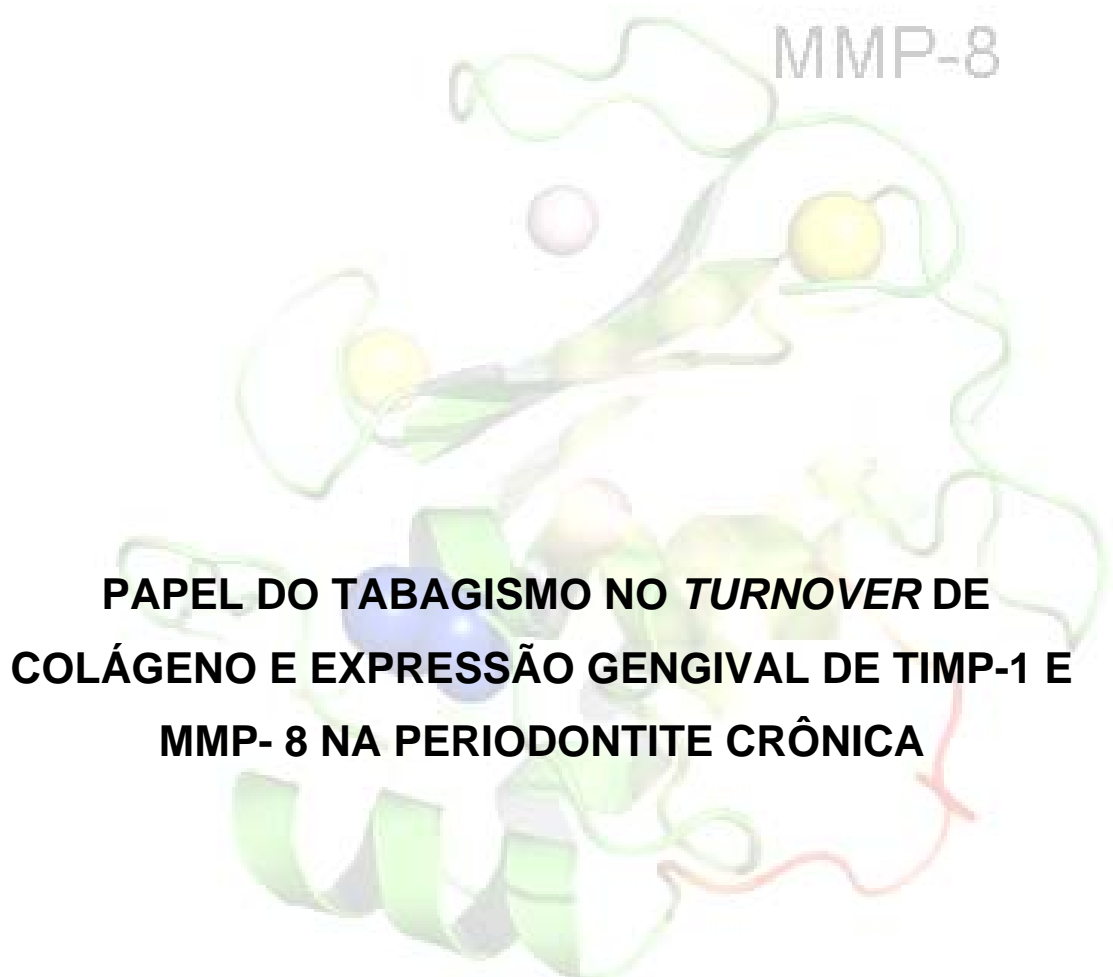


|
Carolina Ferreira Franco



Belo Horizonte
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UFMG
2008

Carolina Ferreira Franco

**PAPEL DO TABAGISMO NO *TURNOVER* DE
COLÁGENO E EXPRESSÃO GENGIVAL DE TIMP-1 E
MMP- 8 NA PERIODONTITE CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, com área de concentração em Periodontia.

Orientador: José Eustáquio da Costa

Co-orientadora: Patrícia Maria D`Almeida Lima

Belo Horizonte
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UFMG
2008

Aos meus pais e meus irmãos, grandes incentivadores e companheiros.

Aos meus queridos avós, maiores exemplos de vida.

Ao Beto, pela compreensão e amor tão imprescindíveis

para que eu pudesse concluir este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao professor José Eustáquio da Costa, orientador desta monografia, pelos conhecimentos transmitidos durante toda a minha formação técnico-científica, pelo exemplo de dedicação e pelo empenho para garantir os subsídios necessários à conclusão desse trabalho.

À professora Patrícia Maria D'Almeida Lima, pelo apoio, dedicação e participação decisivos ao longo de todo o desenvolvimento do trabalho, desde sua elaboração até o desenvolvimento prático, análise conjunta das lâminas e redação.

Ao professor Ricardo Santiago Gomez, que abriu as portas do laboratório, permitindo que este projeto fosse desenvolvido com toda a estrutura necessária.

À professora Rogéria Serakides, pela confiança depositada e pelo auxílio na análise das lâminas no microscópio de luz polarizada do Departamento de Patologia da Faculdade de Veterinária.

À professora Telma Lorentz, exemplo de profissional competente e docente dedicada. Obrigada por ter despertado, ainda no 4º período de graduação, meu interesse pela periodontia.

À toda equipe de professores e alunos dos cursos de Especialização e Aperfeiçoamento em Periodontia da FO-UFMG, pela disposição e preocupação em estar sempre ajudando nas coletas.

À Ana Carolina Dupim Souza, colega, amiga e companheira.

À Paula Rocha, Jeane Correia, Carolina Gomes, Marina e João Arthur. Mais do que colegas de laboratório, vocês contribuíram para o meu desenvolvimento como pesquisadora e tornaram os longos dias de imuno mais agradáveis e prazerosos.

À Daniele, que sempre garantiu que a estrutura do laboratório estivesse impecável.

Aos colegas de curso Bruna, Geane, Ricardo e Warley, pelo companheirismo.

À Dra. Vanessa Frasão, pelo auxílio na coleta de amostras.

Ao Dr. Leonardo Wykrota, pelo apoio e incentivo.

Ao Dr. Marcelo Teixeira da Costa Filho, por me receber de braços abertos.

A Dra. Danielle Vilela pelo apoio e conselhos.

Ao Dr. Marcelo Hannas pelo incentivo ao aperfeiçoamento profissional.

Aos coordenadores do Tribunal, Miriam, Efigênia, Ricardo Gomez e Ricardo Vaz, por compreenderem as exigências do mestrado e permitirem a conciliação das duas atividades.

A Dri, Duca, Lili, Andréa, Magda, Elaine, Jana e Fernanda, por não me deixarem ficar louca com as exigências do consultório.

Ao Dr. Heli e Dr. José Eustáquio, colegas e “chefes”.

À Eva e Si, por agüentarem o excesso de papéis e a bagunça da minha mesa.

Aos meus amigos, por me lembrarem que a vida não é feita só de trabalho e do quanto o lazer e as gargalhadas tornam os momentos vividos ainda mais intensos.

“Eu não procuro saber as respostas, procuro compreender as perguntas.”

Confúcio

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o turnover de colágeno, a expressão de TIMP-1 e MMP-8 e a associação dessas variáveis no tecido gengival de indivíduos portadores de periodontite fumantes e não-fumantes. Amostras de tecido gengival de 14 indivíduos portadores de doença periodontal (DP) não-fumantes, 10 indivíduos portadores de DP fumantes e 12 controles foram coletadas durante cirurgias e armazenadas à -80°C até o processamento. A análise do colágeno gengival foi feita através do método picrossirius e a expressão gengival de MMP-8 e TIMP-1 foi determinada por imunoistoquímica. As amostras dos grupos controle e fumantes apresentaram menor proporção de fibras colágenas verdes (28,54% e 27,98%, respectivamente) e, maior proporção de fibras colágenas vermelhas (71,9% e 72,2%, respectivamente) do que as amostras do grupo DP (46,81% e 53,43%, respectivamente), indicando uma diminuição do *turnover* com acúmulo de fibras colágenas tipo I maduras ($p \leq 0,01$). A expressão de MMP-8 e TIMP-1 foi elevada no epitélio e conjuntivo das amostras dos 3 grupos. Apenas a expressão de MMP-8 na camada superficial do epitélio do grupo dos fumantes apresentou diferença estatística daquela apresentada pelo grupo DP ($p = 0,003$). Foi verificada correlação estatística (0,773; $p = 0,005$) entre a expressão de MMP-8 e TIMP-1 na camada superficial do epitélio das amostras do grupo controle sugerindo a presença de equilíbrio. Não foi verificada correlação significativa entre a proporção de fibras verdes/ vermelhas e a expressão de MMP-8 ou TIMP-1. Este estudo sugere que a característica fibrosa do tecido gengival de fumantes com DP está associada à maior proporção de fibras colágenas tipo I maduras e ao menor *turnover* de colágeno.

PALAVRAS-CHAVE: metaloproteinase da matriz, inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz, colágeno, doença periodontal.

EFFECT OF SMOKING ON TIMP-1 AND MMP-8 EXPRESSION AND GINGIVAL COLLAGEN TURNOVER IN PERIODONTAL DISEASE

ABSTRACT

The aim of this paper was to evaluate the collagen turnover and its correlation to TIMP-1 and MMP-8 expression in gingival tissue of smokers and non-smokers periodontal patients. Gingival samples of 14 non-smokers patients with periodontal disease (PD) 10 periodontal smokers patients (S) and 10 controls (C) were harvested during periodontal surgery and stored frozen at -80°C until manipulation. Gingival collagen was analyzed through picosirius staining and gingival expression of MMP-8 e TIMP-1 was determined by immunohistochemistry. Gingival tissue from group C and S showed smaller proportion of green fibers (28,54% and 27,98%, respectively) and, greatest proportion of red fibers (71,9% and 72,2%, respectively) than gingival tissue from PD group (46,81% and 53,43%, respectively), indicating a turnover impairment associated to mature type I collagen retention. This findings were statistically significant ($p \leq 0,01$). MMP-8 and TIMP-1 immunostaining was intense in epithelium and connective tissue of samples from all the 3 groups. Only immunostaining of superficial layer of S group was statistically different from that in group PD ($p = 0,003$). There was statistical correlation (0,773; $p = 0,005$) between MMP-8 and TIMP-1 immunostaining in superficial epithelial layer, suggesting balance. There was no statistical correlation between red/green fibers proportion. These results suggest that the fibrous gingival tissue of smokers with PD is associated with greatest type I mature collagen fibers amounts and smaller collagen turnover. However these changes do not seem to be inflected by TIMP-1 and MMP-8 expression in samples collected after periodontal treatment.

KEYWORDS: matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase, collagen, periodontal disease.

LISTA DE ABREVIATURAS

α_2 AP	Alfa 2 antiplasmina
α_2 M	Alfa 2 macroglobulina
α_1 PI	Alfa 1 Inibidor de proteinase; <i>proteinase inhibitor</i>
Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
C	Controle
CD	Marcador para linfócito ; <i>Cluster of differentiation</i>
CD4+	Marcador para linfócito T auxiliar; <i>cluster of differentiation 4</i>
CD8+	Marcador para linfócito T citotóxico; <i>cluster of differentiation 8</i>
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAB	Diaminobenzidina
DP	Doença periodontal
EDTA	Ácido etil diamino tetracético
EGF	Fator de crescimento endotelial
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
F	Fumantes
FGC	Fluido gengival crevicular
GRB	Granzyma B
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1beta
LB	Linfócito B
LT	Linfócito T
MT	Transmembrana
MMP	Metaloproteinase da matriz
MMP-8	Metaloproteinase da matriz 8
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde

OR	<i>Odds ratio</i>
PAI	Inibidor de ativador de plasminogênio; <i>Plasminogen activator inhibitor</i>
PBS	Salina de fosfato tamponado; <i>Phosphate buffered saline</i>
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PLP	Proteína de ligação proteoglicana
PMN	Polimorfonucleares
PO	Perda óssea
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	Transcrição reversa de reação de cadeia de polimerase
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel eletrophoresis</i>
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase; <i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TGF- α	Fator transformador de crescimento alfa
TGF- β	Fator transformador de crescimento beta
TIA-1	<i>Resting T lymphocyte possessing cytolyte potential</i>
TTC	Tetraciclina

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Produção de fibras do tecido conjuntivo pelos fibroblastos.....	20
FIGURA 2 -	Efeitos do fumo nos processos imunes e inflamatórios da doença periodontal	36
FIGURA 3 -	Desenho esquemático da estrutura das MMP`s	40
FIGURA 4 -	Distribuição de fibras colágenas verdes e vermelhas no tecido conjuntivo de indivíduos dos grupos periodontite não- fumantes (DP), periodontite fumantes (F) e controle (C) em um aumento de 50X	68
FIGURA 5 -	Análise imunoistoquímica da expressão de MMP-8 no epitélio e conjuntivo dos indivíduos dos grupos periodontite não-fumantes (DP), periodontite fumantes (F) e controle (C) em um aumento de 400x.....	69
FIGURA 6 -	Análise imunoistoquímica da expressão de TIMP-1 no epitélio e conjuntivo dos indivíduos dos grupos periodontite não-fumantes (DP), periodontite fumantes (F) e controle (C) em um aumento de 400x.....	74

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	Expressão de MMP-8 na camada superficial do epitélio.....	70
GRÁFICO 2 -	Expressão de MMP-8 na camada suprabasal do epitélio....	70
GRÁFICO 3 -	Expressão de MMP-8 na camada basal do epitélio.....	71
GRÁFICO 4 -	Expressão de MMP-8 na camada superficial do conjuntivo.	72
GRÁFICO 5 -	Expressão de MMP-8 na camada profunda do conjuntivo...	73
GRÁFICO 6 -	Expressão de TIMP-1 na camada superficial do epitélio.....	75
GRÁFICO 7 -	Expressão de TIMP-1 na camada supra-basal do epitélio...	75
GRÁFICO 8 -	Expressão de TIMP-1 na camada basal do epitélio.....	76
GRÁFICO 9 -	Expressão de TIMP-1 na camada superficial do conjuntivo	77
GRÁFICO 10 -	Expressão de TIMP-1 na camada profunda do conjuntivo..	78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Composição do tecido gengival sadio	19
TABELA 2 – As proteínas colágenas gengivais	21
TABELA 3– Proporção dos tipos de colágeno no tecido gengival	25
TABELA 4 – A família das metaloproteinases humanas	38
TABELA 5 – Expressão de Metaloproteinase pelos 5 principais grupos celulares	41
TABELA 6 – Os inibidores teciduais de MMP	46
TABELA 7 – Estudos que avaliaram MMP e TIMP-1 no FGC de indivíduos com periodontite crônica	57
TABELA 8 – Caracterização da amostra de indivíduos incluídos no estudo	60
TABELA 9 – Proporção de fibras colágenas verdes e vermelhas entre indivíduos com periodontite não-fumantes (G1), com periodontite e fumantes (G2), controles saudáveis (G3)	67

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	A doença periodontal	17
2.2	O tecido gengival	18
2.2.1	O tecido gengival normal	18
2.2.2	Alterações histológicas do tecido gengival de portadores de doença periodontal	22
2.3	O Tabagismo	28
2.3.1	Papel do tabagismo na doença periodontal	29
2.4	As metaloproteinases da matriz e seus inibidores	37
2.4.1	As MMP's	37
2.4.2	Os inibidores teciduais de metaloproteinases da matriz	45
2.4.3	O papel das metaloproteinases na degradação de colágeno gengival	49
2.4.4	Estudos que avaliaram a expressão de MMP e TIMP-1 no tecido gengival	49
2.4.5	Estudos que avaliaram os níveis de MMP e TIMP-1 no FGC ...	52
3	OBJETIVOS	58
3.1	Objetivos gerais	58
3.2	Objetivos específicos	58
4	METODOLOGIA	59
4.1	Amostra	59
4.1.1	Critérios de inclusão	61
4.1.2	Critérios de exclusão	61

4.2	Considerações éticas	62
4.3	Protocolo para a obtenção dos dados	62
4.3.1	Questionário	62
4.3.2	Dados clínicos	63
4.3.3	Coleta das amostras de tecido	63
4.3.4	Microscopia de luz polarizada	64
4.3.5	Imunoistoquímica	64
4.3.6	Contagem das células positivas	65
4.4	Análise estatística	66
5	RESULTADOS	67
5.1	Análise morfológica do tecido através da técnica picrosírius	67
5.2	Imunoexpressão de MMP-8	69
5.2.1	Camada superficial do epitélio	69
5.2.2	Camada suprabasal do epitélio.	70
5.2.3	Camada basal do epitélio	71
5.2.4	Camada superficial do conjuntivo	72
5.2.5	Camada profunda do conjuntivo	72
5.3	Imunoexpressão de TIMP-1	74
5.3.1	Camada superficial do epitélio	74
5.3.2	Camada suprabasal do epitélio	75
5.3.3	Camada basal do epitélio	76
5.3.4	Camada superficial do conjuntivo	77
5.3.5	Camada profunda do conjuntivo	77
6	DISCUSSÃO	79
7	CONCLUSÕES	87
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
	ANEXO A	104
	ANEXO B	105
	ANEXO C	106
	ANEXO D	107
	ANEXO E	108

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1998, o número de fumantes abrangia 1.1 bilhão de pessoas em todo o mundo, sendo que 800 milhões pertenciam aos países em desenvolvimento. Esses números representam aproximadamente 1/3 da população mundial acima de 15 anos de idade e identificam um enorme problema de saúde (Scott, Palmer & Stapleton, 2001).

O hábito de fumar tem um impacto significativo no estado de saúde da população, constituindo um fator de risco classicamente associado com câncer, doença pulmonar, cardiovascular e problemas gestacionais (Biddle et al., 2001).

O tabagismo, além da diabetes e dos fatores genéticos, destaca-se, também, como fator de risco conhecido para a periodontite. Hoje, sabe-se que, apesar da causa primária da periodontite ser o efeito cumulativo da interação entre o desafio bacteriano e a resposta imune e inflamatória do hospedeiro, fatores de risco podem modificar a resposta periodontal à agressão microbiana (Palmer et al., 1999; Calsina, Ramón & Echeverría, 2002).

O hábito de fumar tem efeitos crônicos em longo prazo sobre vários aspectos importantes da resposta imune e inflamatória do tecido periodontal. Estudos histológicos demonstraram que ele induz alterações vasculares, interfere na expressão de citocinas e na função dos neutrófilos, linfócitos e fibroblastos (Palmer et al., 2005).

Além de modificar as alterações vasculares e celulares típicas da periodontite, o fumo parece interferir nas alterações das estruturas colágenas gengivais. As modificações nas estruturas colágenas têm sido amplamente relacionadas às alterações na expressão de metaloproteinases da matriz (MMP's), principalmente a metaloproteinase da matriz 8 (MMP-8), e inibidores teciduais de metaloproteinases da matriz (TIMP's). Essas moléculas em equilíbrio estão relacionadas ao *turnover* tecidual normal, porém seu desequilíbrio resulta em

alterações na proporção dos tipos de colágeno e, conseqüentemente, na expressão de diversas doenças, entre elas a doença periodontal (Kerrigan, Mansell & Sandy, 2000; Ryan & Golub, 2000; Ryder, 2007).

O significado das alterações no colágeno, proteínas não-colágenas e proteoglicanas, durante o processo inflamatório, não foi completamente esclarecido (Mariotti, 1993). Identificar quais alterações são induzidas pelo fumo nas estruturas gengivais, particularmente na matriz extracelular, e quais contribuem para a elucidação dos mecanismos que resultam em uma condição periodontal distinta em indivíduos fumantes constituem questões de interesse científico pertinente. Afinal, a doença periodontal em fumantes apresenta sinais clínicos diferentes nos não-fumantes, com progressão e prognóstico desfavoráveis. O conjunto das características clínicas e histopatológicas já descritas justifica a relevância atual do estudo das estruturas colágenas nesse subgrupo de indivíduos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Doença Periodontal

A doença periodontal (DP) é uma infecção oportunista causada pelo desequilíbrio entre os fatores de virulência dos microrganismos patogênicos e mecanismos de defesa do hospedeiro, que resultam em uma resposta imuno-inflamatória capaz de provocar alterações deletérias nos tecidos de suporte dos dentes (Page *et al.*, 1997).

O termo doença periodontal refere-se a duas condições: à gengivite e à periodontite. A gengivite é uma condição inflamatória do tecido mole que circunda os dentes, a gengiva, caracterizada por uma resposta imune direta do hospedeiro à colonização das superfícies dentais por uma placa patogênica (Kinane, 2001).

A periodontite envolve a destruição dos tecidos de suporte do dente, incluindo o ligamento periodontal, osso e cemento, podendo levar à perda de elementos dentais. Requer a colonização microbiana da placa por patógenos específicos e acomete somente parte da população, demonstrando que nem todos os casos de gengivite evoluem para a periodontite (Kinane, 2001).

Embora os fatores microbianos sejam requeridos para o desenvolvimento da DP, sozinhos eles não predizem sua presença ou gravidade (Hart & Kornman, 1997; Page & Kornman, 1997). Elementos como resposta imune, estado sistêmico do paciente e outros fatores ambientais não relacionados à microbiota, como o tabagismo, são fatores contribuintes para a expressão da doença (Nunn, 2003).

Tomar & Asma (2000), avaliando a relação entre tabagismo e periodontite a partir de dados coletados no *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) III, observaram que os fumantes possuem uma chance maior de apresentar DP do que os não-fumantes (*Odds Ratio* - OR = 3,97) em uma associação dose dependente: enquanto os indivíduos que fumavam até nove

cigarros por dia apresentaram um OR = 2,79, aqueles que fumavam mais de 31 cigarros por dia apresentaram um OR = 5,88.

Sabendo que o tabagismo constitui, hoje, um dos principais fatores de risco para a incidência e progressão da periodontite, é importante entender os eventos histológicos que acometem o periodonto inflamado para tentar elucidar como o fumo afeta a resposta do hospedeiro e, conseqüentemente, o curso da doença periodontal (Ryan & Golub, 2000).

2.2 O tecido gengival

2.2.1 O tecido gengival normal

De todos os tecidos do periodonto, a gengiva recebe a maior atenção clínica. Ela é examinada com sondas, avaliada no que se refere a sua relação com o dente e quanto às alterações de cor, consistência e contorno, com o objetivo de descobrir mudanças que possam identificar áreas com doença. A importância da gengiva não se refere apenas ao seu papel na inserção do dente, mas também ao seu papel na resistência às agressões produzidas por bactérias e substâncias químicas e ao trauma ao qual a cavidade bucal está sujeita (Mariotti, 1993).

A gengiva sadia é caracterizada por um tecido conjuntivo fibroso constituído, principalmente, por colágeno e fibroblastos e, em menor proporção, por proteínas não-colágenas (que não apenas contribuem para a organização estrutural do tecido como também são importantes na regulação das atividades celulares e funcionais) e glicosaminoglicanos e proteoglicanos (que permitem a difusão de hormônios e nutrientes pela matriz extracelular), conforme descrito na TAB. 1 (Mariotti, 1993; Kerrigan, Mansell & Sandy, 2000).

As fibras colágenas gengivais, por sua vez, estruturam a matriz e apresentam *turnover* significativamente maior do que aquele encontrado na pele, porém, não tão rápido como aquele exibido no ligamento periodontal que, dependendo da área, pode ter uma meia-vida variando de 8,4 dias, nas fibras transeptais,

para 25 dias, nas fibras dentogengivais (Mariotti, 1993; Bartold, Wlsh & Narayanan, 2000).

TABELA 1
Composição do tecido gengival sadio

60%	5%	35%			
colágeno	fibroblastos	vasos e nervos	proteínas não colágenas	glicosaminoglicanos	proteoglicanos
I			laminina	sulfato de condroitina	Decorina
III			fibronectina	sulfato dermatam	Versican
IV			osteonectina	sulfato heparan	
V			tenascina	ácido hialurônico	
VI			fibras elásticas		

FONTE – Adaptado de Bartol, Walsh & Narayanan, 2000.

Os diferentes grupos de fibras colágenas que compõem o periodonto servem para ancorar os dentes às estruturas de suporte, propiciar força tênsil e forma ao tecido e dissipar as forças recebidas durante a mastigação (Narayanan, Clagett & Page, 1985).

A integridade estrutural do tecido conjuntivo depende da natureza do seu tipo de colágeno fibrilar (Hammouda et al., 1980), cuja base é composta por subunidades de tripla hélice de polipeptídeos cadeia α , conhecidas como moléculas de colágeno ou tropocolágeno. Os diferentes tipos de colágeno, por sua vez, são produtos genéticos diferentes, resultantes de pequenas variações na estrutura primária das cadeias α (Junqueira & Montes, 1983).

Já as fibras colágenas organizam-se em dois padrões distintos, um composto por feixes largos e densos de fibras grossas e outro por um padrão frouxo de fibras pequenas e finas misturadas com uma fina malha reticular (Fig. 1). O colágeno tipo I organiza-se, preferencialmente, em fibrilas densas com estriações entre 60-70 nm, localizadas na lâmina própria, apesar de não restringir-se especificamente a essa região. É o principal tipo de fibra colágena que compõe o tecido conjuntivo gengival (TAB. 2) (Narayanan, Engel & Page, 1983; Chavrier et al., 1984; Chavrier & Couble, 1989; Bartold, Walsh & Narayanan, 2000).

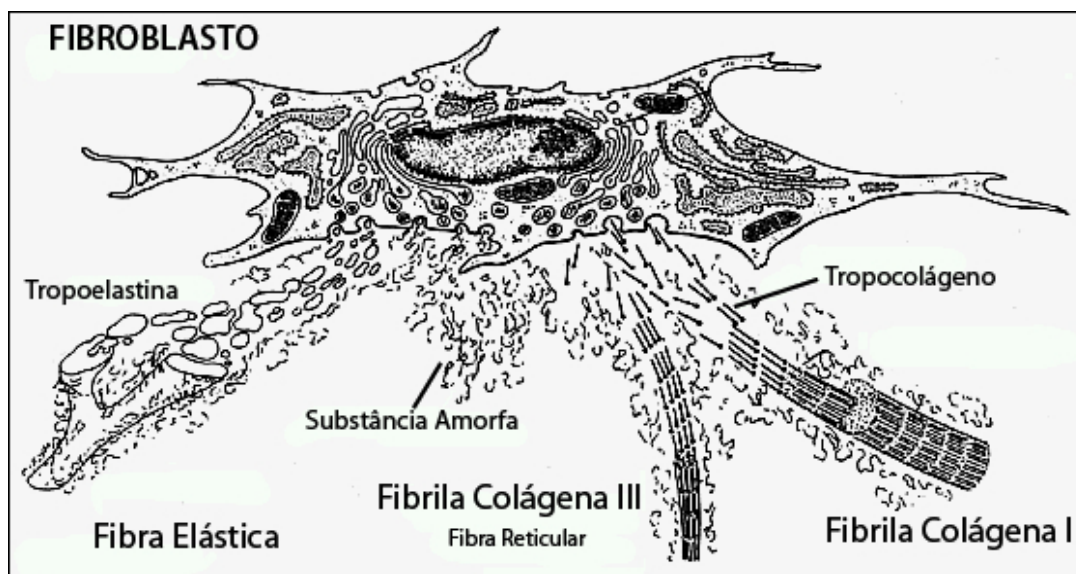


FIGURA 1 – Produção de fibras do tecido conjuntivo pelos fibroblastos.

FONTE – [University of Veterinary Medicine Hannover](http://www.tiho-hannover.de/einricht/anat/lit/mwenth/conntis/ko1_bdgw.htm), 2008.¹

O colágeno tipo III organiza-se, preferencialmente, como fibras mais finas, com estriações de 40 nm, em um padrão reticular próximo à membrana basal no epitélio juncional e em um padrão mais difuso na lâmina própria, e constitui o segundo tipo de colágeno predominante no tecido gengival. Ele predomina no tecido inflamatório e na fase inicial da cicatrização das feridas, enquanto o colágeno tipo I predomina quando a cicatrização está completa (Romanos, Strub & Bernimoulin, 1993; Bartold & Narayanan, 2006). Em função disso, acreditava-se que o colágeno tipo III fosse um tipo jovem de fibra cuja importância estaria ligada à habilidade de remodelação (Chavrier et al., 1984; Chavrier & Couble, 1989) (TAB. 2).

O colágeno tipo IV está presente em um padrão microfibrilar difuso dentro da membrana basal, nas junções do tecido conjuntivo com o epitélio e cemento, nas pregas epiteliais e ao redor de vasos e nervos. O colágeno tipo V tem um padrão filamentososo paralelo e parece cobrir as fibras densas compostas por colágeno tipo I e III, indicando uma possível função de ligação. O colágeno tipo VI foi localizado nas estruturas da membrana basal, mas também no tecido

¹ http://www.tiho-hannover.de/einricht/anat/lit/mwenth/conntis/ko1_bdgw.htm

conjuntivo subepitelial (Narayanan, Engel & Page, 1983; Romanos et al., 1991; Bartold, Walsh & Narayanan, 2000; Bartold & Narayanan, 2006) (TAB. 2).

TABELA 2
As proteínas colágenas gengivais

COLÁGENO	TIPO	DISTRIBUIÇÃO	FUNÇÃO PROPOSTA
I	Fibrilar	Encontrado na maioria dos tecidos conjuntivos (gengiva, ligamento periodontal, cimento, osso, dentina, pele, tendões, etc..)	Propiciar força tênsil
III	Fibrilar	Gengiva, ligamento periodontal, cimento, pele, vasos sanguíneos, predominante nos tecidos fetais	Propiciar força tênsil
IV	formador de folhas	Todas as membranas basais	Interagir com laminina e sulfato heparan (principais componentes estruturais da membrana basal)
V	Fibrilar	Encontrado na maioria dos tecidos intersticiais (pele, vasos, músculos esqueléticos, músculo liso, gengiva e ligamento periodontal)	Conector entre a membrana basal e o estroma, promove a adesão e migração celular
VI	filamentar goticulado	Encontrado na maioria dos tecidos conjuntivos (vasos sanguíneos, pele, útero, fígado, rim, ligamento periodontal e gengiva)	Agrupar a matriz: unir as células ao tecido conjuntivo

FONTE – Mariotti, 1993. p. 41.

Segundo Narayanan, Engel & Page (1983), doenças adquiridas que envolvem o tecido conjuntivo geralmente estão associadas com alterações na quantidade total de colágeno, bem como na proporção dos diferentes tipos de colágeno. Assim, enquanto lesões fibroproliferativas, como aterosclerose, são caracterizadas pelo acúmulo de colágeno, em lesões inflamatórias, como artrite reumatóide, ocorrem prolongadas destruições dessa proteína.

2.2.2 Alterações histológicas do tecido gengival de portadores de doença periodontal

Segundo Page & Schroeder (1976), a evolução da doença periodontal pode ser dividida em quatro fases: lesão inicial, precoce, estabelecida e avançada, sendo que, na lesão avançada, o tecido periodontal irá apresentar sinais de destruição característicos da periodontite, enquanto as demais etapas anteriores representarão uma evolução da gengivite.

A lesão inicial, clinicamente, é vista como gengiva sadia e caracteriza-se pela ausência de sinais clínicos de inflamação, mesmo na presença de alterações histológicas como depleção de colágeno e aumento de estruturas vasculares na área infiltrada. Estão presentes poucos leucócitos, poucas células inflamatórias no tecido conjuntivo e poucos linfócitos, com predomínio de células T sobre as células B (Page & Schroeder, 1990).

A lesão precoce caracteriza-se pela exacerbação das alterações inflamatórias da lesão inicial, gerando, dessa forma, alterações clínicas. Observa-se um aumento dos linfócitos, principalmente dos linfócitos T (LT), alterações citoplasmáticas nos fibroblastos (provavelmente pela interação com os LT), maior perda de colágeno, início da proliferação da camada basal do epitélio juncional e aumento da transmigração de neutrófilos (Page & Schroeder, 1990).

A lesão estabelecida caracteriza-se pela persistência do processo inflamatório agudo, além do aumento de linfócitos B (LB) e plasmócitos e da transmigração de neutrófilos, o que acarreta a perda de continuidade da membrana epitelial, proliferação e migração apical do epitélio juncional (Page & Schroeder, 1990).

A lesão avançada caracteriza-se pela extensão das alterações inflamatórias para o ligamento periodontal e osso alveolar, com perda de fibras colágenas próximas à bolsa periodontal e formação de fibrose à distância da região da injúria. A formação da bolsa periodontal está associada à ulceração do epitélio e aumento do afluxo de neutrófilos que irão liberar collagenases, MMP e metabólitos do ácido arácônico, perpetuando a inflamação e o dano tecidual. Quando a barreira epitelial é restabelecida e um gradiente quimiotático normal é formado, o processo destrutivo diminui. Se a barreira epitelial não for restabelecida, a destruição tecidual continua (Page & Schroeder, 1990).

Percebe-se, portanto, que as alterações vasculares e celulares refletem mudanças quantitativas e qualitativas no tecido conjuntivo, especialmente na gengiva, que constituem características proeminentes na doença periodontal (Chavrier & Couble, 1989).

Tão cedo a placa acumula nas adjacências da margem gengival, um infiltrado inflamatório torna-se aparente nas subjacências do tecido conjuntivo e dentro de 3-4 dias a resposta inflamatória é suficientemente robusta para iniciar a destruição do tecido conjuntivo, com uma perda de mais de 70% do colágeno no foco inflamatório (Bartold & Narayanan, 2006).

O estudo de Séguier, Godeau & Bousse (2000) que avaliou a relação das fibras colágenas com as células inflamatórias no tecido gengival humano saudável e doente constatou que, durante a periodontite, a perda de colágeno foi significativamente associada com a quantidade de todos os subtipos de células inflamatórias avaliadas (*Cluster of differentiation* (CD) 45, CD3, CD8, CD20, CD68, *resting T lymphocytespossesing cytolytic potential* (TIA)1 e moléculas de granzyma B (GrB). Em função desses resultados, sugeriu-se que avaliações quantitativas da fração da área ocupada por fibras colágenas podem refletir a gravidade clínica da DP.

A periodontite crônica também parece prejudicar a formação de cadeias cruzadas do colágeno, cujo desfecho é a formação de sais solúveis (Narayanan & Page, 1983; Hillmann, Dogan & Geurtsen 1998).

Assim, com o desenvolvimento da lesão inflamatória e a destruição tecidual causada principalmente por linfócitos e macrófagos, pode-se observar, além da solubilização das fibras colágenas, uma alteração nas proporções dos tipos de colágeno, com aumento do tipo V e surgimento do tipo I trimer (Rabanus et al., 1991; Romanos, Strub & Bernimoulin, 1993; Hillmann, Dogan & Geurtsen; 1998; Bartold, Walsh & Narayanan, 2000).

O estudo de Narayanan, Engel & Page (1983), que analisou frações de colágeno extraídas de biópsias gengivais humanas e quantificadas por meio do analisador de aminoácido Beckman 120 C, demonstrou que as proporções de colágeno tipo I e III presentes no tecido gengival normal e inflamado não apresentaram diferenças significativas. O mesmo grupo também observou, por imunofluorescência, a presença do colágeno tipo I trimer na gengiva inflamada. O significado desse colágeno ainda não foi totalmente compreendido; entretanto, como ele é considerado como um produto predominante em células embrionárias, é mais provável que ele seja produzido por uma pequena quantidade de células residentes na gengiva doente do que represente um colágeno anormal produzido por células animais (Narayanan & Page, 1983, Narayanan, Clagett, Page, 1985).

Em um trabalho de 1983, que compila os resultados de diversos estudos realizados por seu grupo, Narayanan, Engel & Page relatam que o colágeno tipo I apresenta pequena alteração, com uma redução de 4%, e o tipo III, uma redução de 50%. Entretanto, o colágeno tipo V, que contribui com cerca de 0,1 a 1,3% de todo o colágeno gengival, apresentou um aumento de 2 a 9 vezes no tecido com inflamação crônica, ou seja, mais de 700% (TAB. 3). (Narayanan, Engel & Page 1983; Mariotti, 1993).

Apesar das alterações patológicas que envolvem o colágeno tipo V parecerem insignificantes devido a sua presença em pequenas quantidades no tecido gengival, sua localização específica pode tornar essas alterações de extrema relevância (Narayanan, Engel & Page, 1983).

TABELA 3
Proporção dos tipos de colágeno no tecido gengival

Tipo de colágeno	Tecido normal (%)	Tecido inflamado (%)
I	91	87
III	8	4
V	<1	8
Tipo I trimer	Não detectável	2

FONTE - Narayanan & Page, 1983. p. 41.

Dentro desse contexto, discute-se que qualquer alteração nesse colágeno poderia influenciar o acesso de enzimas degradativas aos outros colágenos, já que ele apresenta um importante papel na ligação das fibras colágenas às estruturas associadas (Narayanan, Engel & Page, 1983).

Além disso, especula-se que esse aumento do colágeno tipo V deve-se a sua maior resistência a digestão pelas colagenases, ao fato de estar associado à proliferação vascular que ocorre no tecido inflamado (Mariotti, 1993) e à modulação da síntese de colágeno (Narayanan & Page, 1985).

Por outro lado, as alterações do colágeno tipo I e III foram explicadas pelo estudo de Chavrier & Couble (1989), que, por meio de imuno-marcação ultra-estrutural, verificaram que o padrão de organização dos feixes densos e largos do colágeno tipo I oferecia melhor resistência à destruição aguda do que o padrão de organização do colágeno tipo III, composto por fibras finas.

Estudos imunoistoquímicos recentes confirmam que o tecido gengival inflamado consiste principalmente em colágeno tipo V e VI nas áreas com

infiltrado inflamatório, já que nessas áreas os colágenos tipo I e III foram quase completamente eliminados (Hillmann et al., 2001).

Além das alterações no colágeno, observa-se, em menor escala, alterações nas substâncias não-colágenas, como a degradação das proteínas do núcleo das proteoglicanas (deixando as cadeias de proteoglicanas intactas) e do ácido hialurônico, diminuição na quantidade sulfato dermatan e aumento do sulfato de condroitina (Bartold, Walsh & Narayanan, 2000).

Enquanto, por um lado, o tecido gengival pode ser afetado por alterações inflamatórias predominantemente destrutivas características da periodontite, a hiperplasia gengival, caracterizada pelo acúmulo de fibras colágenas, constitui o outro extremo das alterações histológicas que acometem o periodonto.

Narayanan & Hassell (1985), ao compararem a quantidade e composição de colágeno da gengiva hiperplásica associada ao uso de fenitoína com o tecido gengival normal e inflamado, verificaram que a quantidade de colágeno na gengiva hiperplásica era muito maior e a proporção de colágeno tipo I era menor, enquanto a proporção de colágeno tipo III era maior. Entretanto, a proporção de colágeno tipo V não diferiu entre os três tipos de gengiva analisados.

É interessante observar que, apesar de haver pequenas diferenças no que se refere à hiperplasia causada por diferentes drogas, a heterogeneidade dos tipos de colágeno na matriz permite a diferenciação entre o tecido saudável, inflamado e hiperplásico por meio de técnicas de imunistoquímica (Romanos, Strub & Bernimoulin, 1993).

Esse mesmo grupo verificou, ainda, que, na hiperplasia induzida por nifedipina, os colágenos tipo I e III apresentaram distribuição difusa no conjuntivo, enquanto o colágeno IV foi localizado na membrana basal e próximo aos vasos e nervos (Romanos et al., 1993).

No mesmo ano, Becker, Schuppan & Miller observaram, por imunistoquímica, que o padrão característico de diferenciação e ordenação de proteínas da

matriz extracelular da mucosa normal também foi verificado em indivíduos com hiperplasia fibrosa localizada, causada por inflamação ou irritação crônica.

Em 2005, Gagliano et al. descreveram a distribuição de colágeno em um paciente com fibromatose gengival idiopática. Por meio do método picrossírius, eles observaram que a quantidade de colágeno intersticial era 29% maior do que nos controles. Os fibroblastos gengivais do paciente apresentaram maior expressão gênica de colágeno tipo I, MMP-1 e lisil hidroxilase 2b e não apresentaram alteração dos níveis protéicos de colágeno tipo I no sobrenadante. Sugeriu-se, portanto, que, nesse caso, o acúmulo de colágeno no tecido conjuntivo gengival não estava relacionado com o aumento da síntese ou diminuição da degradação de colágeno.

Sakagami et al. (2006) estudaram o efeito da nifedipina e interleucina (IL)-1 α na expressão de colágeno, MMP-1 e TIMP-1 em fibroblastos gengivais humanos em cultura. Eles observaram que, apesar da expressão de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) não ter apresentado mudanças significativas, tanto a expressão de RNAm quanto a produção proteica de MMP-1 foram reguladas positivamente pela IL-1 α , seja sozinha ou combinada com nifedipina. Já a TIMP-1 foi positivamente regulada pela nifedipina sozinha ou combinada com IL-1 α . A proporção de MMP-1 em relação a TIMP-1 não mudou pela exposição a nifedipina sozinha, mas foi aumentada pela exposição à IL-1 α sozinha ou combinada com nifedipina. É interessante observar, entretanto, que, em duas das quatro linhagens celulares testadas, a nifedipina reduziu a proporção de MMP-1 em relação à TIMP-1, indicando que a nifedipina pode predispor a fibrose em alguns indivíduos nos quais os níveis de IL-1 encontram-se elevados.

Em 1993, Mariotti afirmou que o significado das alterações no colágeno, proteínas não-colágenas e proteoglicanas, durante o processo inflamatório característico da DP, ainda não havia sido completamente esclarecido. Parte da redução das proteínas devia-se a natureza destrutiva do processo inflamatório, mas a redução seletiva de determinados tipos de colágeno era um evento a ser esclarecido. Mais intrigante, ainda, é a presença de uma doença

imuno-inflamatória com padrão de destruição óssea, perda de inserção e evolução clínica mais grave, porém, sem sinais evidentes de inflamação e aspecto clínico de fibrose gengival. Esse padrão típico da doença periodontal em fumantes tem sido alvo de diversos estudos que procuram compreender como essa exposição ao tabaco e seus metabólitos afeta a resposta do hospedeiro.

2.3 O Tabagismo

Segundo dados da OMS de 2008, numa amostra de 170.406 milhões de brasileiros, 33,8% dos adultos foram identificados como fumantes e consumiram, individualmente, em média, 858 cigarros por ano. Esses dados tornam-se alarmantes quando consideramos que o cigarro é responsável por 90% dos casos de câncer de pulmão, 75% dos casos de bronquite crônica e enfisema e 25% dos casos de doença coronariana isquêmica. Além disso, estima-se que, no século 21, um bilhão de óbitos serão atribuídos ao cigarro (OMS, 2008).

Na fumaça do cigarro, já se isolaram 4.720 substâncias tóxicas, as quais atuam sobre os mais diversos sistemas e órgãos e contêm mais de 60 cancerígenos, sendo as principais: **nicotina**, causadora do vício e cancerígena; **benzopireno**, que facilita a combustão existente no papel que envolve o fumo; **nitrosaminas**; **substâncias radioativas**, como o polônio 210 e o carbono 14; **agrotóxicos**, entre os quais o DDT; **solventes**, como o benzeno; **metais pesados**, como chumbo e cádmio que, em concentrações de 1 a 2 mg, podem levar à perda de capacidade ventilatória dos pulmões, além de causar dispnéia, enfisema, fibrose pulmonar, e serem altamente cancerígenos; **níquel e arsênico**, que se armazenam no fígado, rins, coração, pulmões, ossos e dentes e podem resultar em gangrena dos pés e causar danos ao miocárdio, entre outros; **monóxido de carbono**, gás que, por ter mais afinidade com a hemoglobina do sangue do que o próprio oxigênio, é capaz de deslocar o oxigênio, deixando o corpo do fumante, ativo ou passivo, com baixa capacidade de oxigenação; e **formol**, agente fixador de células (Vestígios, 2008).

Cada um desses componentes pode ter diferentes efeitos na resposta do hospedeiro e, em alguns casos, os componentes do cigarro podem apresentar tanto efeitos destrutivos quanto efeitos protetores nos tecidos periodontais (Ryder, 2007).

2.3.1 Papel do tabagismo na doença periodontal

No início da década de 40, Pindborg observou que a gengivite úlcero-necrosante aguda estava relacionada com o fumo nos marinheiros dinamarqueses. Entretanto, para outras formas de DP, acreditou-se, por muitos anos, que os fumantes tinham mais doença periodontal, provavelmente em função dos diferentes níveis de placa e cálculo (Johnson & Slach, 2001).

A partir de 1951, quando Herulf realizou exames radiológicos do osso alveolar de jovens fumantes, um grande número de estudos começou a demonstrar o papel definido do fumo no desenvolvimento da doença periodontal (Machuca et al., 2000).

Assim, no início dos anos 80, vários estudos epidemiológicos com controle para fatores de confusão, como idade, placa, cálculo, gênero e nível socioeconômico forneceram fortes evidências de que o fumo seria um fator de risco para a doença periodontal (Johnson & Slach, 2001).

Na década de 90, o fumo já havia sido determinado como um fator de risco inequívoco para doença periodontal, sendo demonstrado que os fumantes pesados possuíam maior risco de perda de inserção ($OR = 4,27$) e perda óssea ($OR = 7,28$) do que fumantes moderados ($OR = 3,21$ e $5,23$, respectivamente) e fumantes leves ($OR = 2,05$ e $3,25$, respectivamente) (Grossi et al., 1994; Grossi et al., 1995).

Em um estudo baseado em dados do III NHANES dos Estados Unidos, calculou-se que 41,9% dos casos de periodontite (6,4 milhões de casos) na população adulta foram atribuídos aos fumantes e 10,9% (1,7 milhões de

casos) aos ex-fumantes. O mesmo estudo estima que mais da metade dos casos de periodontite afetando adultos está associado ao hábito de fumar, com risco relativo para os fumantes de 3,97 e para ex-fumantes de 1,68. Entre os fumantes, o risco para o desenvolvimento de periodontite aumentou com o número de cigarros fumados por dia: de um $OR = 2,79$ para até nove cigarros fumados por dia para um $OR = 5,88$ para mais de 31 cigarros fumados por dia. Ao abandonar o hábito, o OR passou a ser 3,22 para os primeiros 2 anos, diminuindo para 1,15 após 11 anos (Tomar & Asma, 2000).

Susin et al. (2004) verificaram, na população de Porto Alegre, por meio de análise multivariada, que os fumantes pesados (mais de 20 maços por ano) e moderados (entre 7,5 e 20 maços por ano) possuíam um risco significativamente aumentado para perda de inserção clínica maior do que 5 mm nos fumantes ($OR = 3,6$ e $2,0$ respectivamente) após ajuste para diversas covariáveis.

Com um enfoque voltado para a exposição ambiental auto-relatada ao fumo, o estudo de Arbes et al. (2001) demonstrou que a chance ajustada para doença periodontal é 1,6 vez maior para pessoas expostas ao fumo passivo do que para pessoas não expostas. E, recentemente, Nishida et al. (2006) constataram que os fumantes passivos (com níveis salivares de cotinina entre 1 e 7 ng/ml) apresentaram níveis elevados de marcadores salivares relacionados com a periodontite, como interleucina-1 β (IL-1 β).

Os estudos clínicos e epidemiológicos que confirmaram o papel do fumo como fator de risco verdadeiro para doença periodontal demonstraram que os fumantes apresentam, com relação aos não fumantes (Bergström, 2004):

- um alto risco de desenvolverem mais perda de inserção periodontal (Amarasena et al., 2002; Bergström, 2003);
- maior número de bolsas periodontais profundas e uma profundidade de sondagem média maior (Calsina, Ramón & Echeverría, 2002);

- perda óssea (PO) alveolar mais extensa e grave (Krall, Garvey & Garcia, 1999; Bergström, 2004; César-Neto et al., 2004);
- menos dentes, uma maior prevalência de edentulismo e uma maior incidência de perda dental (Krall, Garvey & Garcia, 1999; Albandar et al., 2000);
- o envolvimento de furca nos molares é também mais freqüente nos fumantes do que nos não fumantes (Mullally & Linden, 1996; Bosco et al., 2007);
- mais perda de inserção, incluindo mais recessão gengival (Machuca et al., 2000; Calsina, Ramón & Echeverría, 2002; Susin et al., 2004);
- resposta ao tratamento periodontal cirúrgico ou não cirúrgico comprometida (Labriola, Needleman & Moles, 2005; Heasman et al., 2006) assim como interferência no processo cicatricial (Grossi et al., 1997).

As evidências na literatura não são conclusivas sobre o efeito do fumo na microflora. Enquanto vários estudos sugerem que os tipos de bactérias presentes em fumantes e não fumantes não variam significativamente (Preber, Bergström & Linder, 1992; Stoltenberg et al., 1993; Lie et al., 1998), dados de outros estudos, como aquele realizado em Erie County, mostraram que os fumantes tinham uma probabilidade 3,1 vezes maior de exibir infecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e 2,3 mais chance de apresentar infecção por *Tanarella forsythia* do que não fumantes. Uma explicação para esses achados seria o fato de que esses patógenos seriam mais dificilmente eliminados em fumantes (Zambon et al., 1996).

Haffajee & Socransky (2001), que examinaram, por meio de *checkerboard*, a microbiota subgengival de 124 não fumantes, 98 ex-fumantes e 50 fumantes, não encontraram diferenças significativas entre os níveis e proporções das 29 espécies bacterianas testadas. Entretanto, a prevalência (% de sítios colonizados) de espécies do complexo laranja (*E. nodatum*, *F. nucleatum* ss, *P. intermedia*, *P. micros*, e *P. nigrescens*), bem como espécies do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*) foi significativamente maior em fumantes, comparado com não fumantes e ex-fumantes. As diferenças de

prevalência entre as espécies foi marcante nas bolsas $\leq 4\text{mm}$, enquanto nas bolsas $> 4\text{mm}$ não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas. Eles concluíram que a maior colonização por patógenos periodontais nos fumantes, comparado com não fumantes, pode contribuir, em parte, para a dificuldade de sucesso da terapia periodontal desses indivíduos.

Os fumantes com doença periodontal também apresentam sinais reduzidos de inflamação clínica, menos vermelhidão gengival e sangramento a sondagem quando comparado com não-fumantes (Calsina, Ramón & Echeverría, 2002).

Rivera-Hidalgo (2000) verificou que, mesmo apresentando um índice de placa significativamente maior, o número médio de sítios sangrantes nos fumantes (27%) é significativamente menor do que nos não-fumantes (40%), indicando uma reação vascular 50% menor do que nesses últimos.

Corroborando esses achados, Müller, Stadermann & Heinecke (2002) observaram que, apesar de os fumantes possuírem níveis de placa supragengival significativamente mais elevados do que os não-fumantes, sangramento a sondagem e cálculo foram mais prevalentes em não-fumantes. Uma análise por sítio demonstrou que os fumantes tendem a apresentar uma associação mais fraca entre placa supragengival e sangramento a sondagem do que os não-fumantes ($OR= 1,91 \times 2,89$, $p= 0,07$), o que tem um significado importante na elaboração de estratégias para prevenção de gengivite.

A hipótese para tal situação clínica, aparentemente contraditória, baseava-se na capacidade da nicotina provocar uma vasoconstrição local, reduzindo o fluxo sanguíneo. Contudo, os resultados das pesquisas não são conclusivos e sugerem que o fumo tem efeitos crônicos em longo prazo que vão muito além de um simples efeito vasoconstritor após um episódio de fumo. Assim, enquanto alguns estudos afirmam que o tabagismo não afeta a densidade da superfície vascular, o número de vasos por mm^2 ou a distribuição de fibronectina na camada subepitelial do tecido conjuntivo gengival (Mirbod, Ahing & Pruthi, 2001; Sönmez et al., 2003), outros constatam que o efeito supressor na vascularização gengival dos sítios inflamados dos fumantes pode

ser observado pela densidade vascular e angiogênese diminuídas, dificultando, dessa forma, a resposta inflamatória e a cicatrização (Palmer et al. 2005; Kinane, Peterson & Stathopoulou, 2006).

Outra alteração tecidual verificada foi o espessamento da base epitelial nos fumantes ($p < 0,05$), independente do estado de saúde gengival (Villar & Lima, 2003). Essa proliferação indica uma tentativa do organismo em promover uma barreira mecânica capaz de reduzir, mas não eliminar completamente, o efeito deletério da nicotina sobre os fibroblastos gengivais (Giannopoulou, Roehrch & Mombelli, 2001).

Poderia parecer lógico se esperar que os fatores associados com a destruição tecidual estivessem mais elevados nos fumantes do que nos não-fumantes. Entretanto, enquanto alguns estudos que envolvem a avaliação desses fatores no fluido gengival crevicular (FGC) verificam baixos níveis de citocinas, enzimas e possivelmente polimorfonucleares (PMN) nos fumantes, outros estudos verificaram níveis mais altos ou não encontraram diferenças estatisticamente significativas (Boström, Linder & Bergström, 1999; Giannopoulou, Kamma & Mombelli, 2003; Palmer et al., 2005).

Apesar de o fumo induzir uma significativa neutrofilia sistêmica, ele não parece afetar o número de neutrófilos entrando no sulco gengival e na cavidade bucal. De fato, evidências limitadas sugerem que o número de neutrófilos alcançando o sulco gengival em fumantes pode estar até mesmo reduzido (Pauletto et al., 2000). Alguns estudos, inclusive, detectaram efeitos do tabaco na migração dos neutrófilos bucais, indicando uma possível diminuição na capacidade migratória (Kraal et al., 1977). E, posteriormente, foi demonstrado que a exposição ao tabaco pode dificultar a cinética da f-actina. O esqueleto de actina é crítico na facilitação da motilidade dos neutrófilos que é requerida para o extravasamento através da microcirculação e subsequente migração através do tecido inflamado (Ryder et al., 2002).

O estudo de Güntsch et al. (2006) que avaliou o efeito do tabagismo na função dos neutrófilos creviculares de indivíduos saudáveis constatou efeitos adversos

sobre a viabilidade e função dessas células. Comparando com os não-fumantes ($1,73 \pm 1,08 \times 10^6/ \text{ mL}$), o número de neutrófilos foi maior em fumantes leves ($1,98 \pm 0,96 \times 10^6/ \text{ mL}$) e moderados ($2,03 \pm 1,43 \times 10^6/ \text{ mL}$) e menor nos fumantes pesados ($1,68 \pm 1,18 \times 10^6/ \text{ mL}$) apesar de não haver diferenças estatísticas entre os grupos ($p > 0,005$). A porcentagem de neutrófilos viáveis foi significativamente mais baixa em fumantes leves ($77,6 \pm 7,8\%$), moderados ($76,5 \pm 8,2\%$) e pesados ($75 \pm 6,5\%$) comparada com não-fumantes ($85,5 \pm 6\%$) com um valor de $p < 0,05$. Além disto, a capacidade de fagocitose foi significativamente prejudicada nos fumantes leves ($58,3 \pm 4,1\%$), moderados ($51,9 \pm 2,33\%$) e pesados ($40,9 \pm 3,5\%$) quando comparado com não-fumantes ($74,1 \pm 4,1\%$), com uma evidência de efeito dose-dependente ($p < 0,05$).

Gamal & Bayony (2002) verificaram, ainda, em estudo *in vitro*, que o fumo compromete a adesão de células do ligamento periodontal às raízes alisadas, o que poderia afetar o processo de cicatrização. Uma das hipóteses especuladas é de que a depleção de tiol pode ser o mecanismo de citotoxicidade da nicotina aos fibroblastos do ligamento periodontal (Chang et al., 2002).

Da mesma forma, Cattaneo et al. (2000) verificaram que acroleína e acetaldeído, componentes voláteis da fumaça do cigarro, inibem a adesão e proliferação de fibroblastos gengivais humanos em cultura de maneira dose-dependente e reversível (3 dias após a remoção dessas substâncias do meio seu efeito citotóxico foi revertido).

O estudo *in vitro* de Checchi et al. (1999) demonstrou evidências de que, nos fumantes, os fibroblastos gengivais seriam menos susceptíveis aos efeitos citotóxicos de altos níveis de nicotina ($600 \mu\text{g/ml}$) provavelmente devido ao desenvolvimento de tolerância. Da mesma forma, Zhou & Windsor (2006) e Zhou, Olson & Windsor (2007) verificaram que fibroblastos gengivais humanos em cultura com nicotina (150 e $250 \mu\text{g/ml}$) foram capazes de clivar mais colágeno e esse efeito foi potencializado pela adição de *P. gingivalis* à cultura que induz um aumento na ativação de MMP e uma diminuição nos níveis protéicos de TIMP-1, bem como uma interferência na expressão de RNAm de

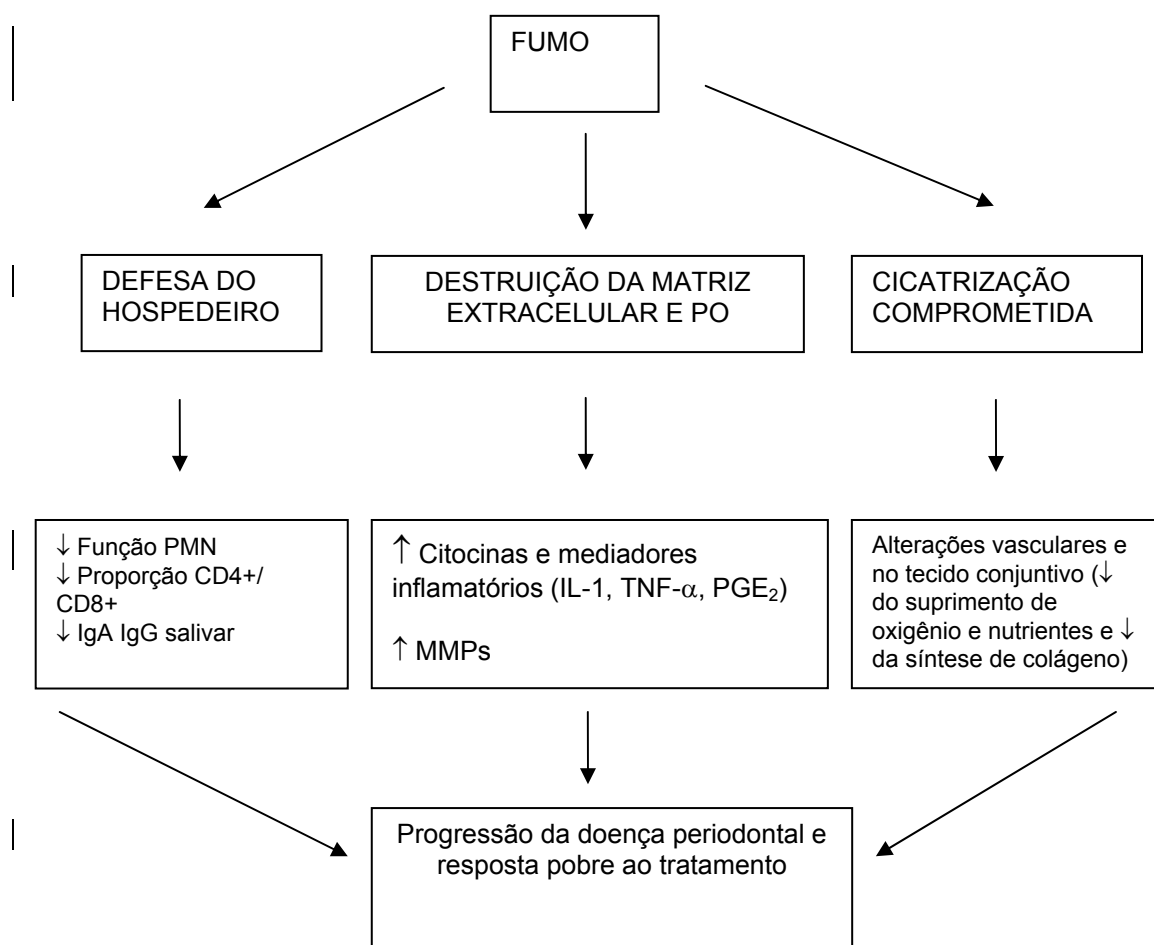
diversas TIMP`s e MMP`s. Entretanto, níveis elevados de nicotina (500 µg/ml) diminuíram a degradação de colágeno pelos fibroblastos em cultura devido à morte celular.

Snyder et al. (2002) verificaram que a nicotina pode afetar, também, a síntese protéica e a modulação da expressão de β_1 integrina dos fibroblastos em cultura. Após 17 horas de exposição à nicotina a 0,4 e 0,8µM, verificou-se, respectivamente, um aumento e uma diminuição dose-dependentes de β_1 integrina no lisado total da célula e nas frações correspondentes à membrana enriquecida, indicando que as moléculas de β_1 integrina são produzidas, mas não são adequadamente transferidas para a membrana. Observou-se, ainda, através de SDS-PAGE e *Western blotting*, uma diminuição estatisticamente significativa das proteínas radiomarcadas em cultura, sugerindo que o tabaco dificulta a capacidade de adesão e comunicação dos fibroblastos entre si e com a matriz extra-celular, o que poderia afetar o processo de cicatrização ou exacerbar a DP.

Outra alteração importante foi verificada por Tripton & Dabous (1995), que descreveram uma inibição significativa da proliferação dos fibroblastos, bem como uma redução da produção de colágeno tipo I e fibronectina e aumento da atividade da collagenase em meio de cultura.

Diante do exposto, as complexas interações entre o fumo e as alterações histológicas e inflamatórias da DP estão brevemente descritas na FIG. 2.

Além dessas alterações no periodonto, já foi demonstrado que, na pele, o fumo diminui a taxa de síntese de colágeno tipo I e III pelo aumento da produção de enzima degradadora de colágeno (MMP-8) e diminuição dos níveis de inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz-1 (TIMP-1)(Knuutien et al., 2002). Portanto, uma análise detalhada dessa família de moléculas e seu papel no *turnover* do colágeno gengival nos fumantes é de extrema importância para a compreensão da característica fibrosa do periodonto desses indivíduos.



CD4+ - cluster of differentiation 4

CD8+ - cluster of differentiation 8

IgA - Imunoglobulina A

IgG - Imunoglobulina G

IL-1 - Interleucina 1

MMP - Metaloproteinase da matriz

PGE₂ - Prostaglandina E₂

PMN - Polimorfonucleares

PO - Perda óssea

TNF α - fator de necrose tumoral

FIGURA 2 – Efeitos do fumo nos processos imunes e inflamatórios da doença periodontal.

FONTE - Sham et al., 2003. p.273.

2.4 As metaloproteinases da matriz e seus inibidores

2.4.1 As MMP's

A degradação da matriz extracelular pode envolver, aparentemente, quatro caminhos distintos: a fagocitose, que cliva os fragmentos grandes de matriz por meio de proteinases lisossomais, a atividade osteoclástica, que consiste na degradação da matriz mineralizada por proteinases lisossomais em um complexo processo extra e pericelular, as reações de clivagem plasminogênio dependentes e as reações MMP- dependentes (Birkedal-Hansen, 1993).

As MMP's, enzimas que guardam extensa homologia na seqüência, mas diferem em termos de especificidade ao substrato e regulação transcricional, são endopeptidases cálcio e zinco-dependentes, que funcionam em pH neutro e coletivamente são capazes de degradar a maioria, se não todas, as moléculas da matriz extracelular (Birkedal-Hansen et al., 1993).

Elas desempenham um importante papel na remodelação do tecido conjuntivo durante o desenvolvimento, homeostase e cicatrização (Lauer-Fields, Juska & Fields, 2002), e um desequilíbrio entre as MMPs ativadas e seus inibidores endógenos derivados do hospedeiro levam ao colapso patológico da matriz extracelular durante a doença periodontal. Especificamente, essas enzimas são responsáveis pela degradação das fibras colágenas inseridas na raiz, permitindo a migração apical e a extensão lateral do epitélio da bolsa. A seqüela clínica do aumento patológico da destruição do colágeno é a perda de inserção e formação da bolsa periodontal (Ryan & Golub, 2000).

Existem pelo menos 25 membros da família das metaloproteinases humanas categorizados de acordo com a estrutura do domínio e a preferência por substratos macromoleculares (TAB. 4) (Henney et al., 2000).

TABELA 4

A família das metaloproteinasas humanas (continua)

SUBGRUPO	NOME	NÚMERO	SUBSTRATO
Colagenase	Colagenase intersticial (colagenase do fibroblasto)	MMP-1	Colágeno I, II, III, VII, VIII, X, gelatina, aggrecan, versican, PLP, caseína, α_1 PI, α_2 M, ovostatina, nidogen, mielina, proteínas de base, pro-TNF α , L-selectina, MMP-2, MMP-9
	Colagenase do neutrófilo	MMP-8	Colágeno I, II, III, V, VII, VIII, X, gelatina, aggrecan, α_1 PI, α_2 AP, fibronectina
	Colagenase 3	MMP-13	Colágeno I, II, III, IV, gelatina, aggrecan, perlecan, tenascina, PAI-2
Gelatinase	Gelatinase A (Colagenase tipo IV)	MMP-2	Gelatina, colágeno I, IV, V, VII, X, XI, XIV, elastina, fibronectina, aggrecan, versican, PLP, proteína base da mielina, pro-TNF α , α_1 PI, MMP-13, MMP-9, β -amilóide
	Gelatinase B	MMP-9	Gelatina, colágeno IV, V, VII, X, XIV, elastina, aggrecan, versican, PLP, fibronectina, nidogen, proteína base da mielina, pro-TNF α , α_1 PI
Stromelísina	Stromelísina 1	MMP-3	Colágeno III, IV, IX, X, fibronectina, gelatina, aggrecan, versican, laminina, elastina, perlecan, caseína, α_1 PI, α_2 M, ovostatina, proteínas de base da mielina, pro-TNF α , MMP-1, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-13
	Stromelísina 2	MMP-10	Colágeno III, IV, V, gelatina, aggrecan, elastina, caseína, fibronectina, PLP, MMP-

		1, MMP-8	
	Stromelisina 3	MMP-11	α_1P
		MMP-19	-
Tipo membrana	MT- MMP-1	MMP-14	Colágeno I, II, III, gelatina, elastina, fibronectina, agrecan, vitronectina, caseína, pro-TNF α , MMP-2, MMP-13, laminina cadeia B, sulfato dermatan, proteoglicana
	MT- MMP-2	MMP-15	MMP-2, gelatina, tenascina, laminina, fibronectina, nidogen
	MT- MMP-3	MMP-16	MMP-2
	MT- MMP-4	MMP- 17	-
Sem classificação	Matrilisina (PUMP-1)	MMP-7	Colágeno V, X gelatina, elastina, aggrecan, versican, PLP, fibronectina, laminian, caseína, transferrina, α_1PI , proteínas de base mielina, pro-TNF α , MMP-1, MMP-2, MMP-9, entactina
	Metaloelastase do macrófago	MMP-12	Colágeno IV, gelatina, elastina, aggrecan, PLP, fibronectina, vitronectina, laminina, proteínas de base mielina, pro-TNF α ,

PLP - proteína de ligação proteoglicana

α_2M - α_2 macroglobulina

α_1PI - α_1 inibidor de proteinase

TNF α – fator de necrose tumoral - α ,

MT - transmembrana

PAI – inibidor do ativador de plaminogênio

α_2AP - α_2 antiplasmina

FONTE - Henney et al., 2000. p. 30.

A maioria dessas MMP's contém um peptídeo sinal, um domínio propeptídeo, um domínio catalítico e um domínio C-terminal hemopexin/vitronectin-semelhante (FIG.3). Algumas MMPs apresentam, ainda, domínios adicionais, como domínio transmembrana ou citoplasmático (Lauer-Fields, Juska & Fields, 2002, Sorsa et al., 2006).



FIGURA 3 – Esquema da estrutura das MMP's.

FONTE – Sigma-Aldrich, 2008.²

Cada um dos principais tipos celulares do tecido periodontal de humanos é capaz de expressar um grupo de MMP quando devidamente estimulados (TAB. 5). Além disso, diferentes tipos celulares expressam diferentes grupos de MMP e diferentes citocinas geram diferentes efeitos transcricionais na mesma célula. Entretanto, diferentes tipos celulares não necessariamente responderão da mesma maneira a uma determinada citocina. Em função disso e das várias interações sinérgicas e antagônicas que existem entre duas ou mais citocinas, parece que diferentes infiltrados inflamatórios podem variar consideravelmente no que se refere ao potencial destrutivo. Esse fato pode ser a chave para entender porque a inflamação gengival pode ou não evoluir para a destruição tecidual e perda de inserção (Birkedal-Hansen, 1993).

TABELA 5

Expressão de Metaloproteinase pelos 5 principais grupos celulares

CÉLULA	ENZIMA EXPRESSA	ATIVACÃO TRANSCRICIONAL	MOBILIZAÇÃO DA ENZIMA	TEMPO DE RESPOSTA	DURAÇÃO DA RESPOSTA
LEUCÓCITO	MMP-8, MMP-9	?	Grânulos de liberação	Segundos	minutos
FIBROBLASTO	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-11	IL-1, TNF α , TGF- α , EGF, PDGF, TPA	Ativação transcricional	6 a 12 hs	Dias
CERATINÓCITO	MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-10	TNF α , TGF- α , TGF- β , EGF, TPA	Ativação transcricional	6 a 12 hs	Dias
MACRÓFAGO	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9	TPA	Ativação transcricional	6 a 12 hs	Dias
CÉLULA ENDOTELIAL	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9	TPA	Ativação transcricional	6 a 12 hs	Dias

EGF – Fator de crescimento endotelial

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaqueta

IL-1 – Interleucina -1

TGF- α – fator de crescimento transformador - α

TGF- β – fator de crescimento transformador β

TNF- α – Fator de crescimento

FONTE – Birkedal-Hansen, 1993. p. 478.

Atenção especial deve ser dada ao TGF- β , que, na maioria das células, regula negativamente a indução da síntese de MMP's e, positivamente, a indução da síntese de TIMP's (Reynolds, Hembry & Meikle, 1994), e a IL-1 β , que é, provavelmente, o mais potente indutor da expressão de MMP-1 e MMP-3 pelos fibroblastos, apesar de células originadas de vários tecidos não

necessariamente responderem de forma similar ao meio e às citocinas (Séguier et al., 2000).

A proximidade de placa microbiana viável, também, cria uma oportunidade inigualável para o efeito transcricional direto dos metabólitos microbianos nas células gengivais e periodontais (Birkedal-Hansen, 1993).

Zhou & Windsor (2006), em um estudo com fibroblastos em cultura, verificaram que a *P. gingivalis* aumentou a capacidade de degradação de colágeno dos fibroblastos gengivais humanos, por aumentar a ativação de MMP, diminuir os níveis de TIMP-1 e afetar a expressão de RNAm de várias MMP's e TIMP's.

É importante destacar que a expressão das MMP's pode ser, também, induzida ou inibida por seus próprios substratos. Por exemplo, enquanto o colágeno tipo I intacto pode agir como um ligante que estimula a expressão de MMP-1, o colágeno tipo I ligante degradado pode inativar a expressão dessa colagenase (Lauer-Fields, Juska & Fields, 2002).

Apesar da diversidade e importância das MMP's já descritas, resultados de análises imunoquímicas que usaram anticorpos específicos para MMP-8, MMP-1 e MMP-3 são consistentes com os resultados de estudos enzimológicos prévios, que demonstraram que a MMP-8, ou colagenase 2, é a principal colagenase intersticial no fluido gengival crevicular de indivíduos com periodontite do adulto e fluido sulcular perimplantar de indivíduos com perimplantite, respondendo por 90-95% da atividade colagenolítica (Sorsa et al., 1999).

A MMP-8 é encontrada, ainda, em várias doenças inflamatórias, como bronquite, asma e artrite e, recentemente, tem sido demonstrado exercer uma inesperada atividade antiinflamatória defensiva e protetora contra o espalhamento de câncer de pele experimental e doença inflamatória pulmonar, provavelmente por processar citocinas antiinflamatórias e quimiocinas, bem como regular a apoptose de células inflamatórias e a resposta imune (Lauer-

Fields, Juska & Fields, 2002; Balbin et al., 2003; Owen et al., 2004; Gueders et al., 2005).

Até 1993, acreditava-se que o gene da MMP-8 era expresso apenas por neutrófilos. Entretanto, trabalhos posteriores mostraram que essa MMP é, também, expressa por células mesenquimais, como os fibroblastos e células endoteliais (Ryan e Golub, 2000), além de células epiteliais/ ceratinócitos, odontoblastos, células orais cancerígenas, monócitos/ macrófagos e células plasmáticas (Lauer-Fields, Juska & Fields, 2002).

A MMP-8 é extremamente homóloga à MMP-1. Entretanto, diferem em termos de regulação transcricional: enquanto a maior parte da MMP-8 é rapidamente liberada de grânulos específicos de armazenamento de neutrófilos estimulados e a resposta mantida pelo recrutamento contínuo de novas células, a MMP-1 é produzida apenas a partir da demanda pelo início de sua transcrição. Esse processo faz com que a enzima seja detectada no ambiente extracelular apenas cerca de 6 a 12 horas após o estímulo (Birkedal-Hansen, 1993).

Observa-se, também, que as diferenças com relação às taxas de hidrólise de colágeno entre as diferentes MMP's realça a capacidade da MMP-8, que é cataliticamente mais eficiente em degradar o colágeno gengival quando comparada com a MMP-1 (Sorsa et al., 1999).

As MMP's predominantemente presentes no tecido gengival inflamado, fluido gengival crevicular, amostras de saliva/ enxaguatórios, bem como fluido sulcular dental e periimplantar, são MMP-8 e MMP-9 induzidas, derivadas de neutrófilo e MMP-13, derivada de células ósseas ou epiteliais. O nível e o grau de ativação dessas enzimas parecem aumentar com o aumento da atividade e gravidade da doença periodontal e diminuir em seguida ao tratamento (raspagem e alisamento radicular) (Lauer-Fields, Juska & Fields, 2002).

Uma característica significativa das MMP's é que elas são secretadas em proformas latentes, cuja ativação peri ou extra-celular é realizada pelas próprias MMP's ou por outras moléculas como a plasmina *in vivo* (Reynolds,

Hembry & Meikle, 1994; Séguier et al., 2000) ou *in vitro*, por meio de produtos químicos como tiol, glutationa oxidiazida, agentes caotrópicos e oxigênios reativos ou tratamento com calor e baixo pH (Visse & Nagase, 2003).

Sabendo que já foi estabelecida uma relação entre as formas latente e ativa de MMP's extraídas do tecido gengival humano e o grau de inflamação (Overall, Wiebkin & Thonard, 1987) e que as MMPs podem colaborar com a degradação de quase todos os tecidos e componentes estruturais da matriz do tecido conjuntivo e membrana basal, é importante entender que suas atividades são estritamente controladas em quatro níveis: 1) regulação da transcrição genética das MMP's; 2) ativação do precursor; 3) diferenças na especificidade ao substrato; 4) inibidores de metaloproteinase (Lauer-Fields, Juska & Fields, 2002).

O papel dos inibidores de metaloproteinase é particularmente importante, pois é justamente um desequilíbrio entre a forma ativa das MMP's e seus inibidores endógenos que leva ao colapso patológico da matriz extracelular durante a periodontite. Esse raciocínio levou ao desenvolvimento de vários inibidores sintéticos que funcionariam como agentes terapêuticos potenciais compensando o déficit dos inibidores naturais ou TIMP's em bloquear ou retardar a destruição proteolítica do tecido conjuntivo (Ryan & Golub, 2000).

Conceitualmente esse raciocínio estimula o uso de drogas que poderiam: inibir a síntese e/ ou liberação das MMP's, bloquear a ativação das formas latentes, inibir a atividade da MMP madura, estimular a síntese endógena de TIMP's ou proteger os inibidores endógenos da inativação proteolítica (Ryan & Golub, 2000).

Dentre os inibidores endógenos, destacam-se as α -macroglobulinas, que podem capturar as formas ativas de MMP, desempenhando um importante papel na regulação de sua atividade, e as TIMP's, que formam complexos covalentes bimoleculares clássicos com as formas ativas de MMP's e, em alguns casos, com os precursores latentes. Enquanto as primeiras funcionam como reguladoras das MMP's nos fluidos corpóreos, as segundas,

provavelmente, atuam pericelularmente. Entretanto, durante a inflamação, as α -macroglobulinas de alto peso molecular podem escapar da circulação e atuar na matriz extracelular (Birkedal-Hansen, 1993).

Além disso, a atividade enzimática pode ser modificada por inibidores exógenos representados pelos quelantes de metais, como o ácido etil diamino tetracético (EDTA) e as tetraciclinas (TTC), o que reflete a importância dos íons cálcio para a atividade catalítica ótima das MMPs (Lauer-Fields, Juska & Fields, 2002).

2.4.2 Inibidores teciduais de metaloproteinase da matriz

TIMP's são pequenas glicoproteínas multifuncionais que inibem especificamente as MMP's que se ligam a elas em uma proporção estequiométrica de 1:1. Elas possuem domínios N e C-terminal que apresentam cerca de 125 e 65 amino-ácidos, respectivamente. O domínio N-terminal funciona como uma unidade separada e é capaz de inibir as MMP's (Reynolds, Hembry & Meikle, 1994; Kerrigan et al., 2000; Visse & Nagase, 2003). Os subdomínios-C medeiam interações com os domínios catalíticos de algumas MMP's e com o domínio hemopexin da MMP-2 e 9 (Baker, Edwards & Murphy, 2002).

TIMP's são proteínas secretadas, mas podem ser encontradas na superfície celular em associação com proteínas de ligação da membrana. Elas são produzidas por muitos tecidos, apesar de nem todo tecido expressar todos os tipos, e, de uma forma geral, a maioria das células mesenquimais e epidermais é capaz de produzi-las, além de poderem ser localizadas nos grânulos α das plaquetas. Além disto, são, também, identificadas na maioria dos fluidos corpóreos como saliva, fluido gengival crevicular, soro e urina (Reynolds, Hembry & Meikle, 1994; Visse & Nagase, 2003; Verstappen & Von den Hoff, 2006).

Os mamíferos possuem 4 tipos de moléculas de TIMP (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4), que apresentam várias similaridades básicas, porém exibem características estruturais, propriedades bioquímicas e padrões de expressão distintos (TAB. 6) (Baker, Edwards & Murphy, 2002).

TABELA 6
Os inibidores teciduais de MMP

	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
MMP inibida	todas menos MMP-14	todas	MMP-1, 2, 3, 9 e 13	MMP-1, 2, 3, 7 e 9
Maior eficiência	MMP-1	MMP-2 e 9	?	MMP-2 e 7
Tamanho	28,5 kDa	21 kDa	21 kDa	22 kDa
Homologia na seqüência de aminoácidos	42 com TIMP-2		27% com TIMP-1	51% com TIMP-2 e 3
Glicosilação	+	-	+	-
Localização	difundida	difundida	ligada a matriz	difundida
Expressão	induzível	constitutiva	induzível	?
Principal sítio tecidual	osso, ovário	placenta	rim e cérebro	coração
Formação de complexos	pro-MMP-9	pro- MMP-2 MT1-MMP	pro- MMP-2 MT1-MMP e matriz	?

MT - transmembrana

FONTE - Kerrigan, Manssell & Sandy, 2000. p. 232.

Apesar da inibição da destruição da matriz extracelular ter sido considerada a função primária das TIMP`s por vários anos, o número de suas funções biológicas tem se expandido rapidamente. Além da inibição de MMP`s, as TIMP`s têm sido relacionados à sua ativação, à capacidade de estímulo mitogênico e antiapoptótico, ao controle indireto da pressão sanguínea por meio do seu efeito sobre as MMP`s e às interações imunológicas. Essa última deve-se ao fato de que muitas citocinas produzidas pelo sistema imune estão envolvidas na sinalização celular e algumas são capazes de interagir com a transcrição de genes de MMP`s e TIMP`s ou alterar sua expressão. Isso faz com que o efeito das citocinas nessas moléculas seja muito complexo. Assim, dependendo do tipo celular, a mesma citocina pode estimular ou inibir a expressão de TIMP e MMP (Verstappen & Von den Hoff, 2006).

A ação inibitória das TIMP`s sobre as MMP`s é exercida em 2 níveis: por meio da inibição da forma cataliticamente ativa da enzima e da prevenção ou atraso na conversão dos zimógenos de MMP para a forma ativa (Bodden et al., 1994).

Esta ação deve-se ao desenho em forma de cunha da molécula de TIMP, que a torna capaz de abrir uma fenda na ranhura do sítio ativo da MMP`s, de forma similar àquela feita pelo substrato (Visse & Nagase, 2003).

Todos os 4 tipos de TIMP`s inibem as formas ativas de todas as MMP`s estudadas até hoje, apesar da TIMP-1 ser um fraco inibidor de MMP-19 e várias MT-MMP`s (Baker, Edwards & Murphy, 2002).

A TIMP-1, é uma glicoproteína de 30 kDa, que forma compostos não covalentes, essencialmente irreversíveis e de alta afinidade com as formas ativas de MMP`s . Ela consiste em 6 *loops* mantidos em posição por seis ligações dissulfido, arranjadas em três estruturas semelhantes à nós; porém, sua atividade inibitória reside nos 3 primeiros *loops* (Reynolds, Hembry & Meikle, 1994; Bodden et al., 1994).

TIMP-1 tem ação antiapoptótica e potencializadora das células progenitoras dos eritrócitos (Hayakawa, 1994), é capaz de alterar o fenótipo metastático de certas células tumorais e prevenir a invasão e metástase quando expressas excessivamente. Também apresenta atividade promotora de crescimento sobre uma série de tipos celulares além de estimular os fibroblastos a produzirem MMP-1 (Bodden et al., 1994; Visse & Nagase, 2003) e acumularem-se no núcleo dessas células de forma ciclo celular-dependente, com atividade máxima na fase S, sugerindo sua participação no crescimento celular (Nagase & Woessner, 1999; Verstappen & Von den Hoff, 2006).

TIMP-1 é produzida por vários tipos de tecidos (aorta, cartilagem, osso embrionário, tendão, polpa dental, gengiva, sinóvia e útero) e células em cultura (fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, osteoblastos, condrócitos, plaquetas, monócitos/ macrófagos, células musculares lisas e células tumorais). Sua expressão diminui com o envelhecimento dos fibroblastos, o que contribui para o aumento da atividade catabólica na derme. TIMP-1 também foi encontrada em todos os fluidos corpóreos, indicando ser uma proteína fundamental e ubíqua (Hayakawa, 1994; Hornebeck, 2003).

Apesar das TIMP-1 e 2 serem capazes de inibir praticamente todas as MMP's, TIMP-1 foi cerca de 2 vezes mais eficiente contra a MMP-1 (Bodden et al., 1994). Além disto, ao formar complexos com MMP-9, ela impediu sua auto-ativação, sem perder a capacidade de inibir MMP's ativas; porém, foi verificada a perda da capacidade de promover crescimento celular (Hayakawa, 1994).

Verificou-se, ainda, que TIMP-1 e 2 estimulam a atividade osteoclástica e que os inibidores sintéticos não possuem esse efeito e, assim como as MMP's as TIMP's, foram encontrados com freqüência em sítios que demonstravam evidência histológica de remodelação tecidual (Baker, Edwards & Murphy, 2002).

As TIMP's podem ser coexpressas com as MMP's, mas os estudos têm demonstrado uma regulação recíproca de sua expressão, a qual depende de fatores de crescimento e citocinas expressos endogenamente. Em resumo, o

equilíbrio entre MMP e TIMP é variável nos processos fisiológicos envolvidos no crescimento e desenvolvimento e nas condições patológicas, como câncer e periodontite (Verstappen & Von den Hoff, 2006).

2.4.3 O papel das metaloproteinases na degradação do colágeno gengival

Os colágenos tipo I e III, produzidos pelos fibroblastos do ligamento periodontal e gengiva, são os componentes predominantes da matriz extra-celular do periodonto. A clivagem inicial do colágeno do ligamento periodontal e da gengiva é uma peça chave das lesões periodontais progressivas e ativas, causadas por colagenases intersticiais derivadas de células do hospedeiro (Kiili et al., 2002).

Em função dessas evidências, vários estudos têm avaliado o papel e o valor diagnóstico das formas de colagenase (e gelatinase) e seus inibidores no tecido conjuntivo, soro e fluido gengival crevicular de portadores de doença periodontal e periimplantar, nas mais diversas situações (Ryan & Golub, 2000).

2.4.4 Estudos que avaliaram a expressão de MMP e TIMP-1 no tecido gengival

No estudo de Meikle et al. (1994) que avaliou a localização de MMP's e TIMP no tecido gengival de 21 indivíduos com periodontite, observou-se que a TIMP-1 estava localizada nos sítios onde havia remodelação tecidual. Além disso, eles demonstraram que não só as células do conjuntivo, mas também as células epiteliais participavam dessa remodelação.

Acreditando que MMP-8, TIMP-1 e MMP-1 desempenhavam um papel importante no desenvolvimento da doença periodontal, Aiba et al. (1996) avaliaram o efeito da inflamação na expressão genética dessas moléculas em biópsias gengivais. Por meio do ensaio de transcrição reversa de reação de cadeia de polimerase (RT-PCR), eles observaram que os níveis de RNA

mensageiro (RNAm) de MMP-1 foram significativamente elevados na gengiva inflamada, enquanto os níveis de MMP-8 não diferiram entre o grupo com inflamação gengival e o controle e mal foram detectados. Já a expressão de TIMP-1 não foi alterada e permaneceu mais alta do que esses dois genes em ambos os grupos.

Dentro desse contexto, Séguier et al. (2001) estudaram a relação entre destruição de colágeno, expressão de MMP e TIMP e células inflamatórias. Eles verificaram que a fração da área ocupada por fibras colágenas no tecido conjuntivo dos indivíduos controles foi $60 \pm 7\%$, enquanto nos indivíduos com periodontite esse valor caiu para $33 \pm 10\%$. Esse achado apresentou correlação com o número de células inflamatórias e MMP's e TIMP's expressas. Nos indivíduos com periodontite, houve um aumento significativo de CD8+, CD22+, CD68+ e TIA-1+, bem como um aumento de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 e a forma ativa de MMP-9. A forma ativa de MMP-9 e a quantidade de TIMP-1 foram positivamente correlacionadas com o número de CD22+, CD68+ e TIA-1+. Esses resultados demonstraram que um desequilíbrio entre MMP e TIMP estava associado à destruição da matriz extracelular durante a periodontite.

Killi et al. (2002), estudando as formas moleculares, a imunolocalização e os níveis de MMP-8 no fluido gengival crevicular de seis indivíduos com periodontite do adulto, verificaram que essa colagenase estava presente na forma prepro, pro e ativa no fluido gengival crevicular de indivíduos na fase pré-tratamento. Por meio de imunistoquímica verificou-se que MMP-8 estava presente nas células epiteliais do sulco e nos neutrófilos e plasmócitos do tecido conjuntivo gengival inflamado.

O estudo de Borsani et al. (2005) avaliou a imunoexpressão de colágeno e MMP no tecido gengival de indivíduos com periimplantite, mucosa periimplantar sadia e tecido periodontal sadio. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de colágeno tipo I e III entre os grupos estudados. A marcação de MMP-1-3-8 e TIMP-1 foi fraca e localizada no estroma em todos os grupos. No periodonto e tecido periimplantar saudável e com periimplantite, a expressão de MMP-13 foi verificada na lâmina própria, enquanto, nos tecidos

com periimplantite, foi verificada, também, no epitélio. Em função desses achados, supõe-se que as diferenças na imunexpressão de MMP-8 e MMP-13 possam estar relacionadas a diferentes vias de ativação.

Ao avaliar a localização de TIMP-1 e MMP-2 e 9 nas células de Langerhans de indivíduos saudáveis e com periodontite, Bodineau et al. (2006) verificaram que as células de Langerhans TIMP-1+ localizavam-se, principalmente, nas camadas epiteliais superiores, enquanto as células MMP-9+ foram observadas, especialmente na periodontite, na camada basal do epitélio ou atravessando a membrana basal. Eles sugeriram que as mudanças na expressão de TIMP e MMP pelas células de Langerhans subgingivais poderiam estar implicadas na migração celular através do conjuntivo.

Reafirmando o papel da MMP-8 na DP de fumantes, Liu et al. (2006) verificaram, por meio de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), que, apesar de não haver diferenças significativas ($p > 0,05$) entre sua concentração plasmática em fumantes e não-fumantes com DP, técnicas de imunofluorescência revelaram um aumento local dessas moléculas no tecido conjuntivo periodontal (1154 ± 124 unidades em fumantes e 817 ± 60 unidades em não-fumantes) que poderia contribuir para a progressão da DP em fumantes. Verificou-se, ainda, que a MMP-8 foi encontrada mais freqüentemente no tecido conjuntivo do que no tecido epitelial.

Buduneli et al. (2007), em um estudo experimental que induziu periodontite em ratos usando endotoxina, procurou avaliar o efeito de doxiciclina e alendronato na expressão imunistoquímica gengival de MMP-8 e TIMP-1. Eles verificaram que os animais com periodontite apresentaram expressão significativamente maior de MMP-8 ($1,56 \pm 0,73$) do que os controles que receberam solução salina ($0,22 \pm 0,44$) e os animais que receberam doxiciclina ($0,67 \pm 0,5$) e alendronato ($0,78 \pm 0,44$). De maneira contrária, os animais tratados apresentaram um aumento na expressão de TIMP-1 ($2,11 \pm 0,6$ e $2,56 \pm 0,53$, respectivamente) quando comparado aos animais dos grupos controle ($2,22 \pm 0,67$) e periodontite ($0,56 \pm 0,53$). Esses resultados sugeriram um efeito benéfico potencial da doxiciclina e do alendronato no tratamento periodontal.

2.4.5 Estudos que avaliaram os níveis de MMP e TIMP-1 no FGC

Halinen et al. (1996) estudaram a atividade e caracterização de MMP-8 e 9 na saliva e fluido gengival crevicular (FGC) de crianças com Síndrome de Down. Eles observaram que a imunorreatividade para MMP-8 foi maior no grupo com Síndrome de Down do que no grupo controle e concluíram que a forma ativa de MMP-8 identificada no FGC de crianças com Síndrome de Down pode refletir o grau de destruição periodontal observado nos estágios iniciais de gengivite e periodontite desses indivíduos.

Liede et al. (1999) avaliaram a associação entre o abandono do hábito de fumar, status periodontal e níveis salivares de proteinase. Eles verificaram que os níveis de atividade proteolítica e de MMP-8 eram menores nos fumantes do que em ex-fumantes ($p < 0,05$) e que a prevalência de bolsas ≥ 4 mm, supuração e perda óssea eram significativamente mais baixas nos ex-fumantes.

Em 1998, Nomura et al. desenvolveram um estudo para correlacionar os níveis de TIMP, a atividades das collagenases e a imuno-reatividade para MMP-1 e MMP-8 no fluido gengival crevicular, com a destruição periodontal em indivíduos portadores de periodontite e gengivite. Os resultados alcançados por ELISA demonstraram que os níveis de TIMP-1 no grupo gengivite ($11,18 \pm 6,3$ ng) e no grupo periodontite ($13,68 \pm 9,64$ ng) eram significativamente maiores do que aqueles no grupo saudável ($3,39 \pm 2,91$ ng). A atividade da collagenase ativa, avaliada por ensaios funcionais, foi significativamente maior no grupo periodontite ($0,623 \pm 0,372$ U) do que no grupo saudável ($0,226 \pm 0,181$ U). Entretanto, não foi identificada nenhuma diferença entre os grupos gengivite e saudável ($0,360 \pm 0,387$ U). Por meio desse estudo foi sugerido que a atividade elevada de collagenase, especialmente de collagenase ativa, seria um importante marcador para avaliar a patogênese da periodontite.

Posteriormente, em 2002, Söder, Jin & Wickholm compararam os níveis de MMP-8, elastase e PGE_2 em sítios pareados de fumantes e não-fumantes com DP. Verificou-se que os fumantes apresentaram níveis mais elevados de

elastase funcional ($p < 0,005$) e elastase complexada com α_1 antitripsina ($p < 0,05$) do que os não-fumantes, entretanto, não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os níveis de MMP-8 ($28.041 \pm 8,20$ e $45,74 \pm 10,22$ ng/ sítio, respectivamente) e os não - fumantes apresentaram níveis mais elevados de PGE_2 ($p < 0,05$). Concluiu-se que a função dos granulócitos parece estar prejudicada nos fumantes.

Kivelä-Rajamaki et al. (2003) estudaram por meio de *Western immunoblotting*, o papel da MMP-8 e laminina de cadeia 5 γ 2 no fluido sulcular perimplantar de humanos. Eles verificaram níveis elevados dessas duas moléculas no fluido de indivíduos com perimucosite e perimplantite (com reabsorção óssea ≥ 1 mm) que apresentavam índice gengival elevado. Por outro lado, indivíduos com perimplantite, porém, sem índice gengival elevado, apresentaram baixos níveis dessas duas moléculas, comparáveis àqueles do fluido sulcular perimplantar de indivíduos saudáveis.

A melhoria dos parâmetros clínicos observada após a terapia periodontal inicial foi acompanhada de reduções significativas dos níveis de MMP-8, verificadas por ensaio imunofluorométrico, no estudo de Kinane et al. (2003). Enquanto os níveis de MMP-8 no FGC reduziram ($34,2 \pm 28,3$ ng/ μ L) significativamente ($p < 0,005$) quando comparados com o baseline ($54,1 \pm 34,6$ ng/ μ L), redução ainda mais significativa ($p < 0,001$) foi verificada na última visita da terapia periodontal de suporte após 8 semanas ($29,5 \pm 22,1$ ng/ μ L).

Nesse mesmo contexto, Figueiredo et al. (2004) avaliaram o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica na atividade das proteases no FGC de indivíduos com periodontite crônica. Associada à melhoria significativa ($p < 0,05$) de todos os parâmetros clínicos, verificou-se, por meio de ELISA uma redução, significativa de MMP-8 e sua atividade colagenolítica ($p < 0,05$) nos sítios de gengivite (1,3 ng/mL e 23530 AU, respectivamente) e periodontite (2,6 ng/mL e 43239 AU, respectivamente) de pacientes com DP crônica, quando comparado com o baseline (3,5 ng/mL e 57145 AU, respectivamente, para gengivite e 7,8 ng/mL e 90654 AU, para periodontite). Observou-se, assim, que os sítios com periodontite continuaram apresentando níveis mais elevados de MMP-8 e

atividade colagenolítica do que os sítios com gengivite, mesmo após o tratamento.

Além disso, Pozo et al. (2005), estudando a expressão de MMP-8 e TIMP-1 no FGC de pacientes com DP no baseline e após terapia periodontal inicial (3 e 6 meses após raspagem e alisamento radicular) verificaram diferenças no padrão de expressão de MMP-8 entre os controles saudáveis e os pacientes. Por meio de *Western immunoblotting*, eles observaram que os sítios controle apresentaram espécies de uma forma parcialmente ativa (69 kD), enquanto os sítios dos pacientes apresentaram uma frequência elevada da forma ativa (56 kD) e, em alguns casos, a forma latente (85 kD). Nos sítios com profundidade de sondagem ≥ 4 mm, a frequência da forma ativa diminuiu após o tratamento. Os níveis de TIMP-1, avaliados por *immunodotblot*, foram significativamente mais baixos nos pacientes do que nos controles e, após o tratamento retornaram a níveis similares àqueles observados nos controles.

Avaliando os efeitos da fase inicial do tratamento periodontal nos níveis de MMP-3 e TIMP-1 por ELISA, Tüter et al. (2005) verificaram uma melhoria significativa ($p < 0,05$) dos parâmetros clínicos após terapia associada a um aumento dos níveis de TIMP-1 (51,3 ng/ μ l) e uma diminuição dos níveis de MMP-3 (5,5 ng/ μ l) quando comparado com o baseline (29 ng/ μ l e 9 ng/ μ l, respectivamente). Os controles saudáveis apresentaram os menores níveis de MMP-3 (0,15 ng/ μ l) e os maiores níveis de TIMP-1 (91 ng/ μ l). É importante destacar que, além de sua habilidade em degradar vários componentes do tecido conjuntivo, a MMP-3 participa da cascata de ativação proteolítica da pro-MMP-8.

Kumar et al. (2006) avaliaram, por zimografia e *Western immunoblotting*, a expressão de MMP-8 e MMP-9 em indivíduos com periodontite crônica com e sem diabetes. Eles verificaram que os indivíduos diabéticos apresentavam sinais clínicos de gravidade de doença mais acentuados do que os pacientes não-diabéticos, além de expressão elevada de MMP-8 e MMP-9 ($420,9 \pm 26,83$ e $326 \pm 100,85$, respectivamente) quando comparados com os pacientes não-diabéticos ($326 \pm 58,83$ e $204,9 \pm 63,57$, respectivamente) e os controles

saudáveis ($237,7 \pm 37,01$ e $148,8 \pm 2027$, respectivamente). Eles concluíram que concentrações elevadas de MMP-8 e MMP-9 no tecido gengival de diabéticos com periodontite sugeriam uma relação com a deficiência no processo de cicatrização.

Avellan et al. (2006) desenvolveram um estudo experimental em humanos para avaliar os efeitos da capsaicina (uma molécula capaz de causar liberação de neuropeptídeos e mediadores inflamatórios que podem induzir a liberação de MMP-8) no FGC. Eles observaram, por meio de ensaios imunofluorométricos, que o estímulo da mucosa alveolar com capsaicina induziu elevações locais significativas nos níveis de MMP-8 nos dentes adjacentes (baseline $56 \pm 20,5$ $\mu\text{g/l}$, durante o estímulo $131 \pm 39,9 \mu\text{g/l}$; 15 minutos após $115 \pm 17,3 \mu\text{g/l}$; 30 minutos após $98 \pm 20,4 \mu\text{g/l}$). Verificou-se, por meio de *Western immunoblotting*, que tanto a isoforma derivada do neutrófilo quanto a colagenase do tipo mesenquimal estavam elevadas e ativadas. Essas mudanças não foram observadas em dentes localizados à distância.

Söder et al. (2006), investigando os níveis de MMP-8 com a presença simultânea de patógenos no FGC, verificaram que microrganismos específicos parecem induzir resposta do hospedeiro com aumento na liberação dessas MMP's na bolsa periodontal. Os níveis de MMP-8 variaram entre $10,9 \pm 12,3$ e $1,53 \pm 2,1$ ng/ sítio, e $8,21 \pm 9,1$ e $6,24 \pm 10,7$ ng/ sítio, na presença e ausência de *Tanerella forsythia* e *Aa*, respectivamente; e entre $12,76 \pm 15,4$ e $15,21 \pm 14,5$ ng/ sítio, e $3,84 \pm 5,8$ ng/ sítio, na presença e na ausência de *Prevotella intermedia* e *Treponema denticola*, respectivamente.

Emingil et al. (2006) estudaram, por meio de ELISA e *Western immunoblotting* os níveis de MMP-7 e TIMP-1 em indivíduos com periodontite crônica, gengivite e controles. Os três grupos apresentaram níveis similares de MMP-7 ($37,33 \pm 7,5$ pg/sítio; $36,68 \pm 8,5$ pg/sítio e $36,81 \pm 6,8$ pg/sítio, respectivamente). Entretanto, os níveis de TIMP-1 aumentaram progressivamente com a gravidade da inflamação periodontal ($42,2 \pm 10,2$ pg/sítio; $73,99 \pm 17$ pg/sítio; $278,57 \pm 205,4$ pg/sítio, respectivamente para controle, gengivite e periodontite crônica).

Em 2007, Kurtis et al. estudaram os níveis de MMP-8 em portadores de periodontite crônica fumantes e não-fumantes submetidos a terapia periodontal inicial (RAR) associada ou não ao uso sistêmico de Flurbiprofeno. Por meio de ELISA, verificou-se que todos os indivíduos apresentaram redução significativa dos níveis de MMP-8 após terapia ($p < 0,001$). Entretanto, os níveis de MMP-8 no fluido gengival crevicular de indivíduos que fizeram ou não uso de flurbiprofeno não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,0117$ e $p= 0,485$, respectivamente).

Recentemente, Rai et al. (2008) estudaram, por ELISA, os níveis creviculares de MMP-2 e MMP-9 e os níveis salivares de MMP-8 em indivíduos com gengiva saudável, gengivite e periodontite. Eles verificaram que, nos casos de periodontite, os níveis de MMP-8 ($428,6 \pm 432,4$ ng/ml) e MMP-9 ($56,42 \pm 22,32$ pg/ μ l) estavam significativamente mais elevados do que nos indivíduos saudáveis ($95,2 \pm 70,2$ ng/ml e $38,8 \pm 24,31$ pg/ μ l, respectivamente) e com gengivite ($312,8 \pm 301,8$ ng/ml e $42,31 \pm 21,35$ pg/ μ l, respectivamente) com um $p < 0,001$. Os níveis dessas MMP's foram altamente correlacionados com a profundidade de sondagem e sangramento a sondagem.

Os principais resultados de alguns destes estudos foram compilados na TAB. 7.

É interessante destacar que, dentro da perspectiva atual, o FGC pode ser visto como um produto final do processo destrutivo e baixos níveis desses fatores podem simplesmente indicar altos níveis de atividade dentro dos tecidos ou os efeitos do fumo na dinâmica dos tecidos gengivais (Palmer et al., 2005).

TABELA 7 - Estudos que avaliaram MMP e TIMP-1 no FGC e gengiva de indivíduos com periodontite crônica

Estudo	Objetivo	Técnica	MMP	Periodontite crônica	Gengivite	Controle
Nomura et al. (1998)	níveis no FGC	ELISA	TIMP-1	13,68 ± 9,64 ng	11,18 ± 6,3 ng	3,39 ± 2,91 ng
	atividade colagenolítica	ELISA	MMP-8	0,623 ± 0,372 U	0,360 ± 0,387 U	0,226 ± 0,181 U
Söder et al. (2002)	níveis no FGC de fumantes	ELISA	MMP-8	28,041 ± 8,20 ng/ sítio		
	níveis no FGC de não fumantes	ELISA	MMP-8	45,74 ± 10,22 ng/ sítio		
Kiili et al. (2002)	absorbância no baseline	western	MMP-8	2,571		
	pós-terapia	immunoblotting	MMP-8	0,696		
Kinane et al. (2003)	níveis no baseline	ensaio	MMP-8	54,1 ± 34,6 ng/ µL		
	2 meses após terapia	imunofluoro-	MMP-8	34,2 ± 28,3 ng/ µL		
	após 3 meses de TPS	métrico	MMP-8	29,5 ± 22,1 ng/ µL		
Figueiredo et al. (2004)	Níveis no baseline	ELISA	MMP-8	7,8 ng/mL	3,5 ng/mL	
	atividade colagenolítica baseline		MMP-8	90654 AU	57145 AU	
	níveis pós terapia	ELISA	MMP-8	2,6 ng/mL	1,3 ng/mL	
	atividade colagenolítica pós terapia		MMP-8	43239 AU	23530 AU	
Tüter et al. (2005)	níveis no baseline	ELISA	TIMP-1	29 ng/µl		91 ng/µl
	níveis pós terapia	ELISA	TIMP-1	51,3 ng/µl		
	níveis no baseline	ELISA	MMP-3	9 ng/µl		0,15 ng/µl
	níveis pós terapia	ELISA	MMP-3	5,5 ng/µl		
Kumar et al. (2006)	não diabéticos	western	MMP-8	326 ± 58,83		237,7 ± 37,01
	Diabéticos	blotting	MMP-8	420,9 ± 26,83		
Emingil et al. (2006)	níveis no FGC	western blotting	MMP-7	37,33 ± 7,5 pg/sítio	36,68 ± 8,5 pg/sítio	36,81 ± 6,8 pg/sítio
	níveis no FGC	ELISA	TIMP-1	278,57 ± 205,4 pg/sítio	73,99 ± 17 pg/sítio	42,2 ± 10,2 pg/sítio
Rai et al. (2008)	níveis no FGC	ELISA	MMP-8	428,6 ± 432,4 ng/ ml	312,8 ± 301,8 ng/ ml	95,2 ± 70,2 ng/ ml

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar o efeito do tabagismo sobre o *turnover* de colágeno gengival de indivíduos portadores de periodontite crônica.

Avaliar o efeito do tabagismo sobre a expressão de TIMP-1 e MMP-8 no tecido gengival de indivíduos portadores de periodontite crônica.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar a proporção de colágeno tipo I no tecido gengival de indivíduos portadores de periodontite crônica fumantes, não-fumantes e controles.

- Comparar a expressão de TIMP-1 e MMP-8 nos tecidos conjuntivo e epitelial de indivíduos portadores de periodontite crônica fumantes, não-fumantes e controles.

4 METODOLOGIA

4.1 Amostra

A amostra foi constituída por 36 indivíduos maiores de 18 anos, clinicamente saudáveis do ponto de vista sistêmico e portadores de periodontite moderada (definida pela presença de 2 sítios interproximais com nível de inserção clínica $\geq 4\text{mm}$ em dentes diferentes ou pela presença de 2 sítios interproximais com profundidade de sondagem $\geq 5\text{mm}$ em dentes diferentes) a grave (definida pela presença de 2 sítios interproximais com nível de inserção clínica $\geq 6\text{mm}$ em dentes diferentes e 1 sítio interproximal com profundidade de sondagem $\geq 5\text{mm}$) (Machtei et al., 1992), indicados para a realização de cirurgias ressectivas na clínica de periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os pacientes avaliados foram distribuídos em grupos da seguinte forma:

G1 – DP: 14 indivíduos clinicamente saudáveis do ponto de vista sistêmico que nunca fumaram, porém diagnosticados com periodontite moderada ou grave.

G2 – Fumantes: 10 indivíduos clinicamente saudáveis do ponto de vista sistêmico, porém diagnosticados com periodontite moderada ou grave que fumavam ≥ 20 cigarros por dia, por mais de 10 anos.

G3 – Controle: 12 indivíduos clinicamente saudáveis do ponto de vista sistêmico, sem alterações periodontais, com um alto grau de higiene bucal, sem sangramento a sondagem, com profundidade de sondagem $\leq 3\text{mm}$ e que nunca fumaram.

TABELA 8– Caracterização da amostra de indivíduos incluídos no estudo.

Indivíduo	gênero	idade	PS * †	Sangra	cigar/dia	tempo/fumo anos	Grupo
1	F	46	5	+	0	0	1
2	F	21	5	+	0	0	1
3	F	40	5	+	0	0	1
4	M	23	10	+	0	0	1
5	M	42	10	+	0	0	1
6	M	55	8	+	0	0	1
7	F	49	7	+	0	0	1
8	F	56	6	+	0	0	1
9	M	52	6	+	0	0	1
10	M	54	5	+	0	0	1
11	F	55	7	+	0	0	1
12	F	44	9	+	0	0	1
13	M	55	7	+	0	0	1
14	M	63	7	+	0	0	1
15	M	66	6	+	20	10	2
16	M	67	6	+	40	10	2
17	F	42	5	+	20	20	2
18	M	43	5	+	20	30	2
19	F	44	7	+	20	30	2
20	M	57	6	+	20	40	2
21	M	46	7	+	40	30	2
22	F	49	10	+	20	30	2
23	M	54	7	+	40	30	2
24	F	50	8	+	20	10	2
25	F	41	3	-	0	0	3
26	F	52	3	-	0	0	3
27	F	27	3	-	0	0	3
28	F	36	3	-	0	0	3
29	F	38	3	-	0	0	3
30	F	36	3	-	0	0	3
31	M	66	3	-	0	0	3
32	F	54	3	-	0	0	3
33	F	18	3	-	0	0	3
34	F	30	3	-	0	0	3
35	F	25	3	-	0	0	3
36	M	32	3	-	0	0	3

PS – profundidade de sondagem

M – gênero masculino

* Profundidade de sondagem média do G1, $6,63 \pm 1,77$

F – gênero feminino

† Profundidade de sondagem média do G2, $6,7 \pm 1,49$

4.1.1 Critérios de inclusão

- Pacientes diagnosticados com periodontite moderada a grave.
- Ausência de história médica relevante.
- Fumantes que relataram fumar pelo menos 1 maço de cigarros comerciais com filtro por dia, por mais de 10 anos.
- Indivíduos sem história de tabagismo.

4.1.2 Critérios de exclusão

- Edêntulos Totais.
- Crescimento gengival idiopático ou induzido por droga.
- Qualquer desordem sistêmica que exija antibiótico-profilaxia ou possa afetar a condição periodontal.
- Presença de alteração endodôntica no dente da região onde será coletada amostra de tecido gengival.
- Dentes e/ou raízes com anatomia anormal, pela possibilidade dessas alterações influírem no resultado do estudo.
- Uso de antiinflamatórios ou antimicrobianos subgengivais ou sistêmicos até 6 meses antes do exame inicial.
- Ex-fumantes e fumantes que relataram fazer uso de cachimbo, charuto, cigarro de palha e fumo de rolo.
- Mulheres na menopausa, grávidas, em lactação ou em uso de qualquer tipo de medicação contraceptiva.
- Portadores de lesões pré-cancerígenas ou cancerígenas na região onde foi coletada a amostra de tecido gengival.

4.2 Considerações éticas

Este estudo foi encaminhado e submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais, sendo aprovado sob o parecer número ETIC 052/07 (ANEXO A).

Os participantes foram devidamente esclarecidos e informados sobre a pesquisa, seus métodos e objetivos, sendo incluídos somente após a obtenção de um consentimento livre e informado assinado (ANEXO B).

Os indivíduos foram devidamente orientados em relação à sua condição periodontal, esclarecidos sobre a importância do tratamento, alertados sobre o papel e consequências do fumo na progressão e gravidade da doença periodontal, doenças sistêmicas e lesões cancerígenas e, quando necessário, encaminhados para tratamento nas clínicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (ANEXO C).

Todas as informações colhidas tiveram finalidade exclusivamente científica e a não-identificação do paciente na pesquisa foi preservada. A participação no estudo pôde ser cancelada e o consentimento retirado pelo paciente a qualquer momento da pesquisa. Foi assegurado o tratamento, mesmo em caso de recusa da participação na pesquisa.

4.3 Protocolo para a obtenção dos dados

4.3.1 Questionário

Todos os indivíduos responderam a um questionário estruturado, aplicado por um mesmo examinador, a respeito dos hábitos de fumar e estado geral de saúde (ANEXO D).

4.3.2 Dados clínicos

Os dados referentes à anamnese foram coletados a partir da ficha clínica e confirmados com o paciente durante o preenchimento do questionário.

Da mesma forma, os dados periodontais (profundidade de sondagem, perda de inserção clínica e grau de higiene bucal) foram coletados a partir da ficha periodontal do indivíduo (ANEXO E).

4.3.3 Coleta das amostras de tecido

A coleta foi realizada sob condições de iluminação e assepsia adequadas, segundo normas de biossegurança. Foram utilizada paramentação adequada (avental, gorro, óculos, máscaras e luvas), uma fonte de luz artificial, pinça clínica devidamente esterilizada e tubos de polipropileno (eppendorfs®).

A amostra de tecido foi removida da face vestibular ou interproximal, do dente que apresentava a maior profundidade de sondagem na região operada.

Após a ressecção cirúrgica, as amostras foram lavadas com soro fisiológico pH 7, imersas em solução gelada (-4° C) de sacarose 30% durante 3 horas, congeladas com o uso de composto OCT (Tissue-tek, Bayer Diagnostic, Houndsmill England, UK) em nitrogênio líquido e armazenadas a uma temperatura de -80° C. Posteriormente, as amostras foram cortadas no criostato, em secções seqüenciais de 5µm de espessura, fixadas em acetona gelada por 5 minutos, coletadas em lâminas de vidro gelatinizadas e armazenadas a uma temperatura de -80° C até o processamento. [Lâminas incubadas com a omissão do anticorpo pimário foram utilizadas como controle negativo. Controle positivo e negativo.](#)

Para o processamento as lâminas foram descongeladas e hidratadas em água destilada por 15 minutos.

4.3.4 Microscopia de luz polarizada

As amostras destinadas ao exame morfológico por meio da técnica de coloração picrossírius, usada para visualizar e analisar as fibras colágenas, foram incubadas em uma solução saturada de Sirius Red F3BA em ácido pícrico, por uma hora, em temperatura ambiente. Após a lavagem em água destilada, as amostras foram colocadas em HCl 0,1N por 15 minutos e, em seguida, novamente lavadas em água por 5 minutos. Os cortes foram, então, corados com hematoxilina de Harris por 20 segundos, lavados em água por 15 minutos, desidratados em álcoois graduados e xileno e montados em Permount.

A análise descritiva da lâmina foi realizada sob microscopia de campo escuro, usando polarização óptica em um microscópio Olympus AX 70, equipado com uma câmera, através do qual o fundo aparecia negro, as fibras colágenas tipo I, vermelhas/ amarelas e as fibras colágenas tipo III, verdes, de acordo com sua birrefringência. Para se obter uma avaliação quantitativa e objetiva, 3 campos em cada lâmina foram fotografados, usando um aumento de 10x na ocular e 20x vezes na objetiva. A proporção de fibras vermelhas e verdes foi determinada através de um gabarito contendo 150 pontos simétricos, com 1mm de diâmetro em uma área de 10X15cm. Os espaços negros foram eliminados para que o grau de preservação do tecido não interferisse nos resultados.

4.3.5 Imunoistoquímica

As amostras para imunoistoquímica foram lavadas com água destilada (3x 5 min.), incubadas em solução de peróxido de hidrogênio 20v e metanol (2x 5 min) e, em seguida, lavadas com TRIS-HCL.

Os cortes foram pré-incubados com soro normal de cabra 2% em PBS por 30 minutos, em câmara úmida, à temperatura ambiente e, em seguida, com os anticorpos primários monoclonais de coelho contra humano, anti-MMP-8 (Sigma-Aldrich®, M8305) e anti-TIMMP-1 (Sigma-Aldrich®, T8322), na diluição

de 1: 100 com 1% de albumina bovina, durante 18 horas, à -4°C. O anticorpo anti-MMP-8 reconhece as isoformas pro e ativa. Após três lavagens em TRIS, as amostras receberam o anticorpo secundário cabra anti-coelho (Sigma-Aldrich®, B8895) na diluição de 1:800 e foram incubados por 1 hora, em câmara úmida, à temperatura ambiente. Após a lavagem em TRIS: HCl (3x5 min), as lâminas foram incubadas com o complexo Streptavidina-Biotina-Peroxidase 1:200 (Sigma-Aldrich®, S2438), em câmara úmida, à temperatura ambiente, por 1 hora. Para revelação da reação, empregou-se a solução diaminobenzidina (DAB)- peróxido de hidrogênio por 40 segundos. Em seguida, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Mayer, desidratados, diafanizados e montados em Permount.

4.3.6 Contagem das Células Positivas

A imunorreatividade foi avaliada em um microscópio Zeiss – modelo KF2® equipado com uma câmera power shot G6 Canon. A análise foi feita separadamente para o epitélio (subdividido em camadas basal, suprabasal e superficial) e tecido conjuntivo (subdividido em camadas superficial e profunda) e semiquantificada em 4 categorias baseado em Reiner et al. (1990):

0 = ausência de marcação

1 = expressão discreta (poucas células marcadas)

2 = expressão moderada (praticamente a mesma proporção de células marcadas e não marcadas)

3 = expressão intensa (maioria das células marcadas)

4.4 Análise estatística

A análise estatística da porcentagem de fibras colágenas em cada um dos 3 grupos estudados pelo método picrosírius foi feita pelo teste T-student para amostras independentes.

A análise comparatória da expressão imunohistoquímica de MMP-8 e TIMP-1 em cada um dos três grupos estudados foi feita por Teste de Mann-Whitney.

A correlação entre a expressão de metaloproteinase e distribuição de fibras colágenas entre os grupos foi feita pelo Teste de correlação de Spearman.

Todos os testes foram realizados no software para análise estatística SPSS versão 12.0.

Os resultados foram considerados significativos para uma probabilidade de significância inferior a 1%.

5 RESULTADOS

5.1 Análise morfológica do tecido por meio da técnica picrossírius

A distribuição de fibras colágenas verdes e vermelhas no tecido conjuntivo das amostras do grupo DP foi diferente dos outros dois grupos (FIG.4). As amostras dos grupos controle e fumantes apresentaram menor proporção de fibras verdes (28,54% e 27,98%, respectivamente) e maior proporção de fibras vermelhas (71,9% e 72,2%, respectivamente) (TAB. 9).

TABELA 9

Proporção de fibras colágenas verdes e vermelhas nas amostras de tecido conjuntivo dos grupos DP não-fumantes (G1), DP fumantes (G2) e controle (G3).

Birefringência	Grupo 1			Grupo 2			Grupo 3		
	%	Dp	p	%	Dp	p	%	Dp	p
Fibras vermelhas	53,43	16,62	0,01	72,02	15,74	0,968	71,9	8,54	0,002
Fibras verdes	46,57	16,66	0,01	27,98	15,28	0,918	28,1	7,8	0,002

S* Significância estatística de acordo com o teste T-student para amostras independentes

Dp Desvio padrão

p significância

As amostras do grupo DP apresentaram maior proporção de fibras verdes (46,81) e, menor proporção de fibras vermelhas (53,43%). Esses resultados foram significativamente diferentes daqueles apresentados pelas amostras dos grupos controle e fumantes (TAB. 9).

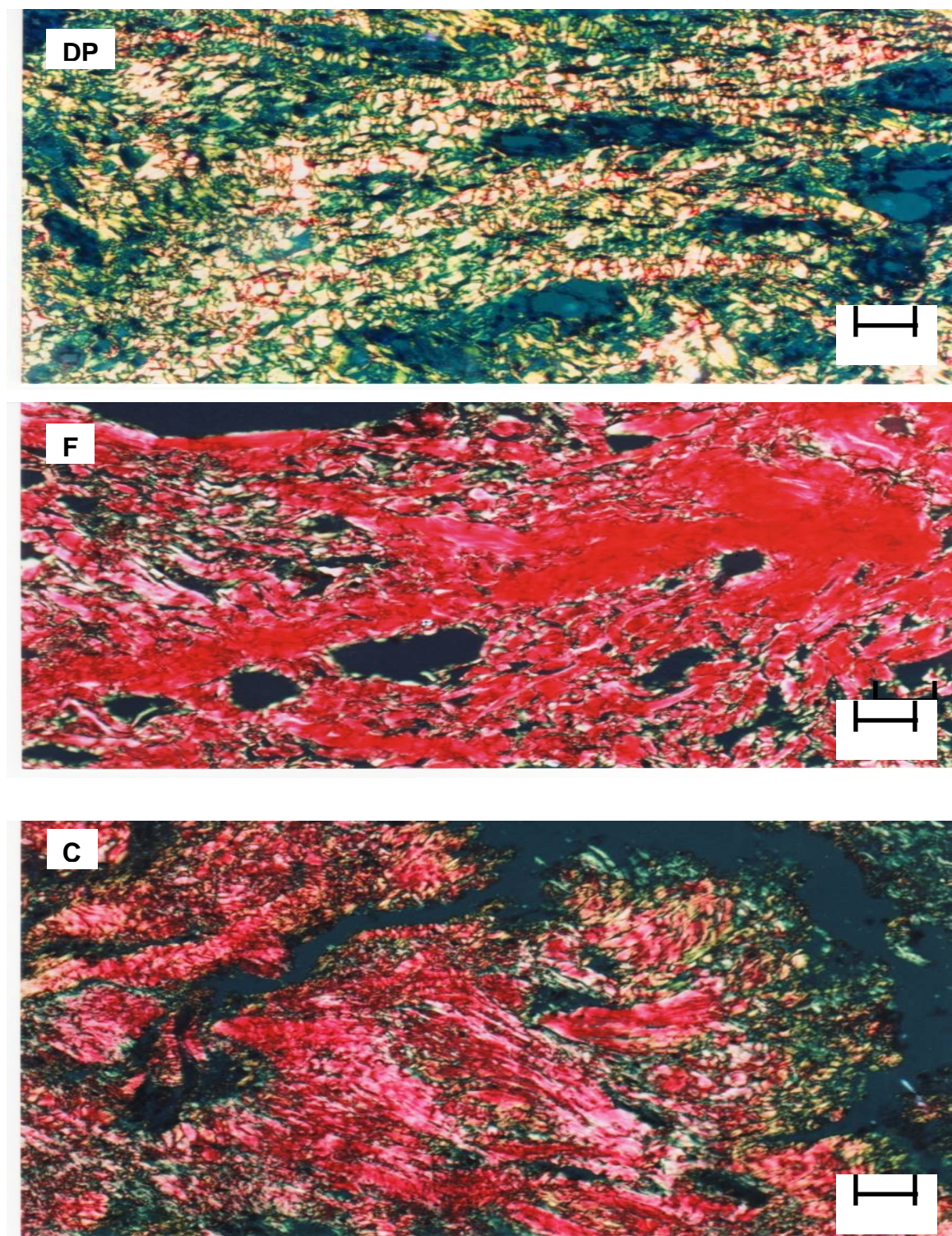


FIGURA 4 - Distribuição de fibras colágenas verdes e vermelhas no tecido conjuntivo de indivíduos dos grupos periodontite não-fumante (DP), periodontite fumante (F) e controles (C) [em um aumento de 50x](#).

5.2 Imunoexpressão de MMP-8

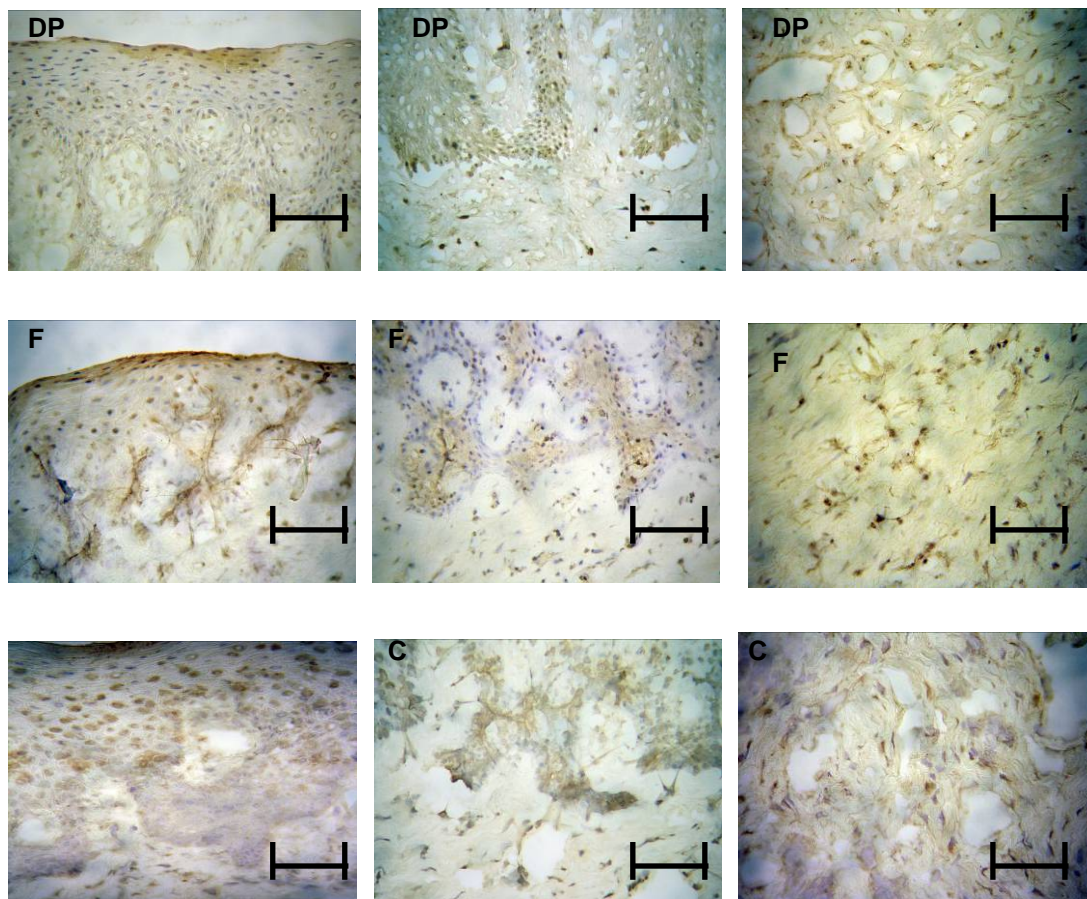


FIGURA 5 – Análise imunoistoquímica da expressão de MMP-8 no epitélio e conjuntivo dos indivíduos dos grupos periodontite não-fumantes (DP), periodontite fumantes (F) e controle (C) ~~em um aumento de 400x.~~

5.2.1 Camada superficial do epitélio

Observou-se que, na camada superficial do epitélio, o grupo DP apresentou a mesma proporção de amostras com marcação celular discreta (35,7%), moderada (35,7%) e intensa (28,6%), enquanto quase a totalidade das amostras dos fumantes (90%) apresentou marcação intensa para MMP-8. Essa diferença foi estatisticamente significativa ($p= 0,003$). No grupo controle, houve predomínio da expressão intensa de MMP-8 (63,6%) enquanto, 18,2% das amostras apresentaram marcação discreta e moderada (GRAF.1).

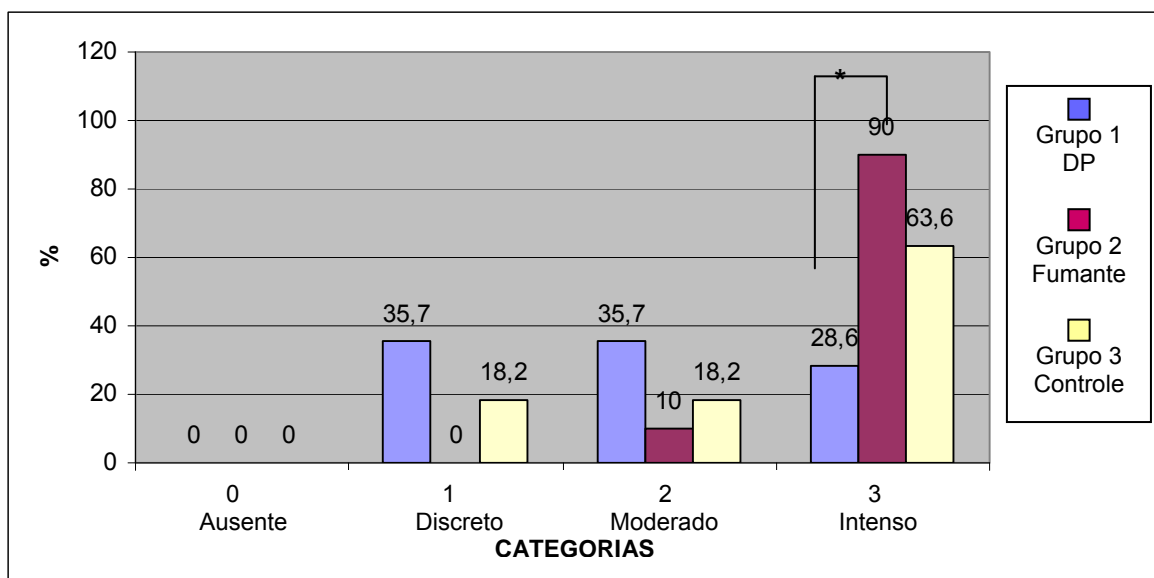


GRÁFICO 1 – Expressão de MMP-8 na camada superficial do epitélio.

* os grupos apresentam diferença estatisticamente significativa ($p = 0,003$) em relação ao controle.

5.2.2 Camada suprabasal do epitélio

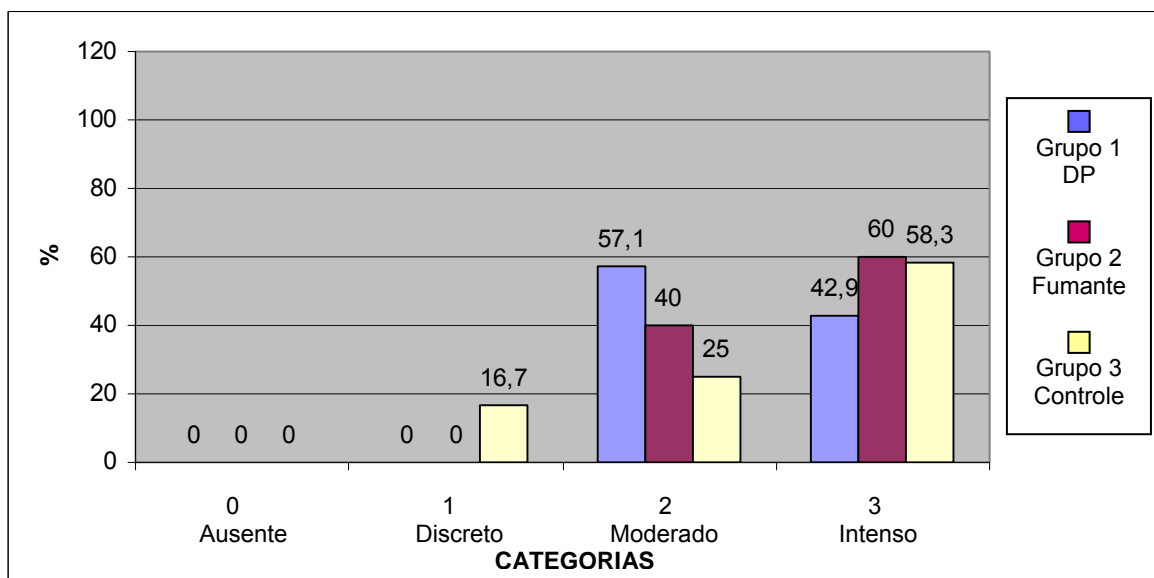


GRÁFICO 2 – Expressão de MMP-8 na camada suprabasal do epitélio.

Na camada suprabasal do epitélio, as amostras do grupo DP e fumantes apresentaram expressão celular moderada e intensa. As amostras do grupo controle apresentaram marcação leve, moderada e intensa. Nos grupos controle e fumantes, houve predomínio da marcação intensa (58,3% e 60%, respectivamente), enquanto, no grupo DP, predominou a expressão celular moderada (57,1%) nas amostras. Não foram verificadas diferenças estatísticas entre os grupos (GRAF.2).

5.2.3 Camada basal do epitélio

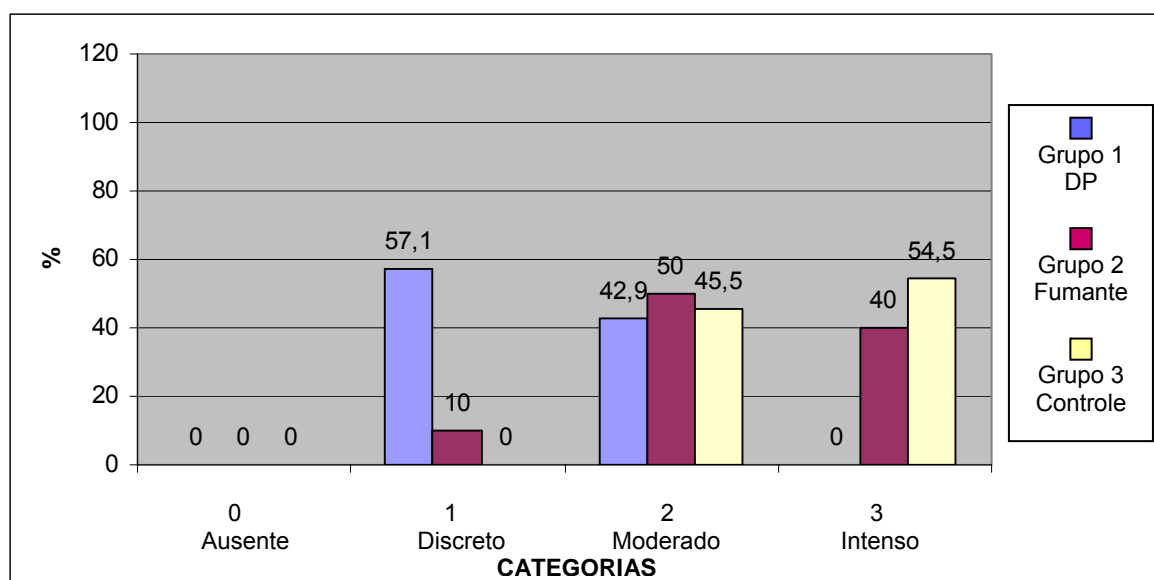


GRÁFICO 3 – Expressão de MMP-8 na camada basal do epitélio.

A expressão de MMP-8 na camada basal do epitélio das amostras do grupo DP apresentou marcação leve (57,1%) ou moderada (42,9%). Nas amostras do grupo controle verificamos expressão celular moderada (45,5%) e intensa (54,5%). Apenas no grupo DP, a imunomarcação verificada distribuiu as amostras entre as três categorias: discreta (10%), moderada (50%) e intensa (40%). Não foi verificada diferença estatística entre os grupos (GRAF.3).

5.2.4 Camada superficial do conjuntivo

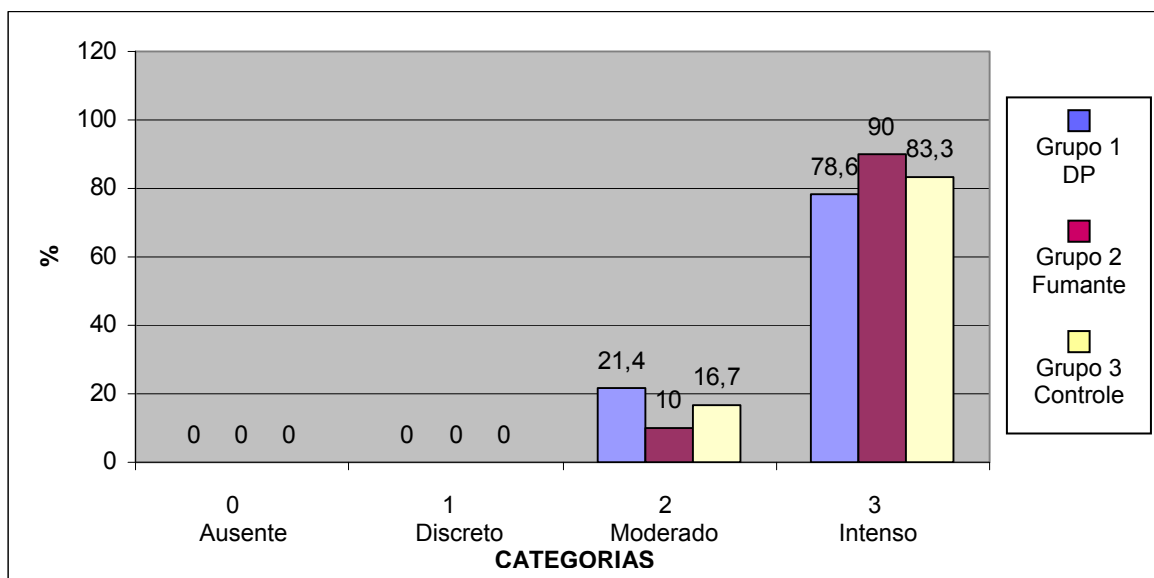


GRÁFICO 4 – Expressão de MMP-8 na camada superficial do conjuntivo.

Na camada superficial do conjuntivo os três grupos apresentaram o mesmo padrão de distribuição da expressão celular de MMP-8 entre as amostras. Cerca de 10 a 20% das amostras apresentaram expressão moderada, enquanto a maioria (78% a 90%) das amostras apresentou expressão intensa. Não houve diferença estatística entre os grupos (GRAF.4).

5.2.5.1 Camada profunda do conjuntivo

Na camada profunda do conjuntivo, praticamente a totalidade das amostras apresentou expressão intensa. Apenas 7,1% das amostras do grupo DP apresentou marcação moderada (GRAF.5).

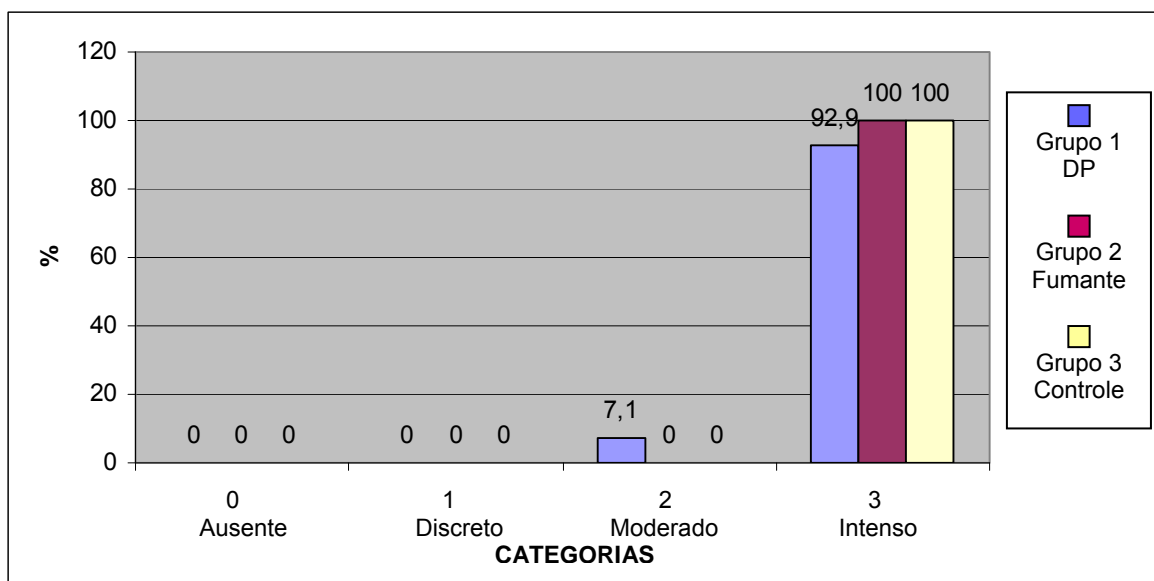


GRÁFICO 5 – Expressão de MMP-8 na camada profunda do conjuntivo.

5.3 Imunoexpressão de TIMP-1

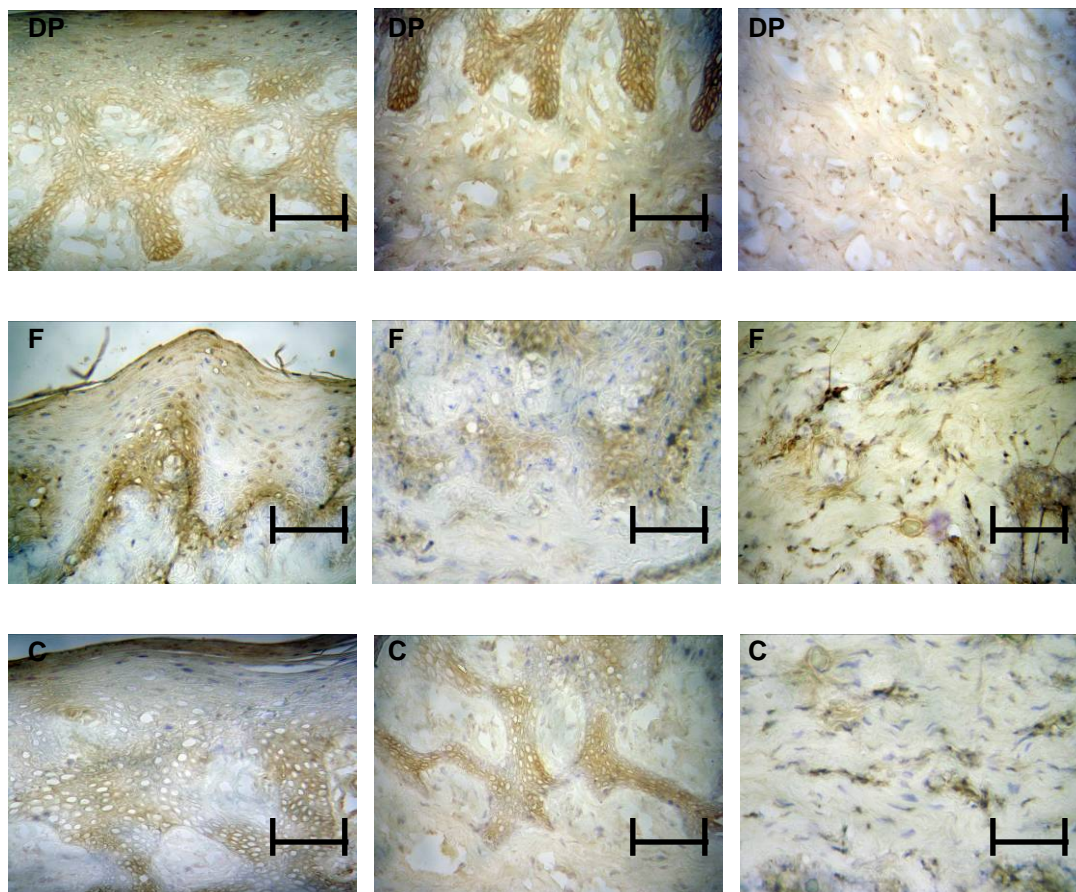


FIGURA 6 – Análise imunoistoquímica da expressão de TIMP-1 no epitélio e conjuntivo dos indivíduos dos grupos periodontite não-fumantes (DP), periodontite fumantes (F) e controle (C). ~~em um aumento de 400x.~~

5.3.1 Camada superficial do epitélio

A expressão de TIMP-1 na camada superficial do epitélio foi intensa em 60% das amostras dos fumantes. Nos indivíduos do grupo controle, essa expressão se distribuiu igualmente entre as categorias discreta e intensa (45,45%). Já a maior parte das amostras do grupo DP apresentou expressão discreta (50%)

de TIMP-1. A análise estatística não encontrou diferenças significativas entre os grupos (GRAF.6).

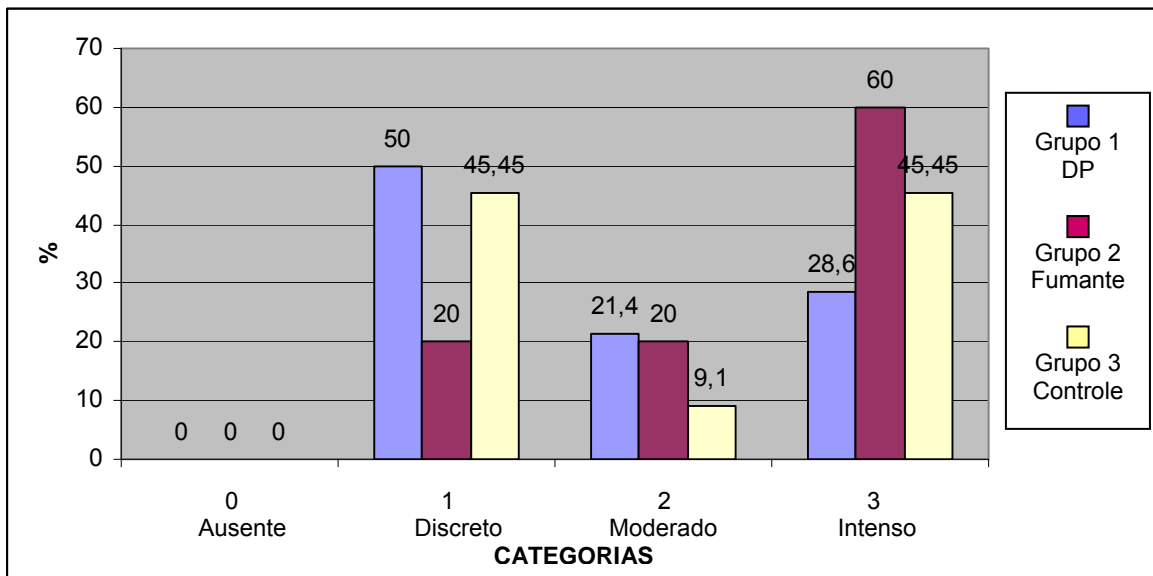


GRÁFICO 6 – Expressão de TIMP-1 na camada superficial do epitélio.

5.3.2 Camada suprabasal do epitélio

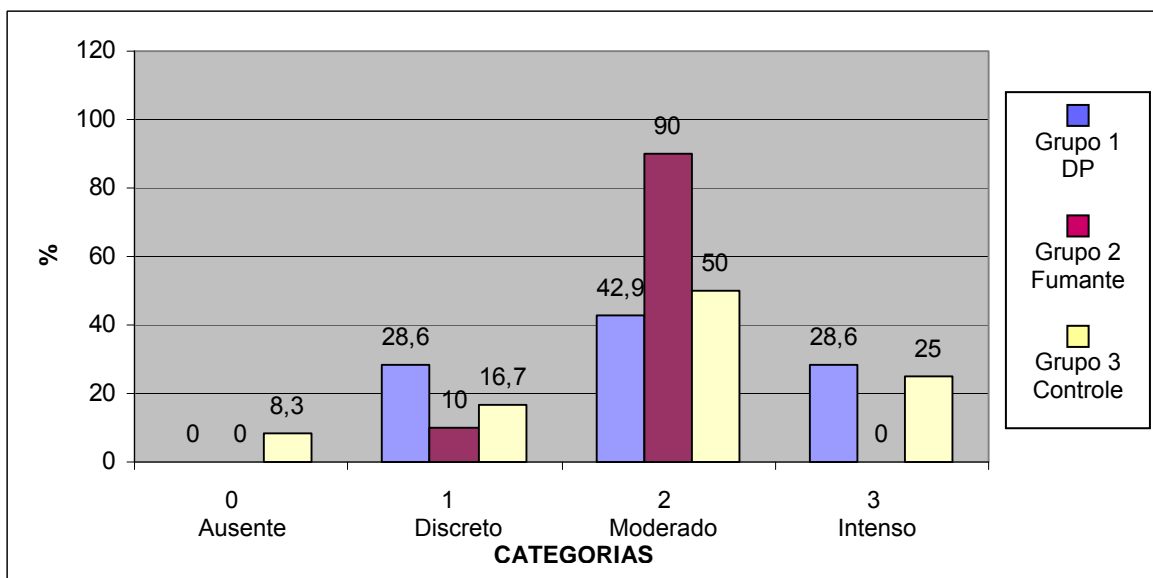


GRÁFICO 7 – Expressão de TIMP-1 na camada suprabasal do epitélio.

Na camada suprabasal do epitélio a imunoexpressão celular das amostras do grupo controle as distribuiu entre as categorias ausente (8,3%), discreta (16,7%), moderada (50%) e intensa (25%). No grupo DP, verificou-se que 28,6% das amostras apresentaram expressão celular discreta, 42,9% moderada e 28,6% intensa. Praticamente todas (90%) as amostras dos fumantes apresentaram expressão celular moderada de TIMP-1. Entretanto, essa expressão elevada de TIMP-1 não apresentou diferença estatística quando comparada com os outros grupos (GRAF.7).

5.3.3 Camada basal do epitélio

Na camada basal do epitélio, 50% das amostras do grupo DP apresentaram expressão intensa e esse foi o único grupo que apresentou amostras (7,1%) sem expressão de TIMP-1. Nos grupos controle e fumantes, 54,5% e 60% das amostras, respectivamente, apresentaram expressão moderada. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos (GRAF.8).

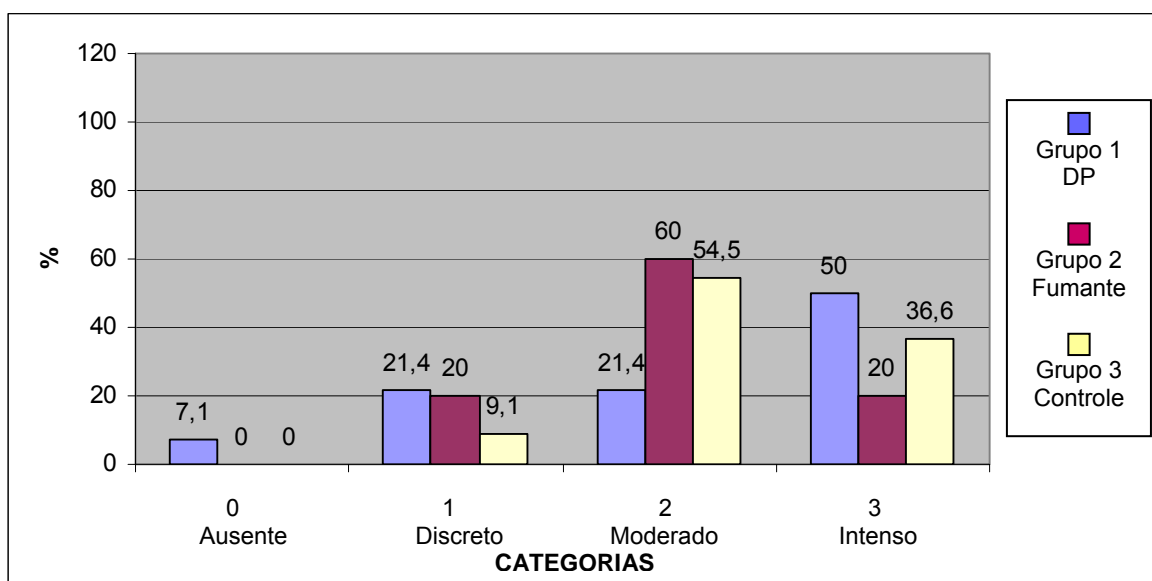


GRÁFICO 8 – Expressão de TIMP-1 na camada basal do epitélio.

5.3.4 Camada superficial do conjuntivo

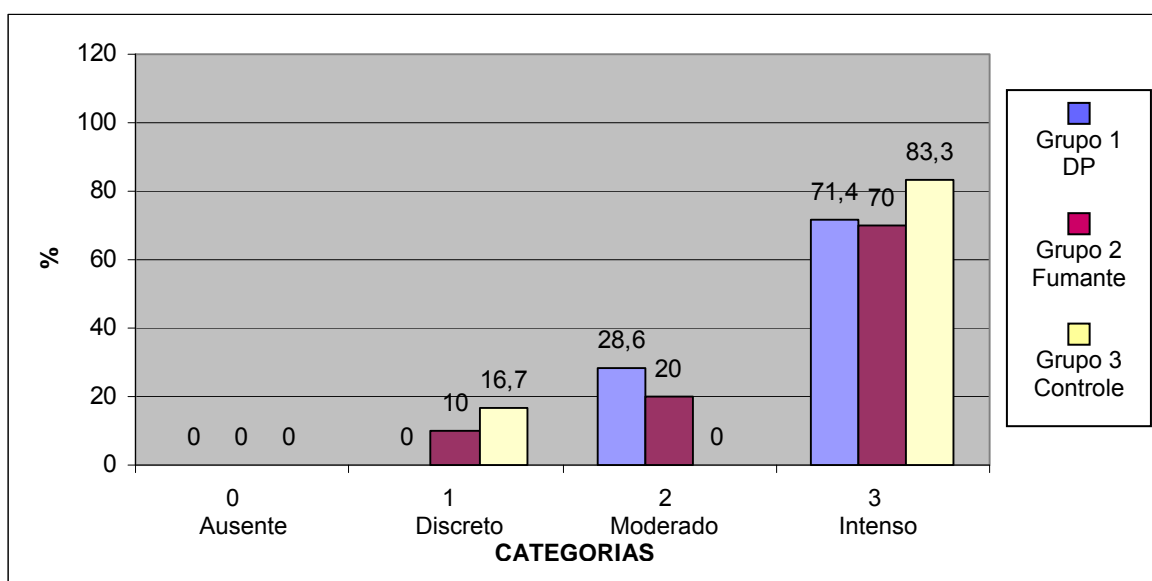


GRÁFICO 9 – Expressão de TIMP-1 na camada superficial do conjuntivo.

Na camada superficial do tecido conjuntivo das amostras dos grupos DP, fumante e controle, prevaleceu a marcação intensa (71,4%, 70% e 83,3%, respectivamente). Apenas o grupo controle não apresentou amostras com expressão celular moderada. Novamente, não houve diferença estatística entre os grupos (GRAF.9).

5.3.5 Camada profunda do conjuntivo

Na porção profunda do tecido conjuntivo, as amostras dos grupos DP, fumante e controle apresentaram o mesmo padrão de expressão, caracterizado pelo predomínio da imunomarcção celular intensa (69,2%, 100% e 90,9%, respectivamente). Não foi verificada diferença estatística entre os grupos (GRAF.10).

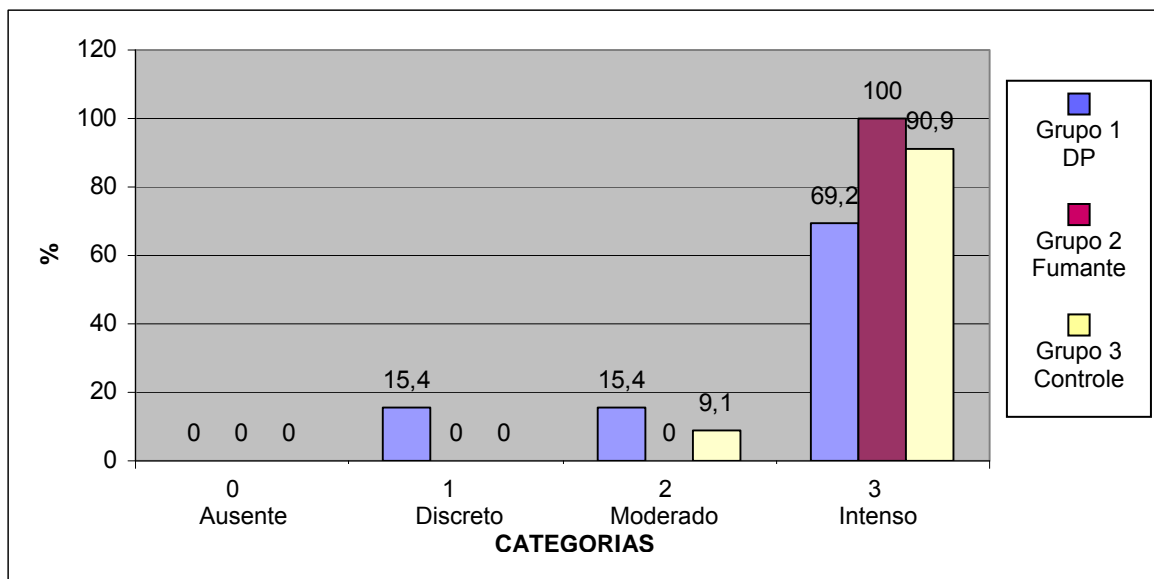


GRÁFICO 10 – Expressão de TIMP-1 na camada profunda do conjuntivo.

Não foi verificada correlação estatisticamente significativa entre a expressão de TIMP-1 e MMP-8 no epitélio e conjuntivo dos indivíduos dos 3 grupos com a distribuição de fibras verdes e vermelhas detectada pelo método picrosírius.

Apenas na camada superficial do epitélio das amostras do grupo controle foi verificada correlação (0,773) estatisticamente significativa ($p=0,005$) entre a expressão de MMP-8 e a expressão de TIMP-1.

6 DISCUSSÃO

A redução dos sinais clínicos da inflamação (vermelhidão gengival e sangramento a sondagem) e o maior comprometimento das estruturas periodontais são características bem definidas e extensivamente estudadas da doença periodontal em fumantes (Calsina, Ramon & Echeverría, 2002; Bergtröm, 2003; Susin et al., 2004). Entretanto, apesar da presença de uma gengiva fibrosa capaz de mascarar os sinais clínicos de inflamação ser uma característica clássica desses indivíduos, não foi encontrado nenhum tipo de estudo que explicasse esse padrão.

A proposta inicial desse estudo foi verificar, por meio do método de coloração picrossírius, se a característica fibrosa do tecido gengival dos fumantes com doença periodontal estaria relacionada a alterações no colágeno gengival.

O método picrossírius demonstrou uma diminuição estatisticamente significativa de cerca de 26% das fibras vermelhas (53,43%) e um aumento das fibras verdes (46,81%) no tecido gengival dos indivíduos portadores de DP quando comparado com as amostras dos indivíduos controle (71,9% e 28,54%, respectivamente). Durante a doença periodontal, a literatura descreve uma diminuição de aproximadamente 4% das fibras do colágeno tipo I e 50% das fibras do colágeno tipo III (Narayanan & Page, 1983). A diminuição de fibras vermelhas, que correspondem ao colágeno tipo I maduro, está de acordo com o padrão verificado na literatura, apesar de ser maior. Entretanto, o aumento das fibras verdes, que correspondem ao colágeno III, discorda. Essas diferenças provavelmente estão relacionadas com a técnica usada pelos trabalhos mais antigos (quantificação por meio do analisador de aminoácidos) e pela inabilidade do método picrossírius em distinguir as fibras de colágeno tipo I em degradação/ formação das fibras de colágeno tipo III em tecidos patológicos (Junqueira, Cossermelli & Bretani, 1978; Junqueira, Bignolas & Bretani, 1979).

Em função disso, a análise da proporção de fibras verdes e vermelhas no tecido gengival dos indivíduos com DP deve ser feita com cautela, já que a

produção e degradação de colágeno são processos freqüentes (Junqueira, Montes & Sanchez, 1982). Nesses tecidos, as fibras de colágeno tipo I em degradação ou deposição podem apresentar menor diâmetro e birrefringência, sendo identificadas com a cor verde após a polarização (Pérez-Tamayo & Montfort, 1980; Cuttle et al., 2005). Portanto, o aumento de fibras verdes não deve ser interpretado como um aumento do colágeno tipo III. Ele reflete melhor um maior *turnover* de fibras do colágeno tipo I que, em função da remodelação, apresentam menor diâmetro e birrefringência, o que reflete na polarização da luz verde.

Verificou-se, ainda, que o tecido gengival dos fumantes com DP apresentou proporção de colágeno tipo I maduro tão elevada (72,2%) quanto os indivíduos controles (71,9%) e ambos significativamente diferentes ($p=0,01$ e $p=0,002$, respectivamente) do grupo DP (53,43%). A proporção de fibras verdes no grupo dos fumantes foi bem pequena (27,98%), e significativamente diferente ($p=0,01$) daquela verificada no grupo DP (46,81%), sendo inclusive bem próxima da proporção de fibras verdes verificada no grupo controle (28,54%), a despeito da presença de periodontite. Esse achado indica a presença de uma alteração no *turnover* do colágeno tipo I nos fumantes com doença periodontal levando ao acúmulo de fibras de colágeno tipo I maduras.

Com objetivo de entender se as alterações no *turnover* de colágeno estariam relacionadas às modificações nas alterações imunoinflamatórias características da doença periodontal, foi realizado um estudo da imunoexpressão de MMP-8, uma das principais metaloproteinases envolvidas na DP, e TIMP-1, seu principal inibidor endógeno.

Tanto MMP-8 quanto TIMP-1 foram imunoexpressas principalmente por células semelhantes a neutrófilos e fibroblastos, mas também observou-se a marcação de células endoteliais e células epiteliais em todos os grupos, de acordo com estudos prévios (Birkedal-Hansen, 1994; Reynold, Hembry & Meikle, 1994; Ryan & Golub, 2000; Lauer-Fields, Juska & Fields, 2002, Visse & Nagase, 2003). A MMP-8 apresentou marcação mais forte e definida nas células semelhantes a neutrófilos, sugerindo que as moléculas de MMP-8 marcadas

estariam concentradas nos grânulos dos neutrófilos. De fato, a MMP-8 é expressa por essas células no estágio de mielócito durante o seu desenvolvimento na medula óssea e fica armazenada na forma latente (pro-MMP-8) em grânulos específicos, até que receba o estímulo para ser liberada (Gueders et al., 2005). Portanto, não ocorre transcrição dessa enzima originada dos PMN (Aiba et al., 1996).

O comportamento dos dados referentes à imunoexpressão de MMP-8 nos fumantes apresentou padrão próximo àquele apresentado pelas amostras do grupo controle, de forma semelhante ao que aconteceu com a distribuição de colágeno. Entretanto, a análise estatística não revelou correlações significativas entre a distribuição de fibras e a expressão de TIMP-1 e MMP-8.

No tecido conjuntivo, verificamos uma marcação elevada de MMP-8, sem diferenças estatísticas entre os fumantes e não-fumantes com DP, discordando dos resultados do estudo de Liu et al. (2006) que também avaliaram a imunoexpressão tecidual de MMP-8. Eles observaram que os fumantes com DP apresentaram imunofluorescência para MMP-8 significativamente maior do que os não-fumantes. Entretanto, a amostra foi composta por apenas 6 indivíduos em cada grupo e não foi avaliada a expressão de MMP-8 em um grupo controle.

Liede et al. (1999) verificaram níveis de MMP-8 significativamente mais altos em ex fumantes do que em fumantes. Dentre as diferenças entre a expressão tecidual e os níveis de diversas moléculas no FGC, é importante destacar que, enquanto a coleta de amostras do fluido pode ser feita em qualquer etapa do tratamento, a coleta de fragmentos de tecidos para imunoistoquímica é feita durante a fase cirúrgica do tratamento periodontal e, conseqüentemente, logo após a terapia periodontal inicial.

De fato, estudos que avaliaram, após a terapia periodontal, os níveis de MMP-8 no FGC de indivíduos com periodontite crônica, fumantes e não-fumantes, não verificaram diferenças estatísticas entre os grupos (Söder, Jin & Wickholm, 2002; Kurtis et al, 2007).

A ausência de diferenças estatísticas nos níveis de MMP-8 entre os indivíduos com DP e controles é uma tendência também verificada por outros estudos que constataram que, após o tratamento os níveis das MMP's, tendem a se aproximar daqueles apresentados pelos controles saudáveis (Lauer-Fields, Juska & Fields, 2002; Tüter et al., 2005).

A expressão de MMP-8 foi, também, predominantemente intensa nos 3 grupos, fato explicado pelo comportamento biológico dessa enzima. A MMP-8 originada dos neutrófilos responde por cerca de 90-95% da atividade colagenolítica no FGC e fluido perimplantar de indivíduos com periodontite do adulto e perimplantite (Sorsa, 1999). Uma vez ativado por mediadores pro-inflamatórios, os PMN humanos liberam apenas cerca de 15 a 20% do seu conteúdo (60 ng/10⁶ células), exclusivamente sob a forma latente (Owen, 2004), segundos após o estímulo e a resposta dura apenas alguns minutos (Birkedal-Hansen, 1993). Esse padrão leva a crer que a imunomarcaçã constatada nos três grupos provavelmente, refere-se, na sua maioria, à forma latente de MMP-8 que não foi liberada dos grânulos dos neutrófilos ou à imunomarcaçã de fibroblastos associados a renovaçã tecidual normal, cuja ativaçã leva de 6-12 h e a resposta dura dias.

O desenvolvimento de tolerância pelos fibroblastos humanos em cultura com altos níveis de nicotina (Checchi et al., 1999) e a diminuiçã da clivagem de colágeno nessa mesma situaçã (Zhou, Olson & Windsor, 2007) poderiam justificar o acúmulo de fibras de colágeno tipo I nos fumantes.

Outra hipótese seria a associaçã da depleçã de tiol com uma diminuiçã da ativaçã da pro-MMP-8 nos fumantes. O tiol é uma das vias capazes de ativar a forma latente das MMP's (Birkedal-Hansen, 1993; Lauer-Fields, Juska & Fields, 2002). E outros estudos já hipotetizaram que a depleçã de tiol poderia ser o mecanismo de citotoxicidade da nicotina aos fibroblastos do ligamento periodontal.

Nas camadas epiteliais, o padrão de comportamento dos dados do grupo dos fumantes e controles foi semelhante, destacando-se pelo predomíno da

expressão moderada/intensa, enquanto o grupo DP destacou-se pela expressão leve/moderada. Foi verificada diferença estatisticamente significativa na imunexpressão de MMP-8 na camada superficial do epitélio de indivíduos fumante, quando comparado com DP. Essa elevada expressão de MMP-8 no epitélio não foi encontrada nos estudos de Borsani et al. (2005) e Liu et al. (2006) que observaram maior expressão de MMP-8 no tecido conjuntivo.

Birkedal-Hansen (1993) afirmou que a proximidade da placa microbiana viável cria uma oportunidade inigualável para o efeito transcricional direto dos metabólitos microbianos nas células gengivais e periodontais. Assim, os indícios de uma maior prevalência de espécies do complexo laranja (*E. nodatum*, *F. nucleatum ss*, *P. intermedia*, *P. micros*, e *P. nigrescens*) e vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*) em fumantes comparado com não-fumantes e ex-fumantes (Haffajee & Socransky, 2001), e os níveis elevados de MMP-8 no FGC, associado à presença desses microrganismos (Söder et al., 2006), constituem fortes evidências para explicar a expressão elevada de MMP-8 na camada superficial do epitélio dos fumantes, verificada nesse estudo. Essa associação da expressão de MMP-8 com microrganismos patogênicos parece também estar relacionada à formação da bolsa periodontal, cuja origem tem sido atribuída a uma perda de continuidade na porção mais coronal do epitélio juncional e ao espalhamento subgengival de bactérias sob condições de defesa prejudicadas (Bosshardt & Lang, 2005).

O contraste entre a imunomarcacão leve/moderada na camada basal do epitélio do grupo DP e a imunomarcacão moderada/intensa nos grupos fumante e controle parece ter duas explicações plausíveis. A expressão de MMP-8 poderia estar associada à sua atividade anti-inflamatória: nos fumantes e controles o predomínio da expressão moderada/ intensa de MMP-8 seria capaz de controlar adequadamente a apoptose de células inflamatórias, enquanto a expressão leve e moderada das amostras do grupo DP estaria associada a sua diminuição. O maior afluxo de neutrófilos no epitélio é considerado um contribuinte para a desintegração focal do epitélio juncional e,

conseqüentemente o aumento da permeabilidade epitelial (Bosshardt & Lang, 2005).

Essa hipótese se baseia nos resultados do estudo de Gueders et al. (2005) que demonstrou que a apoptose de células inflamatórias (neutrófilos e eosinófilos) em camundongos *knockout* para MMP-8 foi reduzida, na inflamação induzida por alérgenos nos pulmões.

Supõe-se, ainda, que a expressão leve/moderada de MMP-8 na camada basal do epitélio dos fumantes pode refletir apenas a atividade elevada de outras moléculas, como a MMP-9, cuja presença em indivíduos com periodontite tem sido associada especialmente à imunomarcagem na camada basal do epitélio (Bondineau et al., 2006). Essa gelatinase tem, como substrato, componentes da membrana basal como colágeno tipo IV e laminina, podendo contribuir para a degradação do epitélio e aumento de sua permeabilidade (Pöllänen, Salonen & Uitto, 2003).

Tem sido bem aceito na literatura que a homeostase do tecido depende do equilíbrio entre MMP e TIMP (Birkedal-Hansen, 1993; Ryan & Golub, 2000); entretanto, não encontramos descrição do que seria este equilíbrio.

Nesse estudo, verificou-se que a expressão de TIMP-1 foi fraca, concordando com Borsani et al. (2005); entretanto, ocorreu marcação celular no epitélio e conjuntivo, o que discorda desses autores que verificaram marcação apenas no conjuntivo.

A maioria das amostras dos três grupos apresentou expressão intensa de TIMP-1 no tecido conjuntivo sugerindo uma tentativa de equilibrar a expressão intensa de MMP-8. Apesar de Meickle et al. (1994) terem observado expressão elevada de TIMP-1 apenas nos sítios com remodelação tecidual, nossos dados estão de acordo com os achados de Aiba et al. (1996), que não encontraram diferenças na expressão de TIMP-1 no tecido conjuntivo de indivíduos com inflamação gengival e controles.

A literatura parece apresentar um consenso no que se refere aos níveis dessa enzima no FGC. Enquanto os níveis de TIMP-1 foram mais elevados nos indivíduos com DP e gengivite do que nos controles (Nomura et al., 1998; Emingil et al., 2006), Pozo et al. (2005) verificaram que, após o tratamento os níveis de TIMP-1 no FGC de indivíduos com DP caíram, alcançando valores próximos àqueles encontrados nos controles. Esse padrão verificado no fluido é coerente com os nossos dados de expressão tecidual de TIMP-1.

A análise da expressão de TIMP-1 no epitélio não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos. Entretanto, nos fumantes, observa-se um predomínio da marcação moderada/intensa em todas as camadas epiteliais. Além do efeito antiapoptótico, a TIMP-1 também tem sido associada à proliferação celular (Visse & Nagase, 2003; Uitto, Overall & McCulloch, 2003). Esses achados sugerem o papel da TIMP-1 no espessamento da base epitelial dos fumantes, já verificado por outros estudos (Villar & Lima, 2003).

Nas amostras do grupo DP e controle, a expressão de TIMP-1 foi mais dispersa entre as categorias e, apenas nas amostras do grupo controle a expressão superficial de TIMP-1 apresentou correlação positiva significativa ($p=0,005$) com a expressão superficial de MMP-8, sugerindo uma tendência ao equilíbrio.

Os inibidores de MMP desempenham papel extremamente importante na manutenção da homeostase dos tecidos, por regularem a atividade das MMP's, apresentarem atividade antiapoptótica, que pode evitar o esvaziamento dos grânulos dos PMN que estão se desintegrando, promoverem o crescimento de vários tipos celulares, além de estimularem os fibroblastos a produzirem MMP-1, metaloproteinase envolvida na remodelação tecidual normal (Bodden et al., 1994, Kiili et al., 2002, Visse & Nagase, 2003, Uitto, Overall & McCulloch, 2003). Esse conjunto de funções desempenhados por TIMP's justificam sua expressão e, conseqüentemente, atividade elevada no tecido gengival independente do padrão de saúde/doença.

Em resumo, o equilíbrio entre MMP e TIMP é variável nos processos fisiológicos e condições patológicas. A coexpressão de TIMP's e MMP's depende de uma regulação recíproca influenciada por fatores de crescimento e citocinas expressos endogenamente, cuja complexidade dificulta seu entendimento (Verstappen & Von den Hoff, 2006).

Os resultados deste estudo comprovaram que o tabagismo realmente provoca alterações no *turnover* de colágeno, justificando o aspecto fibroso do tecido gengival dos fumantes com periodontite crônica. Entretanto, a ausência de associação das alterações de colágeno com a imunoexpressão tecidual de MMP-8 e TIMP-1 verificada, e a complexidade de moléculas e respostas imunoinflamatórias envolvidas na progressão da doença periodontal, indicam a necessidade de se estudar várias MMP's simultaneamente, destacando a presença da forma ativa, já que ela reflete melhor a progressão temporal da lesão do que a quantidade total da enzima (Uitto, Overall & McCulloch, 2003).

7 CONCLUSÕES

O tecido gengival dos fumantes com DP apresentou proporção de colágeno tipo I maduro semelhante aos indivíduos controles, e significativamente maior do que o grupo DP.

O tecido gengival dos fumantes com DP apresentou proporção de fibras colágenas verdes semelhante aos indivíduos controles, e significativamente menor do que o grupo DP.

O tabagismo provoca alterações no *turnover* de colágeno, justificando o aspecto fibroso do tecido gengival dos fumantes com periodontite crônica.

As amostras de tecido gengival dos grupos controle, DP e fumantes apresentam predomínio de expressão intensa de MMP-8 e TIMP-1 nos tecidos conjuntivo e epitelial.

A expressão de MMP-8 na camada superficial do epitélio dos fumantes foi estatisticamente diferente daquela verificada no grupo DP, sugerindo uma associação com os efeitos do tabagismo no curso da doença periodontal.

A expressão de MMP-8 apresentou correlação estatística com a expressão de TIMP-1 na camada superficial do epitélio das amostras do grupo controle, indicando uma tendência ao equilíbrio dessas moléculas na ausência de doença.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aiba T, Akeno N, Kawane T, Okamoto H, Horiuchi N. Matrix metalloproteinases-1 and -8 and TIMP-1 mRNA levels in normal and diseased human gingivae. *Eur J Oral Sci.* 1996 Oct-Dec;104(5-6):562-9.

Albandar JM, Streckfus CF, Adesanya MR, Winn DM. Cigar, pipe, and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *J Periodontol.* 2000; 71(12):1874-81.

Amarasena N, Ekanayaka AN, Herath L, Miyazaki H. Tobacco use and oral hygiene as risk indicators for periodontitis. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2002; 30(2):115-23.

Arbes SJJr, Augustsdottir H, Slade GD. Environmental Tobacco smoke and periodontal disease in the United States. *Am J Public Health.* 2001; 91:253-7.

Avellan NL, Kempainen P, Tervahartiala T, Vilppola P, Forster C, Sorsa T. Capsaicin-induced local elevations in collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8) levels in human gingival crevice fluid. *J Periodontal Res.* 2006 Feb;41(1):33-8.

Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 2002 Oct 1;115(Pt 19):3719-27.

Balbín M, Fueyo A, Tester AM, Pendás AM, Pitiot AS, Astudillo A, Overall CM, Shapiro SD, López-Otín C. Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nat Genet.* 2003 Nov;35(3):252-7.

Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissue. *Periodontol 2000.* 2006; 40:29-49.

Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingival. *Periodontol 2000.* 2000; 24:28-55.

Becker J, Schuppan D, Müller S. Immunohistochemical distribution of collagens type I, III, IV and VI, of undulin and of tenascin in oral fibrous hyperplasia. *J Oral Pathol Med.* 1993 Nov;22(10):463-7.

Bergström J. Tobacco smoking and risk for periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2003; 30(2):107-13.

Bergström J. Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology.* 2004; 92(1):1-8.

Biddle AJ, Palmer RM, Wilson RF, Watts TL. Comparison of the validity of periodontal probing measurements in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol.* 2001; 28(8):806-12.

Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol.* 1993 May;64(5 Suppl):474-84.

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4(2):197-250.

Bodden MK, Harber GJ, Birkedal-Hansen B, Windsor LJ, Caterina NC, Engler JA, Birkedal-Hansen H. Functional domains of human TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases). *J Biol Chem.* 1994 Jul 22;269(29):18943-52.

Bodineau A, Godeau G, Brousse N, Pellat B, Folliguet M, Séguier S. Langerhans cells express matrix metalloproteinases 9 and 2 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in healthy human gingival tissue and in periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2006 Jun;21(3):197-200.

Borsani E, Salgarello S, Mensi M, Boninsegna R, Stacchiotti A, Rezzani R, Sapelli P, Bianchi R, Rodella LF. Histochemical and immunohistochemical evaluation of gingival collagen and metalloproteinases in peri-implantitis. *Acta Histochem.* 2005;107(3):231-40.

Bosco AF, Bonfante S, de Almeida JM, Luize DS, Nagata MJ, Garcia VG.A histologic and histometric assessment of the influence of nicotine on alveolar bone loss in rats. *J Periodontol.* 2007 Mar;78(3):527-32.

Bosshardt DD, Lang NP. The junctional epithelium: from health to disease. *J Dent Res.* 2005 Jan;84(1):9-20.

Boström L, Linder LE, Bergström J. Smoking and crevicular fluid levels of IL-6 and TNF α in periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1999; 26: 352-7.

Buduneli E, Vardar-Sengül S, Buduneli N, Atilla G, Wahlgren J, Sorsa T. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and laminin-5 gamma2 chain immunolocalization in gingival tissue of endotoxin-induced periodontitis in rats: effects of low-dose doxycycline and alendronate. *J Periodontol.* 2007 Jan;78(1):127-34.

Calsina G, Ramon JM, Echeverria JJ. Effects of smoking on periodontal tissues. *J Clin Periodontol.* 2002; 29(8):771-6.

Cattaneo V, Cetta G, Rota C, Vezzoni F, Rota MT, Gallanti A, Boratto R, Poggi P. Volatile components of cigarette smoke: effect of acrolein and acetaldehyde on human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol.* 2000 Mar;71(3):425-32.

Cesar 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 Jul;75(7):995-1000.

Chang YC, Huang FM, Tai KW, Yang LC, Chou MY. Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro. *J Periodontal Res.* 2002; 37(4):279-85.

Chavrier C, Couble ML. Immunohistochemical study of types I, III and IV collagen in diseased human gingiva of patients with rapidly progressive periodontitis: a light and electron microscopic study. *Cell Mol Biol.* 1989;35(4):457-67.

Chavrier C, Couble ML, Magloire H, Grimaud JA. Connective tissue organization of healthy human gingiva. Ultrastructural localization of collagen types I-III-IV. *J Periodontol Res.* 1984 May;19(3):221-9.

Checchi L, Ciapetti G, Monaco G, Ori G. The effects of nicotine and age on replication and viability of human gingival fibroblasts in vitro. *J Clin Periodontol.* 1999; 26: 636-42.

Cuttle L, Nataatmadja M, Fraser JF, Kempf M, Kimble RM, Hayes MT. Collagen in the scarless fetal skin wound: detection with picosirius-polarization. *Wound Repair Regen.* 2005 Mar-Apr;13(2):198-204.

Emingil G, Tervahartiala T, Mäntylä P, Määttä M, Sorsa T, Atilla G. Gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase (MMP)-7, extracellular MMP inducer, and tissue inhibitor of MMP-1 levels in periodontal disease. *J Periodontol.* 2006

Figueredo CM, Areas A, Miranda LA, Fischer RG, Gustafsson A. The short-term effectiveness of non-surgical treatment in reducing protease activity in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2004 Aug;31(8):615-9.

Gagliano N, Moscheni C, Dellavia C, Masiero S, Torri C, Grizzi F, Stabellini G, Gioia M. Morphological and molecular analysis of idiopathic gingival fibromatosis: a case report. *J Clin Periodontol.* 2005 Oct;32(10):1116-21.

Gamal AY, Bayomy MM. Effect of cigarette smoking on human PDL fibroblasts attachment to periodontally involved root surfaces in vitro. *J Clin Periodontol.* 2002; 29(8):763-70.

Giannopoulou C, Kamma JJ, Mombelli A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 145-53.

Giannopoulou C, Roehrich N, Mombelli A. Effect of nicotine-treated epithelial cells on the proliferation and collagen production of gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol.* 2001 Aug;28(8):769-75.

Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, Norderyd OM, Genco RJ. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol.* 1994 Mar;65(3):260-7.

Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford R, Zambon JJ, Hausmann E. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol.* 1995 Jan;66(1):23-9.

Grossi SG, Zambon J, Machtei EE, Schifferle R, Andreana S, Genco RJ, Cumins D, Harrap G. Effects of smoking and smoking cessation on healing after mechanical periodontal therapy. *JADA.* 1997; 128: 599-607.

Gueders MM, Balbin M, Rocks N, Foidart JM, Gosset P, Louis R, Shapiro S, Lopez-Otin C, Noël A, Cataldo DD. Matrix metalloproteinase-8 deficiency promotes granulocytic allergen-induced airway inflammation. *J Immunol.* 2005 Aug 15;175(4):2589-97.

Güntsch A, Erler M, Preshaw PM, Sigusch BW, Klinger G, Glockmann E. Effect of smoking on crevicular polymorphonuclear neutrophil function in periodontally healthy subjects. *J Periodontal Res.* 2006 Jun;41(3):184-8.

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

Halinen S, Sorsa T, Ding Y, Ingman T, Salo T, Konttinen YT, Saari H. Characterization of matrix metalloproteinase (MMP-8 and -9) activities in the saliva and in gingival crevicular fluid of children with Down's syndrome. *J Periodontol.* 1996 Aug;67(8):748-54.

Hammouda O, Seif M Sr, Brinkley B, Dabbous MK, Jurand J. Gingival matrix collagen in chronic periodontitis. *J Dent Res.* 1980 Jan;59(1):17-22.

Hart, T.C.; Kornman, K.S. Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000, v. 14, p. 202-215, 1997.

Hayakawa T. Tissue inhibitors of metalloproteinases and their cell growth-promoting activity. *Cell Struct Funct.* 1994 Jun;19(3):109-14.

Heasman L, Stacey F, Preshaw PM, McCracken GI, Hepburn S, Heasman PA. The effect of smoking on periodontal treatment response: a review of clinical evidence. *J Clin Periodontol.* 2006 Apr;33(4):241-53.

Henney AM, Ye S, Zhang B, Jormsjo S, Whatling C, Eriksson P, Hamsten A. Genetic diversity in the matrix metalloproteinase family. Effects on function and disease progression. *Ann N Y Acad Sci.* 2000 May;902:27-37; discussion 37-8.

Hillmann G, Dogan S, Geurtsen W. Histopathological investigation of gingival tissue from patients with rapidly progressive periodontitis. *J Periodontol.* 1998 Feb;69(2):195-208.

Hillmann G, Krause S, Ozdemir A, Dogan S, Geurtsen W. Immunohistological and morphometric analysis of inflammatory cells in rapidly progressive periodontitis and adult periodontitis. *Clin Oral Investig.* 2001; 5(4):227-35.

Hornebeck W. Down-regulation of tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1 (TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival. *Pathol Biol.* 2003 Dec;51(10):569-73.

Jonhson GK, Slach NA. Impact of tobacco use on periodontal status. *J Dent Educ.* 2001;65 (4): 313-18.

Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979 Jul;11(4):447-55.

Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn.* 1978 Jun;41(3):267-74.

Junqueira LC, Montes GS. Biology of collagen-proteoglycan interaction. *Arch Histol Jpn.* 1983 Dec;46(5):589-629.

Junqueira LC, Montes GS, Sanchez EM. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. *Histochemistry*. 1982;74(1):153-6.

Kerrigan JJ, Mansell JP, Sandy JR. Matrix turnover. *J Orthod*. 2000 Sep;27(3):227-33.

Kiili M, Cox SW, Chen HY, Wahlgren J, Maisi P, Eley BM, Salo T, Sorsa T. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. *J Clin Periodontol*. 2002; 29:224-32.

Kinane, D.F. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*, v. 25, p. 8-20, 2001.

Kinane DF, Darby IB, Said S, Luoto H, Sorsa T, Tikanoja S, Mäntylä P. Changes in gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels during periodontal treatment and maintenance. *J Periodontal Res*. 2003 Aug;38(4):400-4.

Kinane DF, Peterson M, Stathoupolou PG. Environmental and other modifying factors of the periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2006; 40: 107–119

Kivelä-Rajamäki MJ, Teronen OP, Maisi P, Husa V, Tervahartiala TI, Pirilä EM, Salo TA, Mellanen L, Sorsa TA. Laminin-5 gamma2-chain and collagenase-2 (MMP-8) in human peri-implant sulcular fluid. *Clin Oral Implants Res*. 2003 Apr;14(2):158-65.

Knuutien A, Kokkonen N, Risteli J, Vahakangas K, Kallioinen M, Salo T, Sorsa T, Oikarinen A. Smoking affects collagen synthesis and extracellular matrix turnover in human skin. *Br J Dermatol*. 2002; 146 (4):588-94.

Krall JH, Chancellor MB, Bridges RB, Bemis KG, Kawke JE. Variations in the gingival polymorphonuclear leukocyte migration rate in dogs induced by chemotactic autologous serum and migration inhibitor from tobacco smoke. *J Periodontal Res*. 1977; 12:242-9.

Krall EA, Garvey AJ, Garcia RI. Alveolar bone loss and tooth loss in male cigar and pipe smokers. *J Am Dent Assoc.* 1999; 130(1):57-64.

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

Kurtis B, Tüter G, Serdar M, Pinar S, Demirel I, Toyman U. GCF MMP-8 levels in smokers and non-smokers with chronic periodontitis following scaling and root planing accompanied by systemic use of flurbiprofen. *J Periodontol.* 2007 Oct;78(10):1954-61.

Labriola A, Needleman I, Moles DR. Systematic review of the effect of smoking on nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 2005;37:124-37.

Lauer-Fields JL, Juska D, Fields GB. Matrix metalloproteinases and collagen catabolism. *Biopolymers.* 2002;66(1):19-32.

Lie MA, van der Weijden GA, Timmerman MF, Loos BG, van Steenberghe TJ, van der Velden U. Oral microbiota in smokers and non-smokers in natural and experimentally-induced gingivitis. *J Clin Periodontol.* 1998 Aug;25(8):677-86.

Liede KE, Haukka JK, Hietanen JH, Manttila MH, Ronka H, Sorsa T. The association between smoking cessation and periodontal status and salivary proteinase levels. *J Periodontol.* 1999; 70 (11): 1361-8.

Liu KZ, Hynes A, Man A, Alsagheer A, Singer DL, Scott DA. Increased local matrix metalloproteinase-8 expression in the periodontal connective tissues of smokers with periodontal disease. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1762(8):775-80.

Machuca G, Rosales I, Lacalle JR, Machuca C, Bullon P. Effect of cigarette smoking on periodontal status of healthy young adults. *J Periodontol.* 2000; 71(1):73-8.

Machtei EE, Christersson LA, Grossi SG, Dunford R, Zambon JJ, Genco RJ. Clinical criteria for the definition of "established periodontitis". *J Periodontol*. 1992 Mar;63(3):206-14.

Mariotti A. The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissue. *Periodontol 2000*. 1993; 3: 39-63.

Meikle MC, Hembry RM, Holley J, Horton C, McFarlane CG, Reynolds JJ. Immunolocalization of matrix metalloproteinases and TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases) in human gingival tissues from periodontitis patients. *J Periodontal Res*. 1994 Mar;29(2):118-26.

Mirbod SM, Ahing SI, Pruthi VK. Immunohistochemical study of vestibular gingival blood vessel density and internal circumference in smokers and non-smokers. *J Periodontol*. 2001 Oct;72(10):1318-23.

Müller HP, Stadermann S, Heinecke A. Longitudinal association between plaque and gingival bleeding in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol*. 2002 Apr;29(4):287-94.

Mullally BH, Linden GJ. Molar furcation involvement associated with cigarette smoking in periodontal referrals. *J Clin Periodontol*. 1996; 23:658-61.

Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999 Jul 30;274(31):21491-4.

Narayanan AS, Clagett JA, Page, RC. Effect of inflammation on the distribution of collagen types, I, III, IV, and V and type I trimer and fibronectin in human gingivae. *J Dent Res*. 1985 Sep; 64 (9): 1111-1116.

Narayanan AS, Engel LD, Page RC. The effect of chronic inflammation on the composition of collagen types in human connective tissue. *Coll Relat Res*. 1983 Jul;3(4):323-34.

Narayanan AS, Hassell TM. Characterization of collagens in phenytoin-enlarged human gingiva. *Coll Relat Res*. 1985; 5(6):513-8.

Narayanan AS, Page RC. Connective tissues of the periodontium: a summary of current work. *Coll Relat Res*. 1983;3(1):33-64.

Narayanan AS, Page RC. Synthesis of type V collagen by fibroblasts derived from normal, inflamed and hyperplastic human connective tissues. *Coll Relat Res*. 1985 Sep;5(4):297-304.

Nishida N, Yamamoto Y, Tanaka M, Maeda K, Kataoka K, Nakayama K, Morimoto K, Shizukuishi S. Association between passive smoking and salivary markers related to periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2006; 33(10):717-23. .

Nomura T, Ishii A, Oishi Y, Kohma H, Hara K. Tissue inhibitors of metalloproteinases level and collagenase activity in gingival crevicular fluid: the relevance to periodontal diseases. *Oral Dis*. 1998 Dec;4(4):231-40.

Nunn, Martha E. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontol 2000*, 2003; 32: 11-23,

Organização Mundial de Saúde. Report on the Global Tobacco Epidemic 2008. http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower_report_full_2008.pdf (acessado em 3/Jun/2008).

Overall CM, Wiebkin OW, Thonard JC. Demonstration of tissue collagenase activity in vivo and its relationship to inflammation severity in human gingiva. *J Periodontal Res*. 1987 Mar;22(2):81-8.

Owen CA, Hu Z, Lopez-Otin C, Shapiro SD. Membrane-bound matrix metalloproteinase-8 on activated polymorphonuclear cells is a potent, tissue inhibitor of metalloproteinase-resistant collagenase and serpinase. *J Immunol*. 2004 Jun 15;172(12):7791-803.

Page, R.C, *et al*. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*, v. 14, 216-248, 1997.

Page RC, Eke PI. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol*. 2007 Jul;78(7 Suppl):1387-99.

Page, R.C.; Kornman, K.S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*, v. 14, p. 9-11, 1997.

Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*. 1976; 33: 235-42.

Page RC, Schroeder HE. *Periodontal Disease*. 1a ed. 1990. Cap. 7: Structure and Pathogenesis, p.183-262.

Palmer RM, Scott DA, Meekin TN, Poston RN, Odell EW, Wilson RF. Potential mechanisms of susceptibility to periodontitis in tobacco smokers. *J Periodont Res*. 1999; 34: 363-9.

Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors-tobacco smoking. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6:180-95.

Pauletto NC, Liede K, Nieminen A, Larjava H, Uitto, VJ. Effect of cigarette smoking on oral elastase activity in adult periodontitis patients. *J Periodontol*. 2000; 71:58-62.

Pérez-Tamayo R, Montfort I. The susceptibility of hepatic collagen to homologous collagenase in human and experimental cirrhosis of the liver. *Am J Pathol*. 1980 Aug;100(2):427-42.

Pöllänen MT, Salonen JI, Uitto VJ. Structure and function of the tooth-epithelial interface in health and disease. *Periodontol 2000*. 2003;31:12-31.

Pozo P, Valenzuela MA, Melej C, Zaldivar M, Puente J, Martinez B, Gamonal J. Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Periodontal Res*. 2005; 40(3):199-207.

Preber H, Bergström J, Linder LE. Occurrence of periopathogens in smoker and non-smoker patients. *J Clin Periodontol.* 1992 Oct;19(9 Pt 1):667-71.

Rabanus JP, Gelderblom HR, Schuppan D, Becker J. Distribution of collagen type V and VI in the normal human alveolar mucosa: an immunoelectronmicroscopic study using ultrathin frozen sections. *J Periodontal Res.* 1991 May;26(3 Pt 1):138-43.

Rai B, Kharb S, Jain R, Anand SC. Biomarkers of periodontitis in oral fluids. *J Oral Sci.* 2008 Mar;50(1):53-6.

Reiner a, Neumeister B, Spona J, Reiner G, Schemp M, Jakesz R. Immunocytochemical Localization of Estrogen and Progesterone Receptor and Prognosis in Human Primary Breast Cancer. *Cancer Res.* 1990. Nov;50 (1): 7057-61.

Reynolds JJ, Hembry RM, Meikle MC Connective tissue degradation in health and periodontal disease and the roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors. *Adv Dent Res.* 1994 Jul;8(2):312-9.

Rivera-Hidalgo F. Smoking and periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2003;32:50-8.

Romanos G, Schröter-Kermani C, Hinz N, Bernimoulin JP. Immunohistochemical distribution of the collagen types IV, V, VI and glycoprotein laminin in the healthy rat, marmoset (*Callithrix jacchus*) and human gingivae. *Matrix.* 1991 Apr;11(2):125-32.

Romanos GE, Schröter-Kermani C, Hinz N, Herrmann D, Strub JR, Bernimoulin JP. Extracellular matrix analysis of nifedipine-induced gingival overgrowth: immunohistochemical distribution of different collagen types as well as the glycoprotein fibronectin. *J Periodontal Res.* 1993 Jan;28(1):10-6.

Romanos GE, Strub JR, Bernimoulin JP. Immunohistochemical distribution of extracellular matrix proteins as a diagnostic parameter in healthy and diseased gingiva. *J Periodontol.* 1993 Feb;64(2):110-9.

Ryan ME, Golub LM. Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy. *Periodontol 2000*. 2000 Oct;24:226-38. Review.

Ryder MI. The influence of smoking on host responses in periodontal infections. *Periodontol 2000*. 2007;43:267-77.

Ryder MI, Wu TC, Kallaos SS, Hyun W. Alterations of neutrophil f-actin kinetics by tobacco smoke: implications for periodontal diseases. *J Periodontal Res*. 2002; 37(4):286-92.

Sakagami G, Sato E, Sugita Y, Kosaka T, Kubo K, Maeda H, Kameyama Y. Effects of nifedipine and interleukin-1alpha on the expression of collagen, matrix metalloproteinase-1, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*. 2006 Aug;41(4):266-72.

Scott DA, Palmer RM, Stapleton JA. Validation of smoking status in clinical research into inflammatory periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2001; 28(8):715-22.

Séguier S, Godeau G, Leborgne M, Pivert G, Brousse N. Quantitative morphological analysis of Langerhans cells in healthy and diseased human gingiva. *Arch Oral Biol*. 2000 Dec;45(12):1073-81.

Seguier S, Gogly B, Bodineau A, Godeau G, Brousse N. Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue? *J Periodontol*. 2001 Oct;72(10):1398-406.

Seguier S, Godeau G, Brousse N. Collagen fibers and inflammatory cells in healthy and diseased human gingival tissues: a comparative and quantitative study by immunohistochemistry and automated image analysis. *J Periodontol*. 2000 Jul;71(7):1079-85.

Sham ASK, Cheung LK, Jin IJ, Corbet EF. The effects of tobacco use on oral health. *Hong Kong Med J*. 2003; 9: 271-7.

Sigma-Aldrich [online]. Sigma-Aldrich, 2008 [citado em 12/ Mai/2008]. Disponível na internet: [http:// www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

Snyder HB, Caughman G, Lewis J, Billman MA, Schuster G. Nicotine modulation of in vitro human gingival fibroblast beta1 integrin expression. J Periodontol. 2002 May;73(5):505-10.

Soder B, Airila Mansson S, Soder PO, Kari K, Meurman J. Levels of matrix metalloproteinases-8 and -9 with simultaneous presence of periodontal pathogens in gingival crevicular fluid as well as matrix metalloproteinase-9 and cholesterol in blood. J Periodontal Res. 2006 Oct;41(5):411-7.

Soder B, Jin LJ, Wickholm S. Granulocyte elastase, matrix Metalloproteinase-8 and prostaglandin E2 in gingival crevicular fluid in matched clinical sites in smokers and non-smokers with persistent periodontitis. J Clin Periodontol. 2002 May;29(5):384-91.

Sönmez S, Canda T, Ozkara E, Ak D. Quantitative evaluation of the vasculature and fibronectin localization in gingival connective tissue of smokers and non-smokers. J Periodontol. 2003 Jun;74(6):822-30.

Sorsa T, Mantyla P, Ronka H, Kallio P, Kallis GB, Lundqvist C, Kinane DF, Salo T, Golub LM, Teronen O, Tikanoja S. Scientific basis of a matrix metalloproteinase-8 specific chair-side test for monitoring periodontal and peri-implant health and disease. Ann N Y Acad Sci. 1999 Jun 30;878:130-40. .

Sorsa T, Tjaderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, Golub LM, Brown DL, Mantyla P. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. Ann Med. 2006;38(5):306-21.

Stoltenberg JL, Osborn JB, Pihlstrom BL, Herzberg MC, Aeppli DM, Wolff LF, Fischer GE. Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status. J Periodontol. 1993 Dec;64(12):1225-30.

Susin C, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Periodontal attachment loss attributable to cigarette smoking in an urban Brazilian population. *J Clin Periodontol*. 2004; 31: 951-8.

Tipton DA, Dabbous MK. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol*. 1995; 66(12):1056-64.

Tomar SL, Asma S. Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. *J Periodontol*. 2000 May;71(5):743-51.

Tüter G, Kurtiş B, Serdar M, Yücel A, Ayhan E, Karaduman B, Ozcan G. Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J Clin Periodontol*. 2005 Sep;32(9):1011-5.

Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontol 2000*. 2003;31:77-104.

University of Veterinary Medicine Hannover. Histology of the connective tissue [online]. Búnteweg, Hannover (Germany): 2008. Disponível na internet: **http://www.tiho-hannover.de/einricht/anat/lit/mwenth/conntis/ko1_bdgw.htm**

Verstappen J, Von den Hoff JW. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J Dent Res*. 2006 Dec;85(12):1074-84.

Vestígios. O cigarro. **<http://www.vestigios.hpg.ig.com.br/cigarro.htm>** (acessado em 12/ Mai/ 2008).

Villar CC, de Lima AF. Smoking influences on the thickness of marginal gingival epithelium. *Pesqui Odontol Bras*. 2003 Jan-Mar;17(1):41-5. Epub 2003 Aug 5.

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

Zambon JJ, Grossi SG, Machtei EE, Ho AW, Dunford R, Genco RJ. Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *J Periodontol*. 1996 Oct;67(10 Suppl):1050-4.

Zhou J, Olson BL, Windsor LJ. Nicotine increases the collagen-degrading ability of human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*. 2007 Jun;42(3):228-35.

Zhou J, Windsor LJ. *Porphyromonas gingivalis* affects host collagen degradation by affecting expression, activation, and inhibition of matrix metalloproteinases. *Periodontal Res*. 2006 Feb;41(1):47-54.

ANEXO A

UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP
------	--

Parecer nº. ETIC 052/07

Interessado(a): Prof. José Eustáquio da Costa
Depto. de Clínica, Patologia e Cirurgia odontológica
Faculdade de Odontologia-UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 19 de abril de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da distribuição de diferentes tipos de colágeno e da expressão de TIMP-1 e MMP-8 no tecido gengival de fumantes com doença periodontal**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP-UFMG

2ª. via

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Meu nome é Carolina Ferreira Franco, sou cirurgiã-dentista e aluna do curso de Mestrado em Periodontia da Faculdade de Odontologia da UFMG e gostaria de convidá-lo a participar voluntariamente da pesquisa intitulada “**Avaliação da distribuição de diferentes tipos de colágeno e da expressão de TIMMP-1 e MMP- 8 no tecido gengival de fumantes com doença periodontal**” que tem por objetivo avaliar de que forma o fumo provoca alterações na gengiva de pacientes com doença gengival.

Sabemos o fumo pode provocar uma série de complicações para a saúde, inclusive câncer de boca e pulmão, sendo sugerido que, idealmente, os fumantes abandonem este hábito.

Para realizar este trabalho, precisarei coletar dados do exame clínico periodontal que foram anotados em sua ficha e pedaços de tecido gengival que serão removidas durante cirurgia periodontal a qual você será submetido para tratamento da doença gengival. Também vou precisar que você responda a um questionário sobre seu estado de saúde e o hábito de fumar.

Precisarei coletar amostras de pacientes fumantes e não fumantes com periodontite que serão submetidos a cirurgia periodontal durante o tratamento e pacientes saudáveis sem doença periodontal encaminhados para cirurgia por outros motivos (aumento de coroa clínica, extração de dentes com finalidade ortodôntica).

O anonimato e o sigilo das informações colhidas serão garantidos, bem como, afirmamos que os dados serão utilizados exclusivamente para esta pesquisa, cujos resultados serão publicados em revistas especializadas. Seu nome não será utilizado em qualquer publicação ou material relacionado ao estudo e você não receberá qualquer compensação financeira por sua participação.

A sua participação é voluntária. Você poderá desistir de participar e cancelar o seu consentimento em qualquer momento da pesquisa. A desistência ou a não aceitação em fazer parte dessa pesquisa não irá interferir no seu tratamento na Faculdade de Odontologia da UFMG.

Cabe ressaltar que o projeto desta pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFMG (COEP/ UFMG).

Este documento tem como objetivo propor a sua participação neste estudo e esclarecê-lo dos seus objetivos.

Eu, _____, RG: _____, aceito participar deste estudo de forma voluntária. Sei que posso desistir a qualquer momento sem que isso acarrete qualquer tipo de prejuízo para meu tratamento na Faculdade de Odontologia da UFMG.

Afirmo que fui devidamente esclarecido quanto aos objetivos da pesquisa, quanto à preservação da minha imagem e quanto ao destino dos dados coletados.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 2007.

Assinatura

Em caso de urgência ou necessidade de maiores informações, favor entrar em contato com:

Pesquisador responsável: Carolina Ferreira Franco: (31) 3283 3311.

Orientador: Dr José Eustáquio da Costa - Faculdade de Odontologia da UFMG.
Avenida Antonio Carlos, 6627.Pampulha-Telefone: (31) 3499-2412

COEP: Comitê de Ética na Pesquisa -Av. Antônio Carlos, 6.627. Unidade Administrativa II, 2° andar Telefone: (31) 3499-4592

ANEXO C

Belo Horizonte, ____ de _____ de 200__.

Prezado Senhor (a),

O exame clínico odontológico de

_____ realizado no dia __/__/__ indicou a presença das seguintes alterações:

Desta forma sugeri que procurasse os serviços de atenção necessários ao restabelecimento das condições acima descritas.

Atenciosamente,

Carolina Ferreira Franco

CROMG 29253

ANEXO D

DATA: _____ NOME: _____
 IDADE: _____ GÊNERO () F () M TELEFONE: _____

CLASSIFICAÇÃO: _____ () G1 - FUMANTE _____ () G2 - PERIODONTITE _____ () G3 - SAUDÁVEL

1. Você fuma atualmente? () sim () não
 2. Quantos cigarros por dia? () até 10 () entre 10 e 20 () mais de 20 () não sabe
 3. Há quantos anos você fuma? () 5 ou menos () entre 5 e 10 () Mais de 10 () não sabe
 4. Já fumou anteriormente? () sim () não
 5. Há quanto tempo você parou? _____
 6. Quantos cigarros fumava por dia? () até 10 () entre 10 e 20 () mais de 20 () não sabe
 7. Por quantos anos você fumou? () 5 ou menos () entre 5 e 10 () Mais de 10 () não sabe
 8. Alguém fuma dentro da sua casa ? () sim () não
 9. Quantas pessoas fumam? _____
 10. No ambiente em que você frequenta (escola, trabalho) têm fumantes? () sim () não
 11. Descreva o ambiente : () fechado () aberto
 10. Você tomou antibiótico ou antiinflamatório nos últimos 6 meses? () sim () não
 12. Você toma algum medicamento de uso contínuo? () sim () não
-
13. Você tem ou já teve algum dos problemas de saúde abaixo relacionados?

() diabetes	() endocardite bacteriana	() febre reumática
() pressão alta	() cardiopatia	() problema respiratório
() não relata qualquer alteração relevante () Outros _____		
 14. Você faz uso de alguma medicação anticoncepcional? () sim () não _____
 15. Você pode estar grávida ou amamentando? () sim () não

