica (Golub et al., 1997; Sorsa et al., 2004; Kubota et al., 2008; Ramseier et al., 2009; Kuula et al., 2009; Gursoy et al., 2010; Yakob et al., 2011; Sexton et al., 2011). Entretanto, não existem estudos que comparem os níveis de MMPs e seus inibidores entre estes fatores de risco. Assim, no presente estudo foram avaliados os níveis das MMP-1, 2, 8 e 9 e seus inibidores TIMP-1 e 2 em indivíduos com periodontite crônica que apresentavam, isolada ou simultaneamente, a DM e o hábito de fumar, em comparação aos indivíduos não diabéticos e não fumantes.

Com relação aos parâmetros clínicos periodontais de boca toda, foi possível observar que os participantes da pesquisa que eram fumantes e diabéticos-fumantes apresentavam menores índices de sangramento à sondagem que os demais grupos. Estes resultados estão de acordo com os de Bergström e Boström (2001) que demonstraram que indivíduos fumantes apresentaram menor sangramento quando

comparados aos não fumantes. Nair et al. (2003), em um estudo longitudinal, demonstraram que indivíduos que param de fumar passam a exibir um maior sangramento a sondagem quando comparado ao momento em que fumavam. A inibição do sangramento observado em indivíduos fumantes poderia ser explicado pelo fato de que a nicotina induz a vasoconstrição local e o aumento da espessura do epitélio gengival (Jacob et al., 2007)

Neste estudo, a PS dos sítios de coleta não foram semelhantes estatisticamente entre os grupos. Isso se deve ao fato dos tecidos coletados serem provenientes de dentes indicados para exodontias ou acesso para raspagem. Os sítios dos grupos I, II e III foram de dentes com indicação para exodontias, enquanto o grupo IV foi predominantemente de acesso para raspagem. Entretanto, é importante ressaltar que todos os sítios apresentavam PS > 5mm e que os demais parâmetros como NCI e SS foram semelhantes nos sítios de coletas.

O aumento de MMP-8 em indivíduos com periodontite crônica foi descrito por diferentes autores (Cesar-Neto et al., 2007; Ramseier et al., 2009; Gursoy et al., 2010; Sorsa et al., 2010). No presente estudo, foi observado que a presença isolada ou simultânea de DM tipo II e tabagismo aumentaram a expressão da MMP-8 quando comparado ao grupo não diabético e não fumante. Com relação aos efeitos do tabagismo sobre os níveis de MMP-8, resultados contraditórios foram encontrados na literatura. Um estudo demonstrou aumento dos níveis de MMP-8 em fumantes com periodontite crônica quando comparados aos não fumantes (Persson et al., 2003). Outros estudos, por sua vez, não demonstraram diferenças nos níveis de MMP-8 entre indivíduos com periodontite crônica fumantes e não fumantes (Mouzakii et al., 2011; Ozçaka et al., 2011). Ainda, Cesar-Neto et al. (2007) demonstraram que níveis de MMP-8 em sítios com periodontite crônica foram menores em indivíduos fumantes quando comparados aos não fumantes. Resultados controversos também foram observados para os estudos que associaram níveis de MMP-8 e periodontite crônica em indivíduos diabéticos. Kumar et al. (2006) e Hardy et al. (2011) estão em acordo com os resultados do presente estudo que demonstraram aumento dos níveis de MMP-8 em indivíduos diabéticos com periodontite crônica quando comparados aos não diabéticos. No entanto, Costa et al. (2010) e Kardesler et al. (2011) não demonstraram diferenças entre diabéticos e não diabéticos com periodontite crônica. Estas divergências observadas para

MMP-8 associada a periodontite crônica em fumantes e diabéticos poderiam ser, em parte, explicadas por diferenças metodológicas utilizadas nos estudos citados em relação a técnica de análise (RT-PCR, ELISA, Western blot), bem como gravidade da periodontite crônica, controle glicêmico, tempo e frequência de exposição ao tabaco.

Diversos estudos demonstraram níveis aumentados de MMP-1, 2, 9 e TIMP-1 em indivíduos com periodontite crônica quando comparados aos indivíduos saudáveis (Smith et al., 2004; Cesar-Neto et al., 2007; Maeso et al., 2007; Kubota et al., 2008; Dong et al., 2009; Ramseier et al., 2009; Gursoy et al., 2010; Isaza-Gúzman et al., 2011). De forma geral, o presente estudo demonstrou que fumantes apresentaram menores níveis de expressão de MMP-1, 2, 9 e TIMP-1 quando comparados aos diabéticos. Na literatura não foram encontrados estudos que avaliassem concomitantemente a presença destes dois fatores de risco, o que nos impede de realizar uma melhor comparação dos dados obtidos.

Quando a periodontite crônica foi associada ao tabagismo, poucos estudos em humanos foram encontrados, porém estes também mostraram um efeito inibitório do cigarro sobre a expressão de MMPs e TIMPs. Cesar-Neto et al. (2007) observaram menores níveis de MMP-2 em fumantes quando comparados aos não fumantes. Mais recentemente, Mouzakiti et al. (2011) demonstraram que indivíduos não fumantes com periodontite crônica expressavam níveis maiores de MMP-1, 9 e TIMP-1 quando comparados aos fumantes. Outros estudos *in vitro* e *ex vivo* também associaram o efeito do tabaco e/ou seus compostos sobre a expressão de MMPs e TIMPs. Para MMP-1, apenas um estudo *in vitro* demonstrou níveis aumentados desta enzima quando partículas condensadas do cigarro foram incubadas concomitantemente com *P. gingivalis* em cultura de fibroblastos gengivais (Zhang et al., 2010). Para MMP-2, Renó et al. (2011) detectaram níveis maiores desta enzima em queratinócitos retirados da mucosa oral de indivíduos fumantes quando comparados aos ex-fumantes, enquanto o estudo *in vitro* de Zhang et al. (2010) demonstraram níveis aumentados de MMP-2. Para MMP-9, Ozçaka demonstraram aumento dos níveis séricos desta enzima em indivíduos fumantes com periodontite crônica quando comparados aos não fumantes. Para TIMP-1, Ozçaka et al. (2011) demonstraram diminuição dos níveis séricos deste mediador em indivíduos fumantes com periodontite crônica quando comparados aos não fumantes.

Estudos que avaliem os níveis de MMPs e seus inibidores com periodontite crônica em indivíduos diabéticos também são escassos na literatura. Kumar et al. (2006) e Collin et al. (2000) demonstraram um aumento de MMP-9 em indivíduos diabéticos tipo II com periodontite crônica quando comparados aos não-diabéticos. Os níveis TIMP-1 não foram diferentes entre indivíduos portadores de periodontite crônica com diabetes ou indivíduos sistemicamente saudáveis (Kardesler et al., 2011). Shin et al (2010) e Kim et al. (2011) demonstraram aumento da expressão de TIMP-2 em indivíduos diabéticos com periodontite crônica, quando comparados aos indivíduos sistemicamente saudáveis também portadores de periodontite crônica. Estudo recente *in vitro* demonstrou que os AGEs podem estimular a expressão de MMP-1 em fibroblastos gengivais humanos e, desta forma, poderia contribuir para o dano tecidual observado nos indivíduos diabéticos (Yu et al., 2012).

Os efeitos inibitórios do tabaco sobre a expressão de MMPs e TIMPs em relação a DM observado no presente estudo poderia ser explicado pelo fato de constituintes do cigarro apresentarem efeitos supressores sobre a resposta inflamatória (Lee et al., 2012). Estudos *in vitro* têm demonstrado diminuição dos níveis de citocinas ligadas ao perfil Th1 de resposta, como a IL-12 que possui características inflamatórias e um aumento de citocinas pertencentes ao perfil Th2 de resposta, como a IL-13 (Kroening et al., 2008). Também tem sido descrito que o cigarro apresenta efeitos inibitórios sobre o número e a atividade de neutrófilos, principal célula produtora de MMPs e TIMPs (Kenney et al., 1977; Palmer et al., 2005).

Por outro lado, o diabetes melito pode exercer um efeito destrutivo sobre o periodonto por meio da desregulação da liberação de citocinas (Liu et al., 2006). Engebretson et al. (2004) demonstraram aumento dos níveis de IL-1 no fluido crevicular de indivíduos diabéticos descompensados com periodontite crônica quando comparados aos não diabéticos. Além disto, camundongos diabéticos exibiram uma resposta inflamatória prolongada quando estimulados com *P. gingivalis*, que em parte foi causada por uma desregulação da produção do TNF- α (Naguib et al., 2004). Recentemente, Duarte et al. (2011) demonstrou que indivíduos portadores de DM tipo 2, não fumantes, apresentaram aumento do número de células que expressavam IL-17, IL-15, Foxp3 e aumento de fibrose no sítios com periodontite crônica quando comparados aos indivíduos sem fator de risco.

Os dados disponíveis na literatura, em conjunto com os achados do presente estudo em relação a MMPs e TIMPs, sugerem que, embora o tabagismo e a diabetes sejam fatores de risco para a periodontite crônica, os mecanismos imunoinflamatórios pelos quais eles interferem na patogênese da doença parecem ser diferentes.

6.CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a presença isolada ou simultânea de DM tipo II e tabagismo aumentaram a expressão da MMP-8 quando comparado ao grupo não diabético e não fumante. Além disto, indivíduos fumantes apresentaram menores níveis de expressão de MMP-1, 2, 9 e TIMP-1 quando comparados aos diabéticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*. 1975 Dec; 25(4): 229-35.

Akgul C, Edwards SW. Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. *Cell Mol Life Sci*. 2003. 60(11):2402-8

Almasri A, Wisithphrom K, Windsor LJ, Olson B. Nicotine and lipopolysaccharide affect cytokine expression from gingival fibroblasts. *J Periodontol*. 2007; 78:533–541.

American Academy of Periodontology, The. International Workshop for a Classification of periodontal disease and conditions. *Ann of Periodontol*. 1999; 4(1): 38.

Amir J, Waite M, Tobler J, Catalfamo DL, Koutouzis T, Katz J, et al. Cell The role of hyperglycemia in mechanisms of exacerbated inflammatory responses within the oral cavity. *Immunol*. 2011;272(1):45-52.

Ammenheuser MM, Hastings DA, Whorton Jr EB, Ward Jr JB. Frequencies of hrpt mutant lymphocytes in smoker, non-smoker and former smoker. *Environ Mol Mutagen*. 1997; 30: 131-8.

Araújo MW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, Genco RJ, Trevisan M. Reproducibility of probing depth measurement using a

constant-force electronic probe: analysis of inter- and intraexaminer variability. *J Periodontol.* 2003; 74:1736-1740.

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

Bagaitkar J, Daep CA, Patel CK, Renaud DE, Demuth DR, Scott DA. Tobacco smoke augments *Porphyromonas gingivalis*-*Streptococcus gordonii* biofilm formation. *PLoS One.* 2011; 6(11):e27386.

Balbín M, Fueyo A, Knäuper V, Pendás AM, López JM, Jiménez MG, et al. Collagenase 2 (MMP-8) expression in murine tissue-remodeling processes. Analysis of its potential role in postpartum involution of the uterus. *J Biol Chem.* 1998; 11;273(37):23959-68.

Barbour SE, Nakashima K, Zhang JB. Tobacco and smoking: environmental factors that modify the host response (immune system) and have an impact on periodontal health. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997; 8:437–460.

Benbow U, Schoenermark MP, Mitchell TI, Rutter JL, Shimokawa K, Nagase H, et al. A novel host/tumor cell interaction activates matrix metalloproteinase 1 and mediates invasion through type I collagen. *J Biol Chem.* 1999; 3; 274(36):25371-8.

Bergström J, Boström L. Tobacco smoking and periodontal hemorrhagic responsiveness. *J Clin Periodontol.* 2001; 28(7):680-5.

Bergström J. Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology.* 2003; 92:1–8.

Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(12):4823-30.

César Neto JB, de Souza AP, Barbieri D, Moreno H Jr, Sallum EA, Nociti FH Jr. Matrix metalloproteinase-2 may be involved with increased bone loss associated with experimental periodontitis and smoking: a study in rats. *J Periodontol.* 2004; 75(7):995-1000.

César-Neto JB, Duarte PM, de Oliveira MC, Tambeli CH, Sallum EA, Nociti FH Jr. Smoking modulates interleukin-6:interleukin-10 and RANKL:osteoprotegerin ratios in the periodontal tissues. *J Periodontal Res.* 2007; 42(2):184-91.

Chakrabarti S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res.* 2005; 31: 599–621.

Collin HL, Sorsa T, Meurman JH, Niskanen L, Salo T, Rönkä H, Konttinen YT, Koivisto AM, Uusitupa M. Salivary matrix metalloproteinase (MMP-8) levels and gelatinase (MMP-9) activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontal Res.* 2000; 35(5):259-65.

Colombo AP, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, et al. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol.* 2009 Sep;80(9):1421-32.

Costa PP, Trevisan GL, Macedo GO, Palioto DB, Souza SL, Grisi MF, et al. Salivary interleukin-6, matrix metalloproteinase-8, and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes. *J Periodontol.* 2010; 81(3): 384-91.

D'Armiento J, Dalal SS, Okada Y, Berg RA, Chada K. Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. *Cell.* 1992; 71: 955–961.

D'Armiento J, DiColandrea T, Dalal SS, Okada Y, Huang MT, Conney AH, et al. Collagenase expression in transgenic mouse skin causes hyperkeratosis and acanthosis and increases susceptibility to tumorigenesis. *Mol Cell Biol.* 1995; 15:5732–5739

Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Microbial comparison of smoker and non-smoker adult and early-onset periodontitis patients by polymerase chain reaction. *J Clin Periodontol.* 2000; 27(6):417-24.

Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M, et al. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet.* 2005 Nov 19;366(9499):1784-93.

Department of Health and Human Services (DHH). The health consequences of involuntary exposure to tobacco smoke: a report of the Surgeon General. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2006.

Desrochers PE, Mookhtiar K, Van Wart HE, Hasty KA, Weiss SJ. Proteolytic inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor and alpha 1-antichymotrypsin by oxidatively activated human neutrophil metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1992; 5; 267(7):5005-12.

Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ.* 2004; 328(7455):1519-28.

Dong W, Xiang J, Li C, Cao Z, Huang Z. Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer is associated with matrix metalloproteinase-1 and -2 in gingival tissues from patients with periodontitis. *J Periodontal Res.* 2009; 44(1):125-32.

Dozier S, Escobar GP, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase (MMP)-7 activates MMP-8 but not MMP-13. *Med Chem.* 2006; 2(5):523-6.

Duarte PM, Santos VR, dos Santos FA, Pereira SAL, Rodrigues DBR, Napimoga MH. Role of smoking and type 2 diabetes in the immunobalance of advanced chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2011; 82: 429-438.

Dubois B, Arnold B, Opdenakker G. Gelatinase B deficiency impairs reproduction. *J Clin Invest.* 2000; 106: 627-628.

Engbreton SP, Hey-Hadavi J, Ehrhardt FJ, Hsu D, Celenti RS, Grbic JT, et al. Gingival crevicular fluid levels of IL-1 β and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2004; 75: 1203-1208.

Ezhilarasan R, Jadhav U, Mohanam I, Rao JS, Gujrati M, Mohanam S. The hemopexin domain of MMP-9 inhibits angiogenesis and retards the growth of intracranial glioblastoma xenograft in nude mice. *Int J Cancer.* 2009; 15; 124(2): 306-15.

Faria-Almeida R, Navarro A, Bascones A. Clinical and metabolic changes after conventional treatment of type 2 diabetic patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2006; 77: 591-598.

Fang Y, Svoboda KK. Nicotine inhibits myofibroblast differentiation in human gingival fibroblasts. *J Cell Biochem.* 2005; 95: 1108–111.

Faveri M, Mayer MP, Feres M, Figueiredo LC, Dewhirst FE, Paster BJ. Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiology Immunology.* 2008; 23: 112-8.

Gao S, Chen K, Zhao Y. Transcriptional and posttranscriptional inhibition of lysyl oxidase expression by cigarette smoke condensate in cultured rat fetal lung fibroblasts. *Toxicol Sci.* 2005; 87: 197–203.

Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40: 1334–1347.

Golub LM, Lee HM, Greenwald RA, Ryan ME, Sorsa T, Salo T, Giannobile WV. A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult periodontitis. *Inflamm Res.* 1997 Aug;46(8):310-9.

Golub LM, Lee HM, Ryan ME. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res.* 1998; 12: 12-26.

Gomes LR, Terra LF, Wailemann RA, Labriola L, Sogayar MC. TGF-beta1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2012; 19; 12(1): 26.

Gomis-Rüth FX. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol Biotechnol.* 2003; 24(2): 157-202.

Gruber BL, Marchese MJ, Suzuki K, Schwartz LB, Okada Y, Nagase H, et al. Synovial procollagenase activation by human mast cell tryptase dependence upon matrix metalloproteinase 3 activation. *J Clin Invest.* 1989; 84(5): 1657-62.

Gursoy UK, Kononen E, Pradhan-Palikhe P, Tervahartiala T, Pussinen PJ, Suominen-Taipale L, et al. Salivary MMP-8, TIMP-1, and ICTP as markers of advanced periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2010; 37: 487–493.

Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol*. 2001; 28(5):377-88.

Han SY, Jee YH, Han KH, Kang YS, Kim HK, Han JY, et al. An imbalance between matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 contributes to the development of early diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21(9): 2406-16.

Hardy DC, Ross JH, Schuyler CA, Leite RS, Slate EH, Huang Y. Matrix metalloproteinase-8 expression in periodontal tissues surgically removed from diabetic and non-diabetic patients with periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2011; 20.

Hasty KA, Pourmotabbed TF, Goldberg GI, Thompson JP, Spinella DG, Stevens RM, Mainardi CL. Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1990; 265(20): 11421-4.

Herman MP, Sukhova GK, Kisiel W, Foster D, Kehry MR, Libby P, Schönbeck U. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001; 107(9): 1117-26.

Hernández M, Gamonal J, Tervahartiala T, Mäntylä P, Rivera O, Dezerega A, et al. Associations between matrix metalloproteinase-8 and -14 and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid from subjects with progressive chronic periodontitis: a longitudinal study. *J Periodontol*. 2010; 81(11):1644-52.

Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest*. 1998; 102(3):538-49.

Isaza-Guzmán DM, Arias-Osorio C, Martínez-Pabón MC, Tobón-Arroyave SI. Salivary levels of matrix metalloproteinase (MMP)-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)-1: a pilot study about the relationship with periodontal status and MMP-9(-1562C/T) gene promoter polymorphism. *Arch Oral Biol*. 2011; 56(4): 401-11.

Jacob V, Vellappally S, Smejkalová J. The influence of cigarette smoking on various aspects of periodontal health. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2007; 50(1):3-5.

Kaner RJ, Santiago F, Crystal RG. Up-regulation of alveolar macrophage matrix metalloproteinases in HIV1(+) smokers with early emphysema. *J Leukoc Biol*. 2009; 86(4): 913-22.

Kardeşler L, Biyikoğlu B, Cetinkalp S, Pitkala M, Sorsa T, Buduneli N. Crevicular fluid matrix metalloproteinase-8, -13, and TIMP-1 levels in type 2 diabetics. *Oral Dis*. 2010 Jul;16(5):476-81.

Katz IA, Harlan A, Miranda-Palma B, Prieto-Sanchez L, Armstrong DG, Bowker JH, et al. A randomized trial of two irremovable off-loading devices in the management of plantar neuropathic diabetic foot ulcers. *Diabetes Care*. 2005; 28(3): 555-9.

Kenney EB, Kraal JH, Saxe SR, Jones J. The effect of cigarette smoke on human oral polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontal Res*. 1977; 12(4):227-34.

Kerkelä E, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol*. 2003; 12(2):109-25.

Kim JB, Jung MH, Cho JY, Park JW, Suh JY, Lee JM. The influence of type 2 diabetes mellitus on the expression of inflammatory mediators and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 in human chronic periodontitis. *J Periodontal Implant Sci*. 2011; 41(3):109-16.

Kinane DF, Mooney J, Ebersole JL. Humoral immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. *Periodontol* 2000. 1999; 20:289-340.

Knäuper V, Murphy G, Tschesche H. Activation of human neutrophil procollagenase by stromelysin 2. *Eur J Biochem*. 1996; 15: 187-91.

Knäuper V, Wilhelm SM, Seperack PK, DeClerck YA, Langley KE, Osthues A, Tschesche H. Direct activation of human neutrophil procollagenase by recombinant stromelysin. *Biochem J.* 1993 Oct 15;295 (Pt 2):581-6.

Koch S, Volkmar CM, Kolb-Bachofen V, Korth HG, Kirsch M, Horn AH, Sticht H, Pallua N, Suschek CV. A new redox-dependent mechanism of MMP-1 activity control comprising reduced low-molecular-weight thiols and oxidizing radicals. *J Mol Med (Berl).* 2009; 87(3):261-72.

Kroening PR, Barnes TW, Pease L, Limper A, Kita H, Vassallo R. Cigarette smoke-induced oxidative stress suppresses generation of dendritic cell IL-12 and IL-23 through ERK-dependent pathways. *J Immunol.* 2008; 181(2):1536-47.

Kubota T, Itagaki M, Hoshino C. Altered gene expression levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in periodontitis-affected gingival tissue. *J Periodontol.* 2008; 79: 166–173.

Kumar MS, Vamsi G, Sripriya R, Sehgal PK. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. *J Periodontol.* 2006; 77(11):1803-8.

Kuula H, Salo T, Pirilä E, Tuomainen AM, Jauhiainen M, Uitto VJ, et al. Local and systemic responses in matrix metalloproteinase 8-deficient mice during *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis. *Infect Immun.* 2009; 77(2):850-9.

Lalla E, Lamster IB, Drury S, Fu C, Schmidt AM. Hyperglycemia, glycooxidation and receptor for advanced glycation endproducts: potential mechanisms underlying diabetic complications, including diabetes-associated periodontitis. *Periodontol* 2000. 2000; 23: 50-62.

Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette smoking and inflammation: Cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res.* 2012; 91(2); 142-149.

Liu R, Bal T, Desta T, Krothapalli N, Luan Q, Graves DT. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhances resorption and diminished bone formation. *J Den Res.* 2006; 85(6): 510-514

Liu WH, Chen XM, Fu B. Thrombin stimulates MMP-9 mRNA expression through AP-1 pathway in human mesangial cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2000; 21(7): 641-5.

Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Tratato de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral.* 4ª Ed. Guanabara Koogan, 2005.

Loe H. Periodontal changes in pregnancy. *J Periodontol.* 1965; 36:209-17.

Loesche WJ, Syed SA, Schmidt E, Morrison EC. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. *J Periodontol.* 1985; 56(8): 447-56.

Maeda M, Vanlandingham BD, Ye H, Lu PC, Azar DT. Immunofluorescence localization of gelatinase B expressed by migrating intrastromal epithelial cells after deep annular excimer keratectomy. *Curr Eye Res.* 1998; 17(8): 836-43.

Maskos K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie.* 2005; 87(3-4): 249-63.

Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2007; 44: 127-53.

Maeso G, Bravo M, Bascones A. Levels of metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis, gingivitis, and healthy gingiva. *Quintessence Int.* 2007; 38(3):247-52.

Méndez JD, Xie J, Aguilar-Hernández M, Méndez-Valenzuela V. Molecular susceptibility to glycation and its implication in diabetes mellitus and related diseases. *Mol Cell Biochem.* 2010; 344(1-2):185-93.

Molloy KJ, Thompson MM, Schwalbe EC, Bell PR, Naylor AR, Loftus IM. Elevation in plasma MMP-9 following carotid endarterectomy is associated with particulate cerebral embolisation. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004; 27(4):409-13.

Mouzakiti E, Pepelassi E, Fanourakis G, Markopoulou C, Tseleni-Balafouta S, Vrotsos I. The effect of smoking on the mRNA expression of MMPs and TIMP-1 in

untreated chronic periodontitis patients: a cross-sectional study. *J Periodontal Res.* 2011; 46(5):576-83.

Muller M, Trocme C, Lardy B, Morel F, Halimi S, Benhamou PY. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabet Med.* 2008; 25(4):419-26.

Murphy G. New management roles. *Volunt Leader.* Spring 1991; 32(1):7-8.

Naguib G, Al-Mashat H, Desta T, Graves DT. Diabetes prolongs the inflammatory response to a bacterial stimulus through cytokine dysregulation. *J Invest Dermatol.* 2004; 123(1):87-92.

Nair P, Sutherland G, Palmer RM, Wilson RF, Scott DA. Gingival bleeding on probing increases after quitting smoking. *J Clin Periodontol.* 2003 May;30(5):435-7.

Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol.* 1996; 1(1):821-78.

Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem.* 1992 Feb 25;267(6):3581-4.

Oliveira ACG. Caracterização do perfil microbiológico do filme subgingival de indivíduos com periodontite crônica e com saúde periodontal por meio do estudo de espécies bacterianas incomuns ou ainda não cultivadas. [Mestrado em Odontologia] Guarulhos: Universidade Guarulhos; 2011.

Overall CM. Matriz metalloproteinase substrate binding domains, modules and exosites. Overview and experimental strategies, *Meth. Mol Biol* 2001; 151: 79-120.

Ozçaka O, Biçakci N, Pussinen P, Sorsa T, Köse T, Buduneli N. Smoking and matrix metalloproteinases, neutrophil elastase and myeloperoxidase in chronic periodontitis. *Oral Dis.* 2011; 17(1):68-76.

Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 1991; 26: 230-42.

Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*. 1997;14:9-11.

Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8: 221–233.

Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors-tobacco smoking. *J Clin Periodontol*. 2005; 6: 180-95.

Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000*. 2006; 42:80-7.

Pérez T, Mal H, Aguilaniu B, Brillet PY, Chaouat A, Louis R, et al. COPD and inflammation: statement from a French expert group. Phenotypes related to inflammation. *Rev Mal Respir*. 2011; 28(2):192-215.

Persson L, Bergström J, Gustafsson A. Effect of tobacco smoking on neutrophil activity following periodontal surgery. *J Periodontol*. 2003; 74(10):1475-82.

Ponte E, Tabaj D, Maglione, M, Melato M. Diabetes mellitus and oral disease. *Acta Diabetol*. 2001; 38: 57-62.

Ramseier CA, Kinney JS, Herr AE, Braun T, Sugai JV, Shelburne CA, Rayburn LA, Tran HM, Singh AK, Giannobile WV. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. *J Periodontol*. 2009; 45: 38-47.

Renò F, Rocchetti V, Migliario M, Rizzi M, Cannas M. Chronic exposure to cigarette smoke increases matrix metalloproteinases and Filaggrin mRNA expression in oral keratinocytes: role of nicotine stimulation. *Oral Oncol*. 2011; 47(9): 827-30.

Rhodes CJ. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science*. 2005; 307(5708):380-4.

Rivera HF. Smoking and periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2003; 32:50–58.

Roy S, Trudeau K, Roy S, Behl Y, Dhar S, Chronopoulos A. New insights into hyperglycemia-induced molecular changes in microvascular cells. *J Dent Res*. 2010; 89(2):116-27.

Ryder MI. The influence of smoking on host responses in periodontal infections. *Periodontol 2000*. 2007; 43:267–277.

Schettler A, Thorn H, Jockusch BM, Tschesche H. Release of proteinases from stimulated polymorphonuclear leukocytes. Evidence for subclasses of the main granule types and their association with cytoskeletal components. *Eur J Biochem*. 1991; 197:197–202.

Schönbeck U, Mach F, Libby P. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol*. 1998; 161(7):3340-6.

Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol 2000*. 1997;13:91-120.

Scott DA, Palmer RM, Stapleton JA. Validation of smoking status in clinical research into inflammatory periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2001; 43: 23-35.

Sela-Passwell N, Rosenblum G, Shoham T, Sagi I. Structural and functional bases for allosteric control of MMP activities: can it pave the path for selective inhibition? *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1803: 29-38.

Sexton WM, Lin Y, Kryscio RJ, Dawson DR 3rd, Ebersole JL, Miller CS. Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment. *J Clin Periodontol*. 2011; 38(5):434-41.

Shapiro S, Khodalev O, Bitterman H, Auslender R, Lahat N. Different activation forms of MMP-2 oppositely affect the fate of endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010; 298(4): C942-51.

Smith PC, Muñoz VC, Collados L, Oyarzún AD. In situ detection of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in gingival epithelium in human periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2004; 39(2):87-92.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in sub gingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25(2):134-44.

Sonis ST, Fazio RC, Fang L. *Princípios e prática de medicina oral.* 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

Sorsa T, Hernández M, Leppilähti J, Munjal S, Netuschil L, Mäntylä P. Detection of gingival crevicular fluid MMP-8 levels with different laboratory and chair-side methods. *Oral Dis.* 2010;16(1):39-45.

Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. Matrixmetalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis* 2004; 10:311–318.

Southerland JH, Taylor GW, Moss K, Beck JD, Offenbacher S. Commonality in chronic inflammatory diseases: periodontitis, diabetes and coronary artery disease. *Periodontol* 2000. 2006; 40:130-43.

de Souza AP, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB Jr, Barros SP, Line SR. Analysis of the MMP-9 (C-1562 T) and TIMP-2 (G-418C) gene promoter polymorphisms in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(2):207-11.

Stadlmann S, Pollheimer J, Moser PL, Raggi A, Amberger A, Margreiter R, Offner FA, Mikuz G, Dirnhofer S, Moch H. Cytokine-regulated expression of collagenase-2 (MMP-8) is involved in the progression of ovarian cancer. *Eur J Cancer.* 2003; 39:2499–2505.

Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2000;10(6):415-33.

Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001; 17:463– 516.

Takeda M, Ojima M, Yoshioka H, Inaba H, Kogo M, Shizukuishi S, et al. Relationship of serum advanced glycation end products with deterioration of periodontitis in type 2 diabetes patients. *J Periodontol.* 2006; 77(1):15-20.

Tallant C, Marrero A, Gomis-Rüth FX. Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1803(1):20-8.

Tam EM, Moore TR, Butler GS, Overall CM. Characterization of the distinct collagen binding, helicase and cleavage mechanisms of matrix metalloproteinase 2 and 14 (gelatinase A and MT1-MMP): the differential roles of the MMP hemopexin c domains and the MMP-2 fibronectin type II modules in collagen triple helicase activities. *J Biol Chem*. 2004; 8;279(41):43336-44.

Teixeira SR, Mattarazo F, Feres M, Figueiredo LC, de Faveri M, Simionato MR, et al. Quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *fimA* genotypes in smoker chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2009; 36(6):482-7.

Telles FR, Teles RP, Siegelin Y, Pastes B, Haffajee AD, Socransky SS. RNA-oligonucleotide quantification technique (ROQT) for the enumeration of uncultivated bacterial species in subgingival biofilms. *Molecular Oral Microbiology* 2011; 26: 127-39.

Expert committee on the diagnosis and classification on Diabetes mellitus, The. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1999; vol.22, Suppl.1.

Trengove NJ, Stacey MC, MacAuley S, Bennett N, Gibson J, Burslem F, et al. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair Regen*. 1999; 7(6):442-52.

Van der Velden U, Varoufaki A, Hutter JW, Xu L, Timmerman MF, Van Winkelhoff AJ, Loos BG. Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora. *J Clin Periodontol*. 2003; 30(7):603-10.

Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res*. 2002; 4(3):157-64.

Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003; 2;92(8):827-39.

Watson AM, Benton AS, Rose MC, Freishtat RJ. Cigarette smoke alters tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 9 levels in the basolateral secretions of human asthmatic bronchial epithelium in vitro. *J Investig Med*. 2010; 58(5):725-9.

Wehba C, Rodrigues AS, Soares FP. Diabetes e doença periodontal: uma relação bidirecional. *Periodontia Médica: Uma abordagem integrada*. São Paulo: Senac, 2004.

World Health Organization (WHO) . Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva: 2009.

World Health Organization (WHO). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Geneva, World Health Organization, 1999.

Yakob M, Kari K, Tervahartiala T, Sorsa T, Söder PO, Meurman JH, Söder B. Associations of periodontal microorganisms with salivary proteins and MMP-8 in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*. 2011.

Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase 9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*. 2000; 14: 163-176.

Yu S, Li H, Ma Y, Fu Y. Matrix Metalloproteinase-1 of Gingival Fibroblasts Influenced by Advanced Glycation End Products (AGEs) and Their Association With Receptor for AGEs and Nuclear Factor- κ B in Gingival Connective Tissue. *J Periodontol*. 2012; 83(1):119-26.

Zeilhofer HU, Schorr W. Role of interleukin-8 in neutrophil signaling. *Curr Opin Hematol*. 2000; 7(3):178-82.

Zhang W, Song F, Windsor LJ. Effects of tobacco and *P. gingivalis* on gingival fibroblasts. *J Dent Res*. 2010; 89(5):527-31.

Zhou J, Olson BL, Windsor LJ. Nicotine increases the collagen-degrading ability of human gingival fibroblasts. *J Periodont Res.*2007; 42:228–235.

ANEXO 1



Guarulhos, 18 de fevereiro de 2011.

Exmo(a). Sr(a).
 Marta Ferreira Bastos

Referência: **Aprovação de Projeto**
SISNEP/659 - "Participação das metaloproteinases (MMPS) 1,2,3,4,6,8,9,13 e seus inibidores (TIMPS) 1 e 2, na periodontite crônica em pacientes sistemicamente saudáveis, fumantes e/ou diabéticos"

PARECER Nº 16/11

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos analisou o Projeto de Pesquisa de sua autoria - "Participação das metaloproteinases (MMPS) 1,2,3,4,6,8,9,13 e seus inibidores (TIMPS) 1 e 2, na periodontite crônica em pacientes sistemicamente saudáveis, fumantes e/ou diabéticos" - SISNEP/659, na reunião de 15.02.2011, e no uso das competências definidas na Res. CNS 196/96, considerou o projeto acima **aprovado**.

As orientações abaixo devem ser consideradas pelo Pesquisador Responsável durante a realização da pesquisa, visando que a mesma se desenvolva respeitando os padrões éticos:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- Eventuais modificações ou emendas e eventos adversos ao protocolo, devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.
- Esclarecemos a necessidade da apresentação de relatório final até **20.02.12**.

Jumará Silvia Van De Velde
 Comitê de Ética em Pesquisa
 Coordenadora



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por esse instrumento particular declaro, para os devidos fins éticos e legais, que eu (nome) _____, (nacionalidade) _____, (profissão) _____, portador do R.G. _____, CPF _____, residente e domiciliado à _____, na cidade de _____, Estado de _____, concordo em absoluta consciência com os procedimentos de exame Periodontal, exodontia e coleta do tecido gengival ao redor do dente submetido á exodontia a que vou me submeter para realização do projeto de pesquisa denominado **“Participação das Metaloproteinases (MMPs) 1, 2, 4, 6, 8, 9, 13 e seus inibidores (TIMPS) 1 e 2 na Periodontite Crônica em pacientes sistemicamente saudáveis, fumantes e/ou diabéticos”**. Estou ciente de que a pesquisa a que vou me submeter tem como objetivo observar o perfil de expressão de metaloproteinases e seus inibidores (células de reparo) na periodontite crônica em sujeitos da pesquisa sistemicamente saudáveis, diabéticos e/ou fumantes.

Esclareço que recebi explicação verbal e também por escrito de todas as informações sobre minha participação nesse trabalho científico, bem como os riscos e benefícios, por uma pessoa não envolvida no estudo e que sei que tenho total liberdade para desistir em qualquer momento bem como solicitar esclarecimentos a qualquer hora da pesquisa, sem sofrer nenhum prejuízo nos demais tratamentos oferecidos pela universidade.

Assinatura do indivíduo da pesquisa/Data

Assinatura do Pesquisador responsável/ Data

Fui esclarecido verbalmente e por escrito, que não haverá nenhuma cobrança financeira para tal tratamento e que receberei gratuitamente os analgésicos (quando necessários);

Autorizo para fins de pesquisa, o uso, a divulgação e a publicação em revista científica de todos os dados e resultados obtidos desta pesquisa, desde que minha identidade seja mantida em absoluto sigilo;

Estou ciente que todas essas normas estão de acordo com o Código de Ética Profissional Odontológico, segundo a resolução C.F. 179/93 e com a Declaração de Helsinque II.

Portanto, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, dato e assino esse termo de consentimento informado, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo.

Assinatura do indivíduo da pesquisa/Data

Assinatura do Pesquisador responsável/ Data