

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Juliete Aparecida Francisco da Silva

**“Análise da influência do diabetes tipo I induzido na progressão da  
doença periodontal experimental em ratos ”**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para  
obtenção do Título de Mestre em Genética e  
Biologia Molecular na área de Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado  
Co-orientadora: Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Campinas  
2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

<b>Si38a</b>	<p>Silva, Juliete Aparecida Francisco da Análise da influência do diabetes tipo I induzido na progressão da doença periodontal experimental em ratos / Juliete Aparecida Francisco da Silva. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.</p> <p>Orientadora: Dagmar Ruth Stach-Machado. Co-orientadora: Valéria Helena Alves Cagnon. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Diabetes mellitus. 2. Doença periodontal. 3. Gelatinase A. 4. Gelatinase B. 5. Fibrose. I. Stach- Machado, Dagmar Ruth. II. Cagnon, Valéria Helena Alves. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
--------------	--

**Título em inglês:** Analysis of the influence of diabetes type I induced in the progression of experimental periodontal disease in rats.

**Palavras-chave em inglês:** Diabetes mellitus; Periodontal disease; Gelatinase A; Gelatinase B; Fibrosis.

**Área de concentração:** Imunologia.

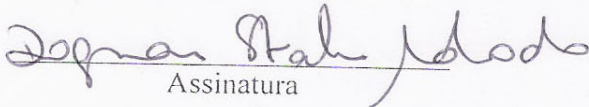
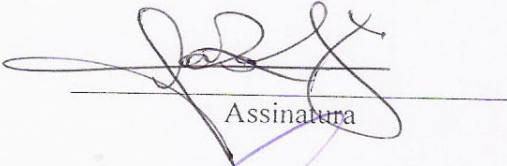
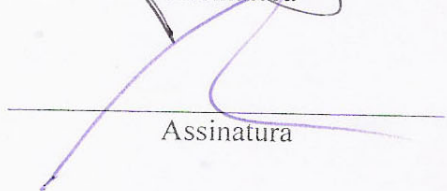
**Titulação:** Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Banca examinadora:** Dagmar Ruth Stach-Machado, Carlos Rossa Júnior, Fábio Teixeira Maranhão Costa.

**Data da defesa:** 26/04/2006.

**Campinas, 26 de abril de 2006.**

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado (Orientador)	 Assinatura
Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior	 Assinatura
Prof. Dr. Fábio Teixeira Maranhão Costa	 Assinatura
Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud	_____ Assinatura
Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line	_____ Assinatura

Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar uma alma.

E você aprende que amar não significa apoiar-se, e que companhia nem sempre significa segurança.

Aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão.

E aceita que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-lo de vez em quando e você precisa perdoá-la por isso.

Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias.

Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto.

Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu mais com elas do que com quantos aniversários você celebrou.

Aprende que quando está com raiva tem o direito de estar com raiva, mas isso não te dá o direito de ser cruel.

Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém...Algumas vezes você tem de aprender a perdoar a si mesmo.

Aprende que com a mesma severidade com que julga, você será em algum momento condenado.

Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o conserte.

Aprende que o tempo não é algo que possa voltar.

Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, em vez de esperar que alguém lhe traga flores.

E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo de tentar...

**William Shakespeare**

*Dedico*

*Esta tese aos meus pais, Nadir Aparecida  
Vicentini Silva e Alfredo Francisco da Silva,  
pela oportunidade da vida, pelo incentivo e  
por cuidarem de mim sempre com tanto  
carinho.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado sabedoria, força e coragem para chegar até aqui.

Agradeço toda a minha família: minha mãe Nadir, meu pai Alfredo, minha irmã Anali, meus tios Liberato e Neusa, minha avó Teresinha, minha sogra Natalícia e todos os demais, que sempre torceram e oraram por mim, me apoiando incondicionalmente em todas as etapas, mesmo que as escolhas estivessem erradas...

Em especial, meu marido Luis Fabiano, que esteve comigo todo o tempo e muito me ajudou.

Meu amigo e companheiro de trabalho, Márcio Lorencini, que junto comigo trabalhou nessa linha de pesquisa e sempre esteve junto de mim durante esse trabalho, me ajudando, me ensinando, errando e pensando comigo.

Meus colegas de laboratório, Luis Antônio Peroni, José Raimundo dos Reis e Tais Mazzola por tanto me ensinarem e ajuda incondicional. E Maria Cristina Caporrino, Marcel Lorenzi e Fábio Téó, por me darem muito apoio, ajuda profissional e pessoal, tornando esse trabalho possível.

Minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dagmar Machado por ter acreditado e apostado em mim, minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup> Valéria Quitete, por me ensinar técnicas tão importantes nesse trabalho e me dar suporte sempre que preciso. O Prof. Hernandes Carvalho por ter seido sempre tão atencioso, compreensivo, colaborador e me ajudar tanto durante este trabalho. A Prof<sup>a</sup> Liana Verinaud, por ceder espaço em seu laboratório e por suas alunas, que sempre me ajudaram quando precisei. Os Profs. Marcos Machado e Alessandra Souza por tornarem possível a realização do experimento de PCR quantitativo. O Prof. Paulo Joazeiro por ter estado sempre pronto a ajudar em todas as vezes que eu o procurei.

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

## ÍNDICE

<b>RESUMO .....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>7</b>
<b>Caracterização e evolução da doença periodontal.....</b>	<b>7</b>
<b>Diabetes Mellitus.....</b>	<b>11</b>
<b>Degradação da matriz extracelular.....</b>	<b>14</b>
<b>Atuação das metaloproteinases .....</b>	<b>15</b>
<b>A INFLUÊNCIA DO DIABETES MELLITUS TIPO I NA CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA DOENÇA PERIODONTAL .....</b>	<b>19</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>20</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
Obtenção e manutenção de animais .....	22
Indução de diabetes .....	22
Indução da doença periodontal.....	23
Delineamento experimental e obtenção de amostra .....	23
Análise de microscopias de luz .....	23
Análise estatística .....	24
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>38</b>
<b>INFLUÊNCIA DO DIABETES TIPO I NA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DAS GELATINASES: MMP 2 E MMP 9 NA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA .....</b>	<b>42</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>43</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
Obtenção e manutenção de animais .....	45
Indução de diabetes .....	46
Indução da doença periodontal.....	46
Delineamento experimental e obtenção de amostra .....	46
Imunofluorescência .....	47
Zimografia .....	47
Desenho de oligonucleotídeos sintéticos.....	48
Extração de RNA total, transcrição reversa e PCR em tempo real .....	48

Seqüenciamento dos fragmentos amplificados .....	48
Análise estatística .....	49
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>
Imunofluorescência .....	49
Quantificação da atividade enzimática por zimografia .....	52
PCR quantitativo .....	53
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>58</b>
<b>RESULTADOS COMPLEMENTARES</b> .....	<b>62</b>
<b>Coloração por Picrossirius Red</b> .....	<b>62</b>
<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>65</b>
<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS CITADAS</b> .....	<b>74</b>



## RESUMO

A doença periodontal é caracterizada como um grupo de lesões que afetam os tecidos que rodeiam e suportam os dentes nos seus alvéolos. A placa bacteriana é seu agente etiológico principal, todavia inúmeras evidências sugerem que a doença periodontal não está simplesmente associada à colonização da cavidade oral por microrganismos patogênicos, mas à susceptibilidade ou resistência do hospedeiro, uma vez que, dependendo da resposta imune mediada a estes microrganismos poderá resultar ou não na destruição do tecido periodontal.

Nos tecidos periodontais saudáveis, há um delicado equilíbrio entre os microrganismos encontrados na placa e a resposta do hospedeiro. Embora a resposta seja essencialmente protetora é influenciada por diversos fatores que podem gerar uma resposta imune exacerbada e deste modo, contribui para o agravamento das lesões e cronificação da doença periodontal. Entre os fatores de risco está o Diabetes Mellitus, caracterizado pela ineficiência na produção ou utilização inadequada de insulina pelo organismo, afetando o metabolismo de proteínas, carboidratos e gordura, resultando em severas desordens metabólicas.

O objetivo inicial deste trabalho foi estudar o desenvolvimento da doença periodontal experimental em ratos sob influência do diabetes induzido por estreptozotocina (STZ), caracterizando as alterações morfológicas encontradas no tecido epitelial e conjuntivo, uma vez que, indivíduos diabéticos apresentam um retardo na capacidade de cicatrização. Os resultados obtidos confirmaram que os animais diabéticos tiveram cronificação da resposta inflamatória com aumento de células inflamatórias no tecido do periodonto, degradação maior e mais rápida de fibras colágenas, que levou ao acúmulo de fibras colágenas densas, aumentou aparentemente a quantidade de fibroblastos, aumentou a degradação de fibras reticulares que sustentam a membrana da basal, houve involução das papilas dérmicas e aumento da camada córnea.

Uma vez que, nos animais diabéticos o processo fibrótico foi mais acentuado com o avanço da inflamação afetando a organização estrutural do tecido epitelial e conjuntivo, provavelmente devido ao aumento da degradação da matriz extracelular. Deste modo, efetuamos a avaliação das MMP2 e 9, também denominadas gelatinases, as quais entre outras atividades biológicas atuam na degradação proteolítica da matriz extracelular. Os resultados obtidos na quantificação da atividade enzimática das MMPs por zimografia mostrou que, a expressão das isoformas de MMP 2 foram significativamente menores nos animais diabéticos quando comparados aos animais normais durante todo decorrer do tempo experimental. Todavia, a atividade enzimática da MMP9 foi maior nos animais diabéticos. Estes

dados foram confirmados pela imunofluorescência, uma vez que a MMP2 em animais normais foi expressa em vários tipos celulares como as células basais do epitélio, endotélio dos vasos, no tecido conjuntivo e algumas regiões entre fibras musculares. Todavia, em animais diabéticos sua expressão esteve mais limitada às células do epitélio e do tecido conjuntivo. Enquanto que, a expressão da MMP9 é mais evidente nos animais diabéticos.

Entretanto, a análise da expressão da MMP2 por PCR quantitativo mostrou não haver diferença significativa entre os animais diabéticos e normais, todavia a expressão gênica da MMP9 apresentou expressão inversamente proporcional. Nos animais normais a sua expressão foi mínima na ausência do estímulo inflamatório e apresentou aumento no decorrer dos tempos experimentais. No animal diabético ocorreu o contrário, uma vez que, na ausência do estímulo inflamatório o nível de expressão da MMP9 foi elevado e durante a resposta inflamatória houve diminuição significativa da sua expressão. Estes dados sugerem que as MMP2 e MMP9 podem estar envolvidas na dinâmica da resposta do tecido periodontal atuando na degradação da matriz extracelular e resultam em diferentes padrões de fibrose nos animais normais e diabéticos.

## ABSTRACT

The periodontal disease is characterized as a group of lesions that affect the tissues which surround and support the teeth in their correct places. The bacterial plaque is the major ethiological agent, and most evidences suggest the periodontal disease is not simply associated with oral cavity colonization by pathogenic microorganisms, but to host susceptibility or resistance to the disease, once that, the destruction of periodontal tissue can occur depending on the immune response activated by these microorganisms.

In health periodontal tissues there is a slightly equilibrium between bacterial plaque microorganisms and host response. Although the immune response is essentially protective, it's influenced by some factors which can develop an exacerbated immune response, and in this way, contributing to appearance of worse lesions and a periodontal disease more severe. The Diabetes Mellitus is one of many risk factors and is characterized by inefficient production of insulin or its inadequate utilization by the individual, affecting the protein, carbohydrate and lipids metabolisms, resulting in severe metabolic disorders.

The aim of this project was to study the development of experimental periodontal disease in rats under influence of diabetes induced by streptozotocin (STZ), characterizing the morphological changes found in epithelial and connective tissues, considering that patients affected by this disease shows a delay in the healing capacities. Our results confirmed that the diabetic animals presented a chronic inflammatory response with an increase of inflammatory cells in the periodontal tissues, and higher and faster collagen fibers degradation occurred, causing their accumulation. Moreover, the amount of fibroblasts raised, the reticulin fibers that support the basal membrane were more destroyed, and finally there was an involution in dermic papillas and a cornium layer thicker.

In the diabetic animals, the fibrosis was more emphasized with the inflammation progression, affecting the structural organization of epithelial and connective tissues, probably due to the increase in extracellular matrix degradation. In this way, we evaluated the MMP 2 and 9, called gelatinases, which has a proteolytic activity in the extracellular matrix. The MMPs enzymatic activity quantification by zymography showed that, the MMP2 isoform expressions was significantly lower in diabetic animals when compared to controls, during all the experimental time. However, the MMP9 enzymatic activity was higher in diabetic animals. These data were confirmed by immunoflorescence, because MMP2 in controls was expressed in more than one cellular type such as basal epithelial cells, endothelium cells,

connective tissues and some regions between muscle fibers. Otherwise, in diabetic animals, its expression was limited to epithelial cells and connective tissue.

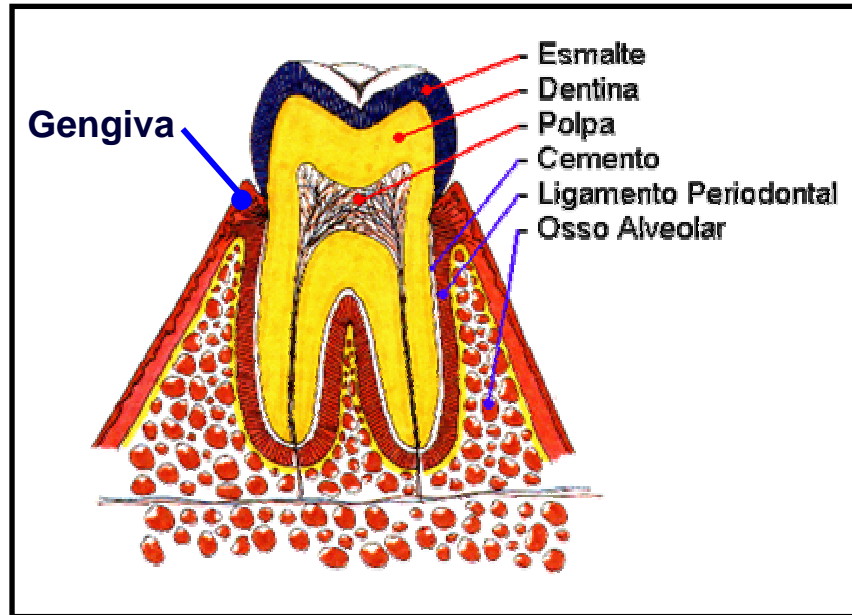
The MMP2 expression in quantitative PCR showed no significant differences between diabetic and control animals, while MMP9 presented a genic expression inversely proportional. In controls, the MMP9 expression was minimal in lack of inflammatory stimulation and showed an increase during the experimental time. Otherwise, in the diabetic animals the MMP9 expression was higher, and during the inflammatory response, its expression decreased.

These data suggest that MMP2 and MMP9 can be involved in dynamics of periodontal tissue response, acting in the extracellular matrix and resulting in different patterns of fibrosis in control and diabetic animals.

## INTRODUÇÃO GERAL

### *Caracterização e evolução da doença periodontal*

O periodonto é responsável pela sustentação e manutenção das funções adequadas do dente. É formado pelos componentes: gengiva, ligamento periodontal, osso alveolar e cemento (NANCI & BOSSHARDT 2006) (**Figura 1**).



**Figura 1:** Descrição anatômica dos tecidos periodontais e dente.

A gengiva que cobre e protege o osso alveolar e a raiz do dente, é anatomicamente dividida em três partes distintas: a gengiva marginal livre, a gengiva interdental e a gengiva aderida. Histologicamente é composta por dois componentes distintos: tecidos epitelial e conjuntivo. O epitélio gengival pode ser subdividido em três compartimentos diferentes: o epitélio gengival, o epitélio do sulco ou sulcar e o epitélio juncional, o qual se liga a superfície do dente e não é queratinizado (BARTOLD *et al.* 2000) (**Figura 2**).



**Figura 2:** Relação anatômica dos tecidos gengivais e osso alveolar. **A:** Esquema mostrando as divisões do epitélio oral e localização de outros componentes periodontais. **B:** Foto clínica que evidencia a gengiva marginal livre (FGM); papila interdental (IP); e junção mucogengival (MGJ), a qual separa a gengiva aderida (AG) da mucosa alveolar (AM).

Como definição, doença periodontal é um termo muito abrangente, uma vez que, envolve enfermidades que atingem os tecidos gengivais, os tecidos conjuntivos periodontais e o osso alveolar (SOCRANSKY, 1977), sendo sem dúvida a doença crônica de maior incidência na dentição humana (TAANI, 1997).

Envolve inúmeras causas e induz os mais variados sintomas sendo, todavia, caracterizada por um grupo de lesões que afetam os tecidos de sustentação dos dentes nos seus alvéolos (TODESCAN, 2001). Pode levar à perda de adesão dos dentes com o periodonto e a gengiva, induzindo reabsorção óssea local, que pode resultar na perda dentária (LINDHE, 1999) (**Figura 3**).

A placa bacteriana é considerada o principal agente etiológico da doença periodontal (**Figura 3**), a qual é constituída por microrganismos predominantemente Gram-negativos anaeróbios (LISTGARTEN, 1986; SIGUSCH *et al.*, 2001), cujo acúmulo nos tecidos leva a uma resposta inflamatória crônica, promovida pelo contato das células do epitélio da mucosa com metabólitos, enzimas, toxinas e fatores de colonização das bactérias (LINDHE 1999).



**Figura 3:** Esquema demonstrativo do avanço da doença periodontal, em resposta à placa bacteriana, e reabsorção do osso alveolar.

Normalmente são encontradas mais de 300 espécies de bactérias na cavidade oral, embora apenas 5% destas, estão provavelmente associadas com a doença periodontal (LISTGARTEN, 1986).

Entre os periodontopatógenos a bactéria *Actinobacillus actinomycetemcomitans* é a mais prevalente nos pacientes, todavia ainda são comumente encontrados: *Bacterioides gingivalis*, *Bacterioides intermedius*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Wolinella recta* (LISTGARTEN, 1986; PREBER *et al.*, 1992; GUO *et al.* 2000).

Embora a placa bacteriana seja o principal fator etiológico da doença periodontal, a resposta imune do hospedeiro determina a susceptibilidade à doença, uma vez que existe um delicado equilíbrio entre os microrganismos encontrados na placa e a resposta do hospedeiro (PAPANOU 1989).

Em indivíduos saudáveis, a resposta imunológica proporciona uma defesa específica e bem regulada, impedindo, deste modo, o desenvolvimento da doença periodontal (MIYASAKI 1991).

Componentes bacterianos como lipopolissacarídeo (LPS), encontrado na membrana de bactérias Gram-negativas, mostraram ser importantes e potentes estimuladores de secreção celular de várias citocinas e fatores de crescimento via mediada por receptores Toll Like. A ligação do LPS ao seu receptor Toll Like 4 induz produção de citocinas inflamatórias da resposta imune inata, que contribuem com a destruição tecidual (SOUTHERLAND *et al.* 2006).

A formação da placa bacteriana afeta primeiramente a gengiva. Induz uma resposta inflamatória aguda que pode evoluir para destruição tecidual, afetando o ligamento e o osso alveolar (BARTOLD & NARAYANAN 2006).

O desenvolvimento da doença periodontal parece estar diretamente relacionado com a extensão do infiltrado celular inflamatório encontrado nos tecidos periodontais. A inflamação aguda é caracterizada pela migração de leucócitos (KANTARCI & VAN DYKE 2005), como as células

polimorfonucleares (PMNs), as quais são os primeiros tipos celulares encontrados nas lesões periodontais e que parecem fornecer a proteção imune primária (GARLET *et al.* 2005).

Quando o estímulo inflamatório não é eliminado, ele pode levar à cronificação da doença, caracterizada por reações inflamatórias e imunológicas exacerbadas à placa bacteriana (COLEMAN 2001), com infiltrado celular dominado por linfócitos T e macrófagos, os quais predominam na lesão crônica estabelecida. A proporção de células B aumenta com a progressão da doença, assim como a proliferação de vasos sanguíneos e a fibrose (KANTARCI & VAN DYKE 2005). A resposta imune local age apresentando antígenos, matando os patógenos e produzindo mediadores inflamatórios (GARLET *et al.* 2005), o que promove a degradação dos tecidos periodontais e leva à formação de granulomas no decorrer da cronificação da doença (LAPPIN *et al.* 2001).

De acordo com PAGE & SCHROEDER (1976, 1982), as alterações teciduais podem ser agrupadas em 4 estágios:

- **lesão inicial:** com dilatação e aumento da permeabilidade vascular;
- **lesão precoce:** com as características da lesão inicial, além do aparecimento de um infiltrado inflamatório rico em linfócitos na região adjacente ao epitélio juncional e destruição da rede de fibras colágenas;
- **lesão estabelecida:** uma extensão da lesão precoce, sendo os plasmócitos as células predominantes no infiltrado inflamatório, com maior destruição de colágeno, além de uma proliferação do epitélio juncional na região do sulco gengival;
- **lesão avançada:** inclui todas as características da lesão estabelecida, com deslocamento do epitélio juncional, formação de bolsa e destruição óssea.

Citocinas e quimiocinas estão envolvidas na imunopatogênese da doença periodontal por induzir a migração seletiva de distintos tipos celulares e por promover a manutenção de subtipos de leucócitos específicos nos tecidos periodontais (GARLET *et al.* 2005).

Inúmeros trabalhos têm demonstrado relação entre a progressão da doença periodontal e a expressão de citocinas do tipo Th1 nos sítios de inflamação, como Interleucina 1 (IL1), Interleucina 2 (IL2), Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) e o TNF $\alpha$  (GEIVELIS *et al.* 1993; HIROSE *et al.* 1997; REINHARDT *et al.* 1993; TOKORO *et al.* 1996; TSAI *et al.* 1995). Sendo que Interleucina 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ), Interleucina 6 (IL6), Fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) e mediadores lipídicos de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) estimulam macrófagos e induzem alterações no tecido conjuntivo e matriz extracelular (SOUTHERLAND *et al.* 2006).



Entretanto, outros estudos como o de LAPPIN *et al.* (2001) demonstraram o envolvimento também das citocinas da via humoral e da resposta imune Th2, sendo as células envolvidas nesta resposta muito mais abundantes nas lesões periodontais. As citocinas Interleucina 4 (IL4), Interleucina 5 (IL5), IL6, Interleucina 8 (IL8) e Interleucina 10 (IL10), por exemplo, estão envolvidas na ativação e proliferação de linfócitos B e, em última análise, na produção de IgG e IgA específicas aos microrganismos que causam a infecção.

A resposta Th2 tem como função básica a regulação de remodelação da matriz extracelular, ativando a deposição de colágeno. Entretanto, respostas Th1 inibem esse processo, indicando a oposição dos papéis representados por respostas Th1 e Th2 no reparo tecidual (WYNN 2004).

Segundo GARLET *et al.* (2005) no modelo murino, logo no início da doença periodontal o perfil de citocinas é Th1, representado pelo aumento da expressão gênica de TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL12 e seus receptores. Os mediadores inflamatórios para resposta Th2 só aparecem com a cronificação da doença, após os 30 dias, com detecção de IL10 e IL4 no RNA mensageiro (RNAm), mudando o perfil da resposta imune.

É o Fator Nuclear  $\kappa\beta$  (NF $\kappa\beta$ ), o fator de transcrição protéico responsável por iniciar a transcrição de várias citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão, como: TNF $\alpha$ , IL1, IL6, IL8 e outros. Ele pode ser regulado por numerosas espécies reativas de oxigênio, sendo essa regulação transcricional importante no desenvolvimento da inflamação, mediada por citocinas (SOUTHERLAND *et al.* 2006).

Segundo BAKER 2005 há evidências de que existe um componente genético que regula a resistência à periodontite crônica em camundongos, sendo a patogênese da doença periodontal geneticamente controlada por genes responsáveis pela resposta imune à infecção por *Porphyromonas gingivalis*.

### ***Diabetes Mellitus***

Na última década, estudos revelaram relações entre as doenças periodontais e algumas variáveis individuais, como diabetes e consumo de tabaco, entre outras (MICHALOWICZ 1994; WILSON 1999; KORNMAN 2001).

O Diabetes Mellitus é uma doença crônica, caracterizada principalmente pela ineficiência na produção ou utilização inadequada de insulina pelo organismo, afetando o metabolismo de proteínas, carboidratos e gordura, resultando em severas desordens metabólicas, refletindo como resultado dessa

anormalidade, sua principal característica: a hiperglicemia (ROBBINS 1989; CONGET 2002; WADA 2002).

A insulina é um importante hormônio anabólico que desempenha um papel significativo na regulação do metabolismo de carboidratos, no armazenamento de glicogênio, na síntese de ácidos graxos, no transporte de aminoácidos e síntese de DNA, RNA e proteínas (ANDERSON *et al.* 1974). É responsável por conduzir a glicose presente no sangue para o interior das células, para ser processada em ATP e fornecer a energia e o calor necessários para o bom funcionamento do organismo (WADA 2002). É produzida pelas células das “Ilhotas de Langherans”, a porção endócrina do pâncreas. As ilhotas são agrupamentos de diferentes tipos celulares, dos quais a maioria é de células beta ( $\beta$ ), responsáveis pela síntese e secreção de insulina, estimuladas pela concentração de glicose no sangue (NATTRAS & HALLES 1988).

Pode-se classificar o Diabetes Mellitus em humanos, em dois tipos: tipo I (infanto-juvenil) ou insulino dependente (IDDM) e tipo II ou não dependente de insulina (NIDDM).

O tipo I manifesta-se em geral na infância ou adolescência e resulta em severa ou absoluta carência de insulina. A clínica da doença é caracterizada principalmente pela fome e sede exacerbadas, poliúria, súbita perda de peso, fadiga e grande tendência à cetose. (ARDUINO *et al.* 1980; ROBBINS *et al.* 1989; MEALEY 2000; WADA 2002; LAFFEL 1999).

O Diabetes Mellitus tipo I é de etiologia auto imune, que cursa com destruição progressiva das células  $\beta$  e conseqüente redução na produção de insulina. Há um ataque das células  $\beta$  por células Th, linfócitos T citotóxicos (CTL) autorreativos e conjunto de anticorpos contra essas células e seus componentes, assim como seus produtos: insulina e ácido glutâmico (MONTE *et al.* 1998; LERNMARK 1999; MATHIS *et al.* 2001; KAWASAKI *et al.* 2004).

O desencadeamento da destruição das células  $\beta$  ainda é desconhecida, mas há correlações entre fatores genéticos (LERNMARK 1999). Porém, a tendência genética não garante o desenvolvimento do Diabetes Mellitus tipo I, apenas predispõe. Outros fatores também podem estar relacionados com o desencadeamento da doença como: o meio ambiente, através de fatores alimentares específicos, hábitos alimentares, poluição e qualidade de vida; o mecanismo de mimetismo molecular utilizado por alguns vírus e fatores epigenéticos (MONTE *et al.* 1998; LERNMARK 1999; VARELA-CALVINO *et al.* 2000; ZIMMET *et al.* 2001).

O Diabetes Mellitus tipo II manifesta-se em geral em adultos e resulta de deficiências dos receptores ou das moléculas de insulina, provocando relativa insensibilidade ao hormônio, entretanto, a

produção de insulina pode se tornar diminuída com a evolução da doença. O início dos sintomas é geralmente gradual e os pacientes estão freqüentemente menos dispostos a cetose, caracterizando-se por hábitos alimentares inadequados e obesidade freqüente, que são possíveis causas apontadas por vários autores, embora a etiologia ainda permaneça desconhecida (ARDUINO *et al.* 1980; ROBBINS *et al.* 1989; LAFFEL 1999; MEALEY 2000; WADA 2002).

Indivíduos diabéticos apresentam maior propensão a infecções bacterianas e oportunistas, as quais provavelmente estão associadas a uma desordem circulatória generalizada por causa de danos aos vasos sangüíneos ocorrido pelo acúmulo de ateromas na parede do lúmen dos mesmos (BENDER & BENDER 2003). O aumento da espessura da parede de pequenas artérias, veias e capilares é causada pelo acúmulo de glicoproteínas anômalas como resultado de um processo de glicação não enzimático irreversível (*advanced glycation endproducts* – AGEs), que associado com diminuição do catabolismo de colágeno, aparentemente reduzem a absorção de nutrientes e oxigênio pelos tecidos gengivais e leva ao acúmulo de metabólitos (PONTE *et al.* 2001). Em adição, há prejuízo da resposta leucocitária, isso leva a uma diminuição da habilidade microbicida de leucócitos polimorfonucleares e falência na entrega de componentes do sistema imune humoral e celular (BENDER & BENDER 2003). Há uma depressão da quimiotaxia de leucócitos no sangue periférico, assim como defeitos na fagocitose e morte bacteriana, aumentando a suscetibilidade dos pacientes (CUTLER *et al.* 1991; OLIVER & TERVONEN 1994).

Diabéticos têm altos níveis de TNF $\alpha$  e grande acúmulo de AGEs. Isto potencializa a resposta inflamatória e induz apoptose de células produtoras de matriz (GRAVES *et al.* 2006).

Além disso, o Diabetes Mellitus aumenta a glicose salivar e crevicular, o que pode influenciar a microflora oral, causando aumento no desenvolvimento de cáries e periodontites (BENDER & BENDER 2003). O fluído crevicular gengival de diabéticos tipo I com doença periodontal e tem altos níveis de PGE<sub>2</sub> e IL1 $\beta$  e sabe-se também que monócitos desses pacientes produzem grande quantidade de TNF $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> e IL1 $\beta$  em resposta a lipopolissacarídeos (LPS) (GRAVES *et al.* 2006). De acordo com esses dados e segundo SAITO *et al.* (2004) a periodontite tem maior incidência em pacientes diabéticos, além de agravar o quadro geral patológico nesses pacientes.

Por todas essas características, o paciente com diabetes mal controlado, de longa data e idade avançada, tende a ter aumento do risco de acúmulo da placa e cálculo, podendo levar a uma doença periodontal mais severa, com aceleração na reabsorção do osso alveolar, maior facilidade da ruptura do ligamento periodontal e aumento na incidência de formação de bolsas periodontais, que se

apresentam mais profundas e mais freqüentes (HOVE & STALLARD 1970; OLIVER & TERVONEN 1993; MEALEY 2000; PERSSON *et al.* 2003).

### ***Degradação da matriz extracelular***

As respostas inflamatória e imune do hospedeiro a patógenos periodontais causam destruição por ativarem mecanismos de reabsorção óssea e por gerarem proteases que degradam a matriz extracelular (GARLET *et al.* 2004).

A matriz extracelular corresponde aos complexos macromolares relativamente estáveis, formados por diferentes moléculas produzidas, exportadas e complexadas pelas células, modulando a estrutura, fisiologia e biomecânica dos tecidos. Pode ser dividida em três componentes principais: componentes fibrilares (representados pelos colágenos fibrilares e fibras elásticas), componentes não fibrilares (correspondem aos proteoglicanos e ao grande grupo de proteínas não colagênicas) e as microfibrilas (formadas pelo colágeno tipo VI e pelas microfibrilas associadas à elastina) (BARTOLD *et al.* 2000).

No tecido periodontal, a matriz extracelular é composta por elementos fibrosos e não fibrosos, incluindo colágenos, elastina, fibronectina, laminina, osteoporina, sialoproteína óssea e elementos não fibrosos como uma variedade de fatores de crescimento e outras proteínas não colágenas, proteoglicanas, lipídeos, minerais e água. Como esses diferentes componentes interagem não somente determinam a saúde tecidual, como também estão envolvidos no reparo e sua regeneração (BARTOLD & NARAYANAN 2006).

A degradação da matriz extracelular na doença periodontal decorre da liberação desbalanceada de substâncias (como quimiocinas e proteases, além de seus ativadores e inibidores) pelas células residentes nas proximidades da infecção ou por células inflamatórias recrutadas. Já nos primeiros estágios das lesões periodontais há alterações teciduais com destruição das fibras colágenas (PAGE & SCHROEDER, 1976; LISTGARTEN, 1986; SEGUIER *et al.*, 2000 e 2001; LIU *et al.*, 2001; EJEIL *et al.*, 2003).

O desequilíbrio de substâncias liberadas caracteriza o aspecto patológico do quadro clínico desenvolvido. As citocinas, por exemplo TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL1, IL6, e muitas outras, têm importante papel em muitos processos fisiológicos normais de defesa do hospedeiro, mas podem induzir uma patologia se secretadas em quantidades inapropriadas. De acordo com GRAVES & COCHRAN (2003), uma vez

que o nível crítico da produção de citocinas pró-inflamatórias é atingido, a resposta fisiológica se torna patológica.

Há aumento de produção de IL1 e TNF $\alpha$  durante a destruição dos tecidos periodontais, salientando que ambos possuem um papel fundamental no desenvolvimento da doença, seja pela estimulação da apoptose de células produtoras da matriz extracelular (como os fibroblastos) ou pela indução da expressão de enzimas líticas. Com a cronificação do processo inflamatório, inúmeras alterações subseqüentes são observadas, entre elas a diminuição da expressão de IL4 (citocina normalmente envolvida em processos de cicatrização, proporcionando o acúmulo de macromoléculas na matriz extracelular) e um aumento na expressão de IL6 (EJEIL *et al.*, 2003). Além disso, outros estudos têm demonstrado que, juntamente com esse conjunto de alterações, as células fagocitárias apresentam um aumento na expressão de enzimas produtoras de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, como o óxido nítrico (NO), amplamente citado como uma molécula de importância vital em inúmeros processos inflamatórios (WAHL *et al.* 1994; LYONS 1995).

A produção de NO associada à atuação de determinadas enzimas líticas tem indicado um envolvimento com a inativação de inibidores de proteinases (como o inibidor  $\alpha_1$ -proteinase) (OWEN & CAMPBELL, 1995). Assim, muito embora o periodonto possua uma considerável capacidade de reparo, uma resposta imunológica desbalanceada pode atuar como o principal elemento indutor da doença periodontal, degradando a matriz extracelular dos tecidos locais, suas células mantenedoras e moléculas de controle da inflamação iniciada.

### ***Atuação das metaloproteinases***

Segundo VAN DER ZEE *et al.* (1997), a degradação de colágeno ocorre por meio de duas vias diferenciadas de acordo com as condições existentes no local. Uma via intracelular é ativada em condições fisiológicas, com a fagocitose de fibras colágenas e sua degradação no interior celular. A segunda via envolve a liberação e ativação de enzimas, normalmente em condições patológicas. Nesse contexto, as endopeptidases são consideradas essenciais para os processos de degradação tecidual.

Dentre elas, a família de enzimas denominadas metaloproteinases de matriz (MMPs) merecem destaque devido a sua grande capacidade de degradação de proteínas estruturais da matriz extracelular como o colágeno, elastina, laminina, fibronectina e proteoglicanos. A ativação dessas MMPs é dependente de íons metálicos tais como zinco ou cálcio. Além disso, as MMPs são capazes de clivar moléculas dispostas na superfície celular, podendo desse modo, regular o comportamento celular

através de várias vias e influenciar uma série de processos fisiológicos e patológicos, incluindo desenvolvimento embrionário, morfogênese tecidual, cicatrização de feridas, doenças inflamatórias e câncer (PARKS & MECHAM, 1998; STERNLICHT & WERB, 2001).

De acordo com STERNLICHT & WERB (2001), as MMPs constituem uma família de enzimas identificadas em diversas espécies. No momento, pelo menos 25 MMPs foram descritas no grupo dos vertebrados, sendo divididas em 5 categorias principais, de acordo com sua atuação e homologia de sequência:

- **Colagenases ou calagenase intersticial:** MMPs 1, 8, 13 e 18, são ativadas contra o colágeno fibrilar;
- **Gelatinases, também conhecidas por colagenases tipo IV:** A ou MMP 2 e B ou MMP 9, têm grande atividade na denaturação de colágeno;
- **Estromelisinases:** MMPs 3, 10 e 11, degradam componentes da matriz extracelular que não são compostos por colágeno;
- **MMPs de membrana:** MMPs 14, 15, 16, 17, 24 e 25, possuem um domínio transmembrana e dentre suas funções está a de ativação de outras MMPs;
- **MMPs que não se enquadram nos grupos anteriores:** MMPs 7, 12, 19, 20, 21, 22, 23, 26, 27 e 28.

Embora os mecanismos de atuação e regulação das MMPs ainda não estejam totalmente elucidados, sabemos que as MMPs precisam ser ativadas ou inibidas apropriadamente em local e momento específicos. Seu funcionamento é rigorosamente regulado, seja nos níveis transcricional, pós-transcricional ou protéico, com a participação de diversos ativadores e inibidores (ALEXANDER & WERB, 1991; STERNLICHT & WERB, 2001). Uma vez que, são secretados sob forma inativa, as MMPs precisam ser clivadas por outras proteases ou se auto-processarem para adquirir uma conformação ativa (BARTOLD & NARAYANAN 2006).

Muitos estudos têm verificado a presença de enzimas que degradam a matriz extracelular nos tecidos periodontais desde 1981 (WOLLEY & DAVIES, 1981) e sabe-se também que o diabetes está diretamente ligado a alterações na síntese de matriz extracelular (MAXWELL *et al.* 2001).

Uma série de pesquisadores têm confirmado aumento significativo na expressão de MMPs na doença periodontal. MAKELA *et al.* (1994) e TERVAHARTIALA *et al.* (2000), por exemplo, verificaram um aumento nas MMPs 2, 8, 9 e 13. Entretanto, muitos resultados permanecem contraditórios ao se comparar tecidos periodontais saudáveis e doentes, principalmente quando existe uma

associação da doença periodontal com outros fatores agravantes. DAHAN *et al.* (2001) não encontraram diferenças na expressão dos genes das MMPs 2 e 14 entre tecidos afetados ou não pela doença periodontal. Enquanto isso, KOMATSU *et al.* (2001), observaram níveis de expressão aumentados das MMPs 2 e 14 quando tecidos afetados foram comparados a não afetados pela doença periodontal em pacientes com Síndrome de Down.

Dentre as MMPs, a sub família das gelatinases têm importante papel na regulação de citocinas e atividade das quimiocinas no processo da via proteolítica durante a inflamação. A atividade proteolítica das gelatinases tem importante papel na regulação da atividade de quimiocinas. Por outro lado, a IL8, que é considerada a principal quimioatraente de neutrófilos, induz a liberação da MMP 9 pelas células (SOUZA *et al.* 2005), que por sua vez, potencializa a atividade biológica da IL8 em pelo menos 10 vezes. Isto resulta na eficiente amplificação do influxo de neutrófilos ao tecido inflamado (XUE *et al.* 2005).

Ao contrário, a interação da proteína quimioatraente de monócitos (MCP-3) por MMP 2 resulta na sua total inativação (XUE *et al.* 2005). MMP 2 é normalmente identificada nos tecidos periodontais em fibroblastos, queratinócitos, condrócitos, células endoteliais, monócitos, osteoblastos e um número de outras células normais e transformadas, entretanto, não parece ser expressa por leucócitos PMNs, mas está presente na forma circulante no plasma (BIRKEDAL-HANSEN *et al.* 1993).

MMP 9 é produzida por queratinócitos, monócitos e macrófagos alveolares, um número de células transformadas malignamente e constitutivamente por leucócitos PMNs. Está presente em altas concentrações na saliva humana (BIRKEDAL-HANSEN *et al.* 1993). Sua expressão é controlada em resposta a moléculas regulatórias como TNF $\alpha$ , IL1, fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento epidermal (SOUZA *et al.* 2005).

Estudos mostram que os níveis de expressão de MMPs 2 e 9 são aumentados em diabéticos (MAXWELL *et al.* 2001; XUE *et al.* 2005), sendo a MMP 9 um permissivo fator de degradação de insulina e está associada às complicações vasculares desses pacientes (XUE *et al.* 2005).

Embora a MMP 9 seja expressa por muitos tipos celulares, há indicações de que leucócitos são uma fonte potencial dessa MMP aumentada no plasma de diabéticos. MMP 9 derivada de leucócitos é um mediador predominante do início da degradação da matriz extracelular durante a inflamação. Em adição à degradação das proteínas da matriz, MMP 9 potencializa a atividade de IL1 $\beta$ , IL8 e endotelina 1, promovendo aumento do influxo de leucócitos aos tecidos inflamados, além de estar associada à apoptose em modelos animais de diabetes tipo I (CAMP *et al.* 2003).

Os níveis de glicose aumentados em diabéticos ativam MMP 9 latente secretada por leucócitos. Em adição, MMP 9 abundante, ativa MMP 2 nesses pacientes. A MMP 9 também promove a proliferação de células T e contribui para a inflamação em diabéticos tipo I (XUE *et al.* 2005).

O balanço entre MMP e seus inibidores é importante para manter o reparo da ferida e o distúrbio desse equilíbrio leva à proteólise excessiva e retardo na cicatrização das úlceras dérmicas em diabéticos (KADOGLOU *et al.* 2005), o que justifica as bolsas periodontais mais profundas e mais freqüentes nesses pacientes (MEALEY 2000; PERSSON *et al.* 2003).

Diante da evidente degradação da matriz extracelular e deficiente reposição ocorrida durante a inflamação e prejudicada com o estado diabético, o objetivo deste estudo foi analisar como a doença periodontal induzida em ratos é influenciada pelo diabetes através de: análises das alterações morfológicas encontradas no tecido epitelial e conjuntivo por microscopias de luz, além da contagem de células inflamatórias e morfometria; e caracterização da degradação da matriz extracelular através da quantificação dos RNAs das MMPs 2 e 9, assim como localização tecidual destas enzimas por imunofluorescência e a quantificação de suas atividades genatinolíticas por zimografia.



# **A INFLUÊNCIA DO DIABETES MELLITUS TIPO I NA CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA DOENÇA PERIODONTAL**

Juliete A. Francisco da Silva<sup>1</sup>, Márcio Lorencini<sup>1</sup>, José Raimundo R. dos Reis<sup>1</sup>, Hernandes F. Carvalho<sup>2</sup>, Valéria Helena A. Cagnon<sup>3</sup> & Dagmar Ruth Stach-Machado<sup>1</sup>

1. Departamento de Microbiologia e Imunologia

2. Departamento de Biologia Celular

3. Departamento de Anatomia

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Campinas SP, Brasil

**Correspondências para:** Dagmar Ruth Stach-Machado

Departamento de Microbiologia e Imunologia – Universidade Estadual de  
Campinas (UNICAMP)

CP 6109

13083-863 Campinas SP, Brazil

Phone: 55 19 3788 6265

Fax: 55 19 3788 6276

E-mail: [dmachado@unicamp.br](mailto:dmachado@unicamp.br)

## RESUMO

A doença periodontal caracteriza um grupo de lesões que afetam os tecidos de sustentação dos dentes nos seus alvéolos, sendo uma das doenças crônicas de maior incidência na dentição humana. A placa bacteriana é seu agente etiológico principal, todavia é a resposta imune do hospedeiro que induz a destruição do tecido periodontal. Entre os fatores de risco, o Diabetes Mellitus é um agravante para o desenvolvimento, progressão e severidade da doença periodontal.

O objetivo deste estudo foi analisar as alterações morfológicas encontradas no tecido epitelial e conjuntivo durante a indução da doença periodontal experimental em ratos através da indução da ligadura, sob influência do diabetes.

Os resultados obtidos mostraram que o diabetes influenciou no desenvolvimento e progressão da doença periodontal, induzindo alterações no tecido epitelial e conjuntivo, como a involução das papilas dérmicas, o aumento de células inflamatórias, degradação de fibras reticulares, acúmulo de fibras colágenas densas e fibrose. O diabetes retardou o processo de regeneração tecidual.

**Palavras chaves:** Diabetes Mellitus, doença periodontal experimental, estreptozotocina, morfologia, inflamação, fibrose.

## INTRODUÇÃO

A doença periodontal caracteriza um grupo de lesões que afetam os tecidos de sustentação dos dentes nos seus alvéolos (TODESCAN, 2001), sendo a doença crônica de maior incidência na dentição humana (TAANI, 1997). Ela é caracterizada por intenso infiltrado inflamatório, que inicia a destruição tecidual da gengiva e, se a resposta não for contida, afeta o ligamento periodontal e o osso alveolar, gerando dano irreversível nestas estruturas, o que pode resultar em perda do dente (GARLET *et al.* 2004; BARTOLD & NARAYANAN 2006).

A placa bacteriana é considerada seu principal agente etiológico e é constituída por microrganismos anaeróbios predominantemente Gram-negativos (LISTGARTEN, 1986; SIGUSCH *et al.* 2001). Todavia, evidências sugerem que a doença periodontal não está simplesmente associada à colonização da cavidade oral por microrganismos patogênicos, mas essencialmente com a susceptibilidade ou resistência do hospedeiro, uma vez que, dependendo da resposta imune

desenvolvida frente a estes microrganismos, pode resultar ou não, na destruição do tecido periodontal. Nos tecidos periodontais saudáveis, há um delicado equilíbrio entre os microrganismos encontrados na placa e a resposta do hospedeiro (PAPAPANOU 1989).

A resposta imune do hospedeiro, embora seja essencialmente protetora, é, todavia determinada geneticamente (BAKER 2005) e influenciada por diversos fatores que podem gerar uma resposta imune exacerbada, contribuindo deste modo com o agravamento das lesões e cronificação da doença (COLEMAN, 2001; LAPPIN *et al.* 2001).

A gengiva é a primeira a ser afetada pelo acúmulo de placa e, com apenas 3-4 dias, a resposta inflamatória já inicia a destruição do tecido. Dessa forma, perde sua função principal que é a proteção da superfície da raiz e osso alveolar contra as agressões do meio ambiente externo. (BARTOLD & NARAYANAN 2006).

Na última década, estudos revelaram relações entre as doenças periodontais e algumas variáveis individuais, como diabetes e consumo de tabaco (MICHALOWICZ 1994; WILSON 1999; KORNMAN 2001).

O Diabetes Mellitus é uma doença crônica, caracterizada principalmente pela ineficiência na produção ou resposta inadequada à insulina, afetando o metabolismo de proteínas, carboidratos e gordura (ROBBINS 1989; CONGET 2002; WADA 2002).

Em indivíduos diabéticos, o epitélio gengival é atrofiado, pleomórfico, há diminuição no número de organelas celulares, desorganização da membrana celular, acúmulo de gotas lipídicas citoplasmáticas e aumento dos espaços intercelulares (CALDEIRA *et al.* 2004). Essas características, juntamente com as complicações vasculares em resposta à hiperglicemia desses pacientes, levam a prejuízos na resposta imune, como diminuição da habilidade microbicida de leucócitos polimorfonucleares, falência na entrega de componentes do sistema imune humoral e celular, inibição da quimiotaxia de leucócitos no sangue periférico e defeitos na fagocitose e morte bacteriana (CUTLER *et al.* 1991; OLIVER & TERVONEN 1994; BENDER & BENDER 2003), além de exacerbar a resposta inflamatória através da persistente expressão de citocinas (GHADA *et al.* 2004). Isso faz com que dentre as múltiplas e severas patologias encontradas associadas à hiperglicemia, indivíduos diabéticos, embora apresentem uma resposta inflamatória mais intensa, exibam maior susceptibilidade a infecções bacterianas, com desenvolvimento de doenças periodontais mais severas e com progressão mais rápida (SOUTHERLAND *et al.* 2006). Além disso, a doença periodontal tem sido

associada com o desenvolvimento da intolerância da glicose e o não controle da glicemia em adultos diabéticos (SAITO *et al.* 2004).

Considerando a importância do diabetes na saúde humana, cuja incidência mundial vem aumentando gradativamente, tendendo a dobrar nos próximos vinte e cinco anos (RITZ, 2002); e a sua influência no desenvolvimento e agravamento das lesões na doença periodontal, foi objetivo deste trabalho estudar a influência do diabetes na doença periodontal experimental caracterizando as alterações morfológicas encontradas no tecido gengival epitelial e conjuntivo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Obtenção e manutenção de animais***

Foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar), machos, adultos, pesando aproximadamente 120g, originários do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Grupos de 5 animais foram acomodados em gaiolas de propileno e mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, com padrão SPF (*Specific Pathogen Free*) e mantidos em ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e alimentação granulada (Labina/Purina) *ad libitum*. Os procedimentos seguiram as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da UNICAMP (Protocolo número 649-1).

### ***Indução de diabetes***

O diabetes foi induzido, por tratamento com agente diabetogênico estreptozotocina (STZ) (Sigma Chemical Co, Saint Louis MO, USA) (CARSON 1979), na dosagem de 65mg/Kg de peso do animal, diluído em 0,3ml de tampão citrato 1,0M, pH 4,4, administrado por via intraperitoneal, em três doses com intervalo de sete dias cada, mantendo-se regularidade de horário. O estado diabético foi monitorado semanalmente através do nível de glicosúria utilizando a fita *Glucotest* (Roche Diagnosis, Mannheim, Germany), enquanto a glicemia foi avaliada em intervalos regulares utilizando *Accu-Chek Active* (Roche Diagnosis) segundo as instruções do fabricante. Os animais normais foram inoculados com volumes equivalentes do tampão citrato utilizando a mesma via e mesmo número de doses, passando pelo mesmo protocolo de testes.

### ***Indução da doença periodontal***

A indução da doença periodontal foi efetuada sob anestesia, utilizando cloridrato de ketamina (80mg/Kg) e xilasina (10mg/Kg), através da ligação de um fio de algodão número 10 amarrado ao redor dos primeiros molares inferiores bilateralmente, segundo o procedimento descrito por JOHNSON (1975).

### ***Delineamento experimental e obtenção de amostra***

Os animais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos: animais normais e animais diabéticos. Os quais foram sacrificados em três períodos distintos.

- 0 dias de inflamação ou sem indução de doença periodontal por ligadura
- 15 dias de inflamação ou indução de doença periodontal por ligadura
- 30 dias de inflamação ou indução de doença periodontal por ligadura

Nesse trabalho foram considerados animais controles aqueles que pertenciam ao grupo normal e não tiveram doença periodontal induzida.

Os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e imediatamente após, os fragmentos de mucosa gengival, adjacentes aos primeiros molares foram removidos com bisturi e processados de acordo com os ensaios posteriores.

### ***Análise de microscopias de luz***

Os fragmentos da mucosa gengival foram removidos e fixados em solução de Bouin por 12 horas, substituída por álcool 70% e submetidos a uma série crescente de etanol e xilol, com posterior inclusão em Paraplast Plus (Kendall, Mansfield MA, USA). Cortes seriados de 5 µm de espessura foram obtidos utilizando o micrótomo (LEICA RM 2145), montados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina-floxina.

Para a análise das fibras reticulares e do colágeno tipo I, os cortes foram oxidados com permanganato de potássio 1% (por 2 minutos a temperatura ambiente-TA), descorados com ácido oxalacético 3%, tratados com alúmen de ferro 1% (por 1 minuto a TA), imersos em solução de prata amoniacal (por 2 minutos a TA) e posteriormente tratados com formol 10% (por 3 minutos a TA), cloreto de ouro 2% (por 2 minutos a TA), tiosulfato de sódio 2% (por 2 minutos a TA) e ácido pícrico (por 2 minutos a TA) (VILAMAIOR *et al.* 2000).

A quantificação de perfis celulares inflamatórios foi feita através de uma ocular graduada (10X), contendo um retículo de integração quadrilátero com 100 pontos e área de  $1\text{mm}^2$ , acoplada ao microscópio de luz Olympus CBA e objetiva de 100X. Através desse retículo foram quantificadas células inflamatórias de dez campos distintos do tecido conjuntivo de cada animal. A partir desses valores foram calculadas as médias dos diferentes grupos experimentais, obtendo-se valor relativo ao número de perfis celulares por área.

As análises morfométricas foram realizadas utilizando o programa *The Image-pro Express version 4 soft*, com objetiva de 20X. Foram avaliadas: área total do epitélio oral, área da camada córnea epitelial e altura das papilas dérmicas.

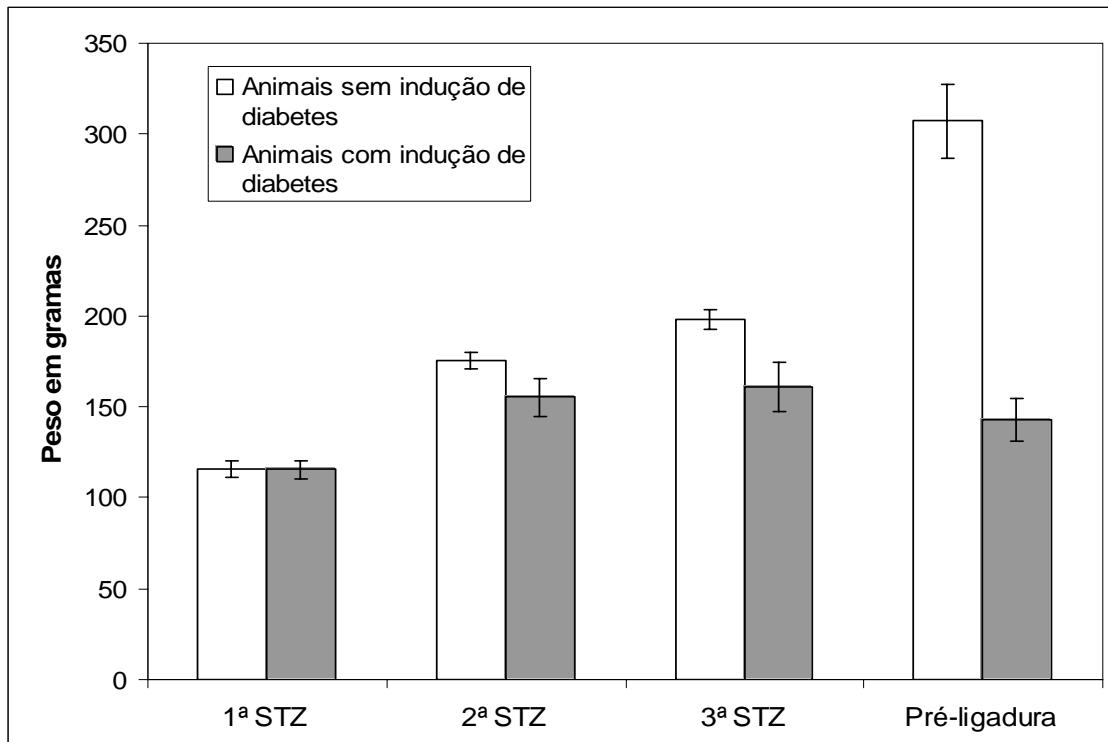
### ***Análise estatística***

A análise estatística dos dados foi realizada por análise da variância two-way (ANOVA), usando o Teste de Tukey para comparações múltiplas subseqüentes. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Todos os testes foram feitos com o GraphPad InStat 3.05 e GraphPad Prism 3.0 software (GraphPad Software Inc.)

## **RESULTADOS**

No início deste trabalho, os animais de ambos os grupos experimentais não apresentavam diferenças significativas quanto aos pesos corpóreos ( $115 \pm 5\text{g}$ ), a glicemia ( $114/\text{dl} \pm 7,7\text{mg}/\text{dl}$ ) e a glicosúria (negativos).

A indução do diabetes, foi realizada através da inoculação de três doses da droga STZ . Embora as inoculações levem a uma redução do peso e perda de massa corpórea, esta todavia não foi significativa nas primeiras doses, quando comparada com os animais normais. Somente após a terceira dose esta redução do peso tornou-se significativa, enquanto os animais normais pesaram  $307 \pm 20\text{g}$  , o peso dos animais diabéticos foi  $143 \pm 12\text{g}$ . (**Figura 1**).

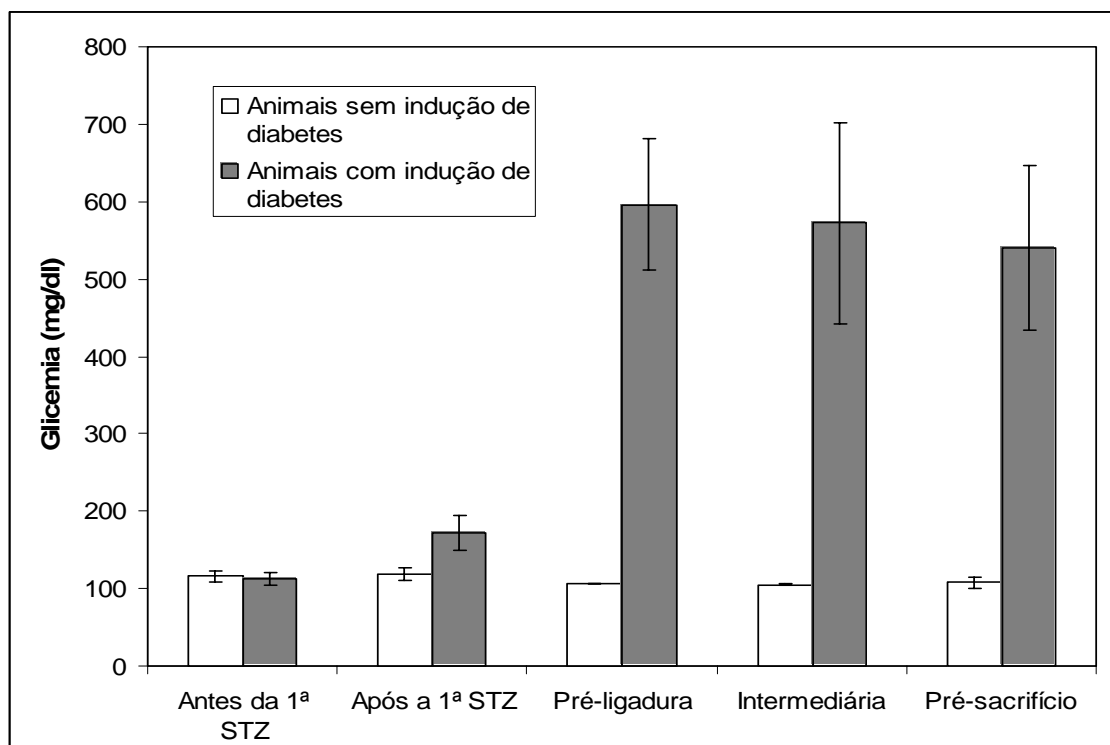


**Figura 1:** Média dos pesos dos animais normais e dos animais tratados com STZ via intraperitoneal durante o período de indução do diabetes.

A glicemia (**Figura 2**) em animais normais foi de  $111 \pm 5\text{mg/dl}$  manteve-se assim constante e sem alterações significativas durante todo período experimental. Enquanto em diabéticos, após a terceira dose de STZ, a glicemia foi de  $596 \pm 85\text{mg/dl}$  e manteve-se alta, aproximadamente 4 vezes maior quando comparada aos animais normais.

Na urina dos animais normais não foi detectada glicose, enquanto nos animais diabéticos a glicosúria foi  $>1000\text{m/dl}$  após a terceira dose de STZ, mantendo-se constante até o final do experimento.

Além desses dados, os animais que receberam o tratamento com STZ, após a terceira dose dessa droga, começaram a apresentar sintomas diferenciados dos animais normais, como: sede intensa, apatia e poliúria e mantiveram-se assim até o sacrifício.



**Figura 2:** Comparação dos níveis glicêmicos (mg/dl) dos animais normais e diabéticos, avaliados em intervalos regulares utilizando *Accu-Chek Active* (Roche Diagnosis) segundo as instruções do fabricante.

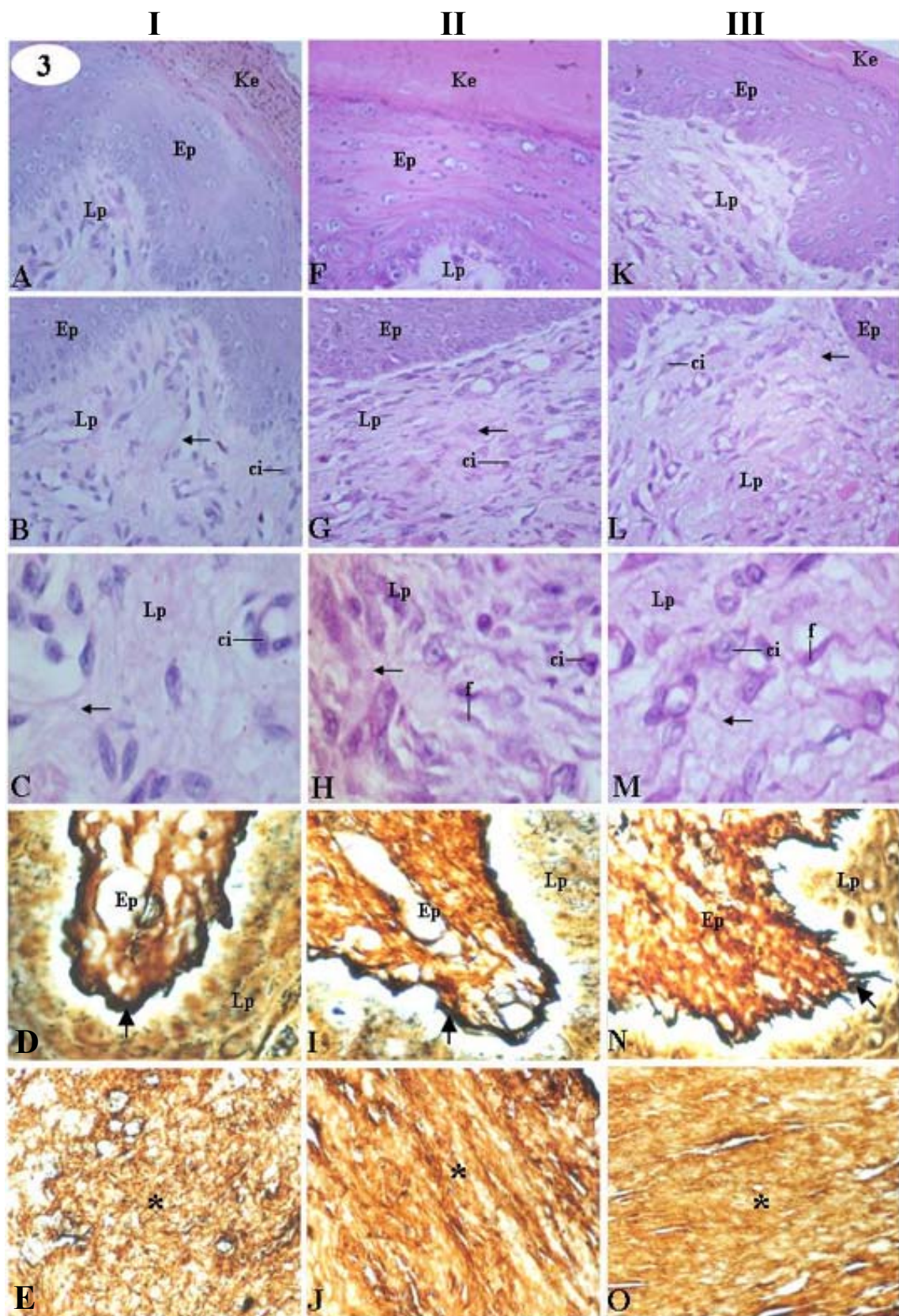
A indução da doença periodontal através da ligadura produziu resposta inflamatória no tecido gengival, mostrando sinais clínicos como edema, vermelhidão e perda de adesão ao dente, os quais foram vistos nos grupos experimentais diabético e normal. Todavia, a análise macroscópica e qualitativa da gengiva dos animais diabéticos com ligadura apresentou maior flacidez tecidual, resistência à tração diminuída, além de menor aderência ao dente quando comparados com animais sem diabetes.

Análise histológica do tecido periodontal gengival mostrou o tecido epitelial da gengiva dos animais controles formado por espessa camada de epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, composto por 4 camadas distintas: estrato córneo, estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato basal bem organizadas apresentando queratinócitos coesos, com junções intercelulares típicas de epitélios de revestimento. Elevações e invaginações, similares às papilas dérmicas humanas, foram observadas junto à lâmina basal (**Figura 3 A**).

O tecido conjuntivo mostrou-se composto por fibras colágenas com disposição ordenada e entrelaçamento entre as fibras de maior e menor espessura. Fibras reticulares foram demonstradas



subjacentes e linearmente à lâmina basal, além de ocasionais células inflamatórias, como neutrófilos. A lâmina própria demonstrou-se delgada contendo eventuais fibroblastos, que o caracteriza como tecido conjuntivo frouxo (**Figura 3 B e C**).



**Figura 3:** Fotomicrografia da gengiva de ratos normais. **Coluna I (A, B, C, D e E)** animais controles; **Coluna II (F, G, H, I e J)** animais com 15 dias de ligadura e **Coluna III (K, L, M, N e O)** animais com 30 dias de ligadura. **A, B, C, F, G, H, K, L e I** cortes coarados por HE e **D, E, I, J, N e O** corados com impregnação por prata. **A, B, F, G, K e L** possuem aumento de 400X e **C, D, E, H, I, J, M, N e O** aumento de 1000X.

**(Ke)** camada córnea ou queratinizada. **(Ep)** epitélio. **(Ke + Ep)** epitélio gengival. **(Lp)** lâmina própria. **(ci)** célula inflamatória. **(f)** representa fibroblasto. **(→)** fibras do tecido conjuntivo nas fotos **C, H e M**. **(→)** fibras reticulares junto à membrana basal nas fotos **D, I e N**. **(\*)** fibras de colágeno tipo I.

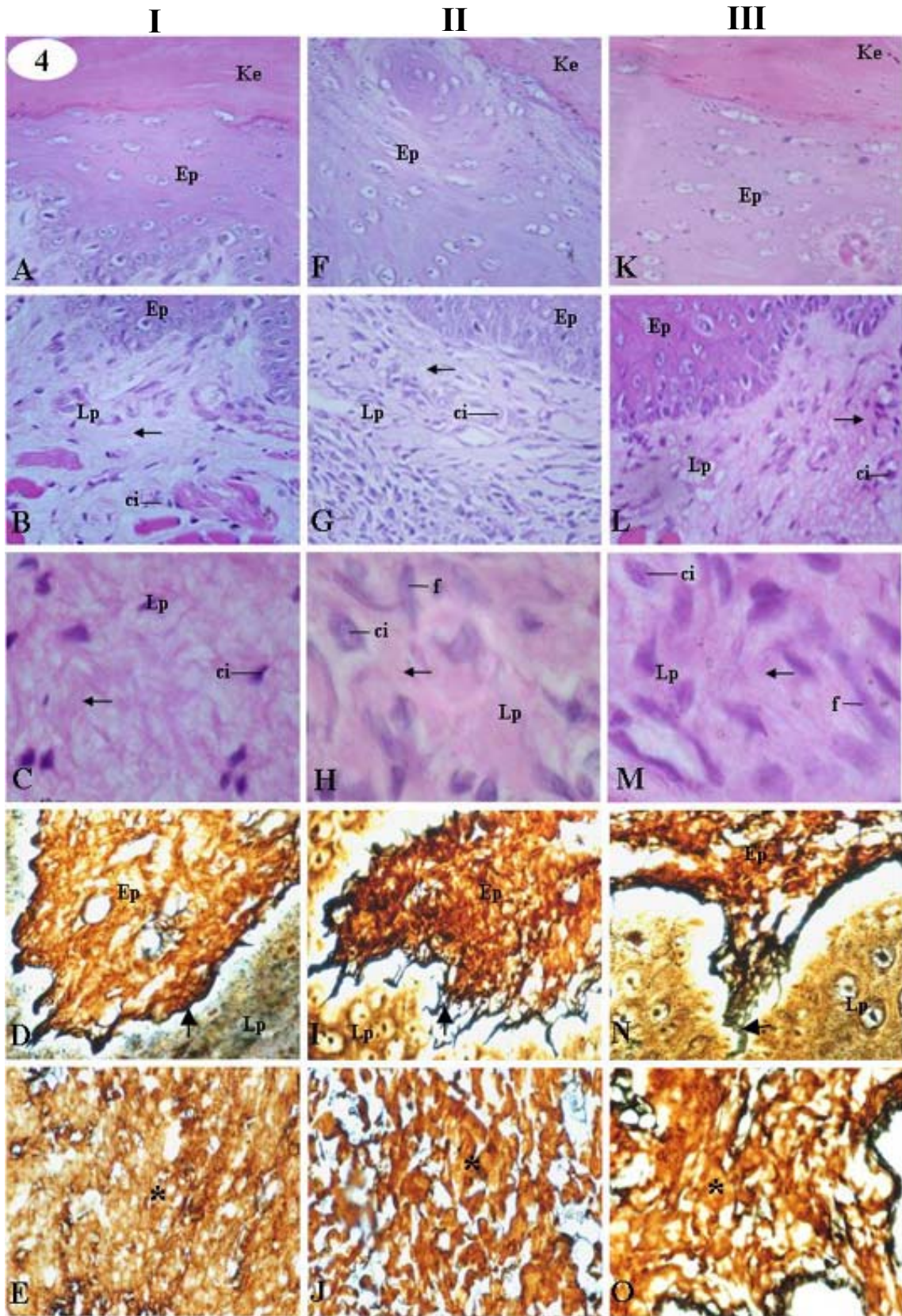
Note que há maior quantidade de células inflamaórias e os fibroblastos se tornam mais evidentes no decorrer da inflamação; as fibras reticulares parecem desorganizadas na foto **N** (30 dias de inflamação) e fibras de colágeno tipo I apresentam características mais densas no decorrer da inflamação.

O tecido periodontal gengival dos animais diabéticos é semelhante ao epitélio gengival normal, formado por espessa camada de epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Todavia, as diferentes camadas epiteliais não puderam ser individualizadas como nos grupos normais (**Figura 4 A**). Além disso, a camada córnea demonstrou-se aumentada com relação aos animais controles (**Figura 6B**) e com característico processo de descamação. Papilas dérmicas similares (**Figura 4 A**) e de comprimento maior (**Figura 7**) às descritas nos controles foram verificadas.

O tecido conjuntivo mostrou-se semelhante aos controles e sem diferenças qualitativas significativas entre os grupos (**Figura 4 B e C**).

Durante a progressão da doença periodontal, os fibroblastos tornaram-se mais evidentes na lâmina própria, tanto em animais normais (**Figura 3H e 3M**) quanto em diabéticos (**Figura 4H e 4M**). Assim como as fibras de colágeno tipo I, que com a cronificação da inflamação, mostraram-se cada vez mais densas e sem a organização preferencial no conjuntivo (**Figura 3J e 3O**), diferentes dos controles (**Figura 3E**). Entretanto, nos animais diabéticos com o decorrer do processo inflamatório ocorreu maior desestruturação, uma vez que a densidade das fibras de colágeno tipo I adquiriram aspecto mais espesso e demonstraram-se espaçadas entre si com o avanço da inflamação, gerando grandes espaços aparentemente vazios nas áreas anteriormente preenchidas por tecido conjuntivo (**Figura 4J e 4O**).

Trinta dias após a indução da ligadura em animais normais a inflamação foi responsável por remodelamento e degradação das fibras reticulares dispostas junto da membrana basal (**Figura 3N**). Esta desestruturação e aparente degradação das fibras reticulares ocorreu mais precocemente nos animais diabéticos, sendo iniciada aos 15 dias (**Figura 4I**), com progressão mais acentuada aos 30 dias (**Figura 4N**), uma vez que, apresentaram-se maiores, mais distorcidas e individualizadas quando comparadas com os controles.



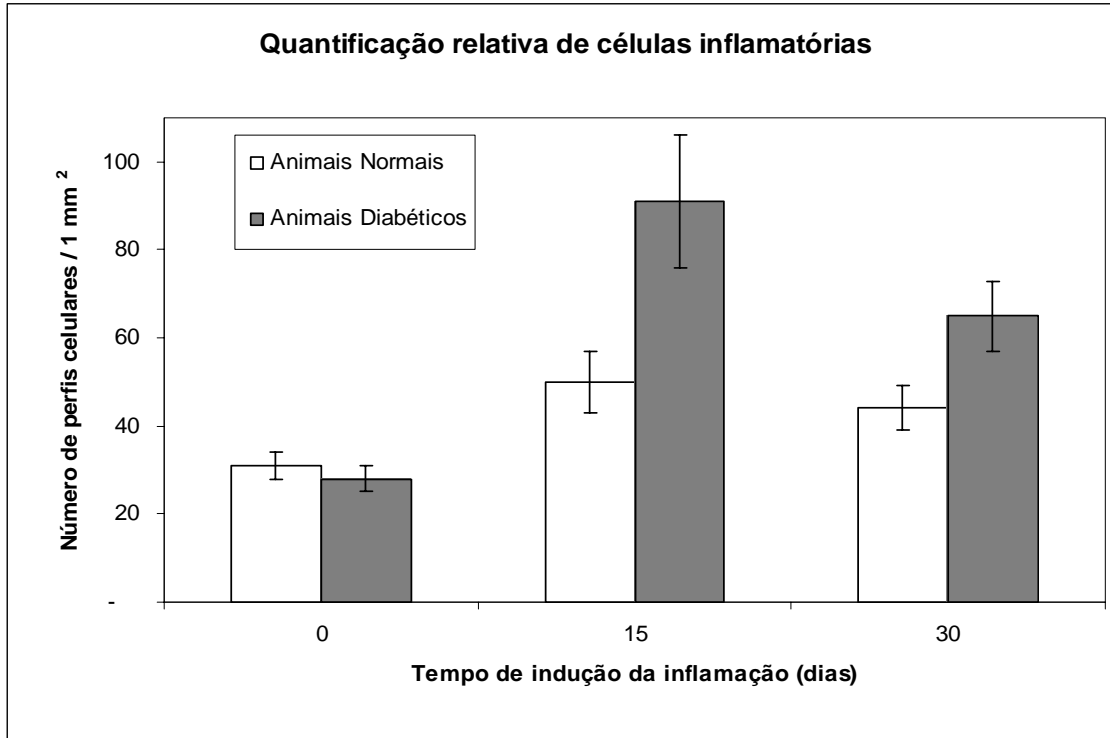
**Figura 4:** Fotomicrografia da gengiva de ratos diabéticos. **Coluna I (A, B, C, D e E)** animais sem ligadura; **Coluna II (F, G, H, I e J)**, animais com 15 dias de ligadura e **Coluna III (K, L, M, N e O)** animais com 30 dias de ligadura. **A, B, C, F, G, H, K, L e I** cortes coarados por HE e **D, E, I, J, N e O** corados com impregnação por prata. **A, B, F, G, K e L** possuem aumento de 400X e **C, D, E, H, I, J, M, N e O** aumento de 1000X.

**(Ke)** camada córnea ou queratinizada. **(Ep)** epitélio. **(Ke + Ep)** epitélio gengival. **(Lp)** lâmina própria. **(ci)** célula inflamatória. **(f)** representa fibroblasto. (→) fibras do tecido conjuntivo nas fotos **C, H e M**. (→) fibras reticulares junto à membrana basal nas fotos **D, I e N**. (\*) fibras de colágeno tipo I.

Note que há maior quantidade de células inflamaórias e os fibroblastos se tornam mais evidentes no decorrer da inflamação; as fibras reticulares parecem desorganizadas nas fotos **I e N** (15 e 30 dias de inflamação respectivamente) e fibras de colágeno tipo I apresentam características mais densas no decorrer da inflamação, porém, apresentando espaços aparentemente vazios entre elas.

A ligadura induziu resposta inflamatória com migração de células inflamatórias para o tecido conjuntivo do periodonto. As análises entre os períodos experimentais de doença periodontal revelaram que, os animais normais apresentaram uma cinética de migração diferente dos animais diabéticos.

Os animais normais tiveram o número de células inflamatórias aumentado após o estímulo inflamatório (aproximadamente 50% maior que os controles), que manteve-se aproximadamente constante com a cronificação da doença periodontal (**Figura 5**). Enquanto animais diabéticos apresentaram migração exacerbada de células para o tecido (1,8 e 1,3 vezes maior que os controles no décimo quinto dia e trigésimo respectivamente), a cinética de migração celular pode ser representada nesse grupo por um pico de células inflamatórias aos 15 dias de inflamação, o que difere do grupo normal (**Figura 5**).

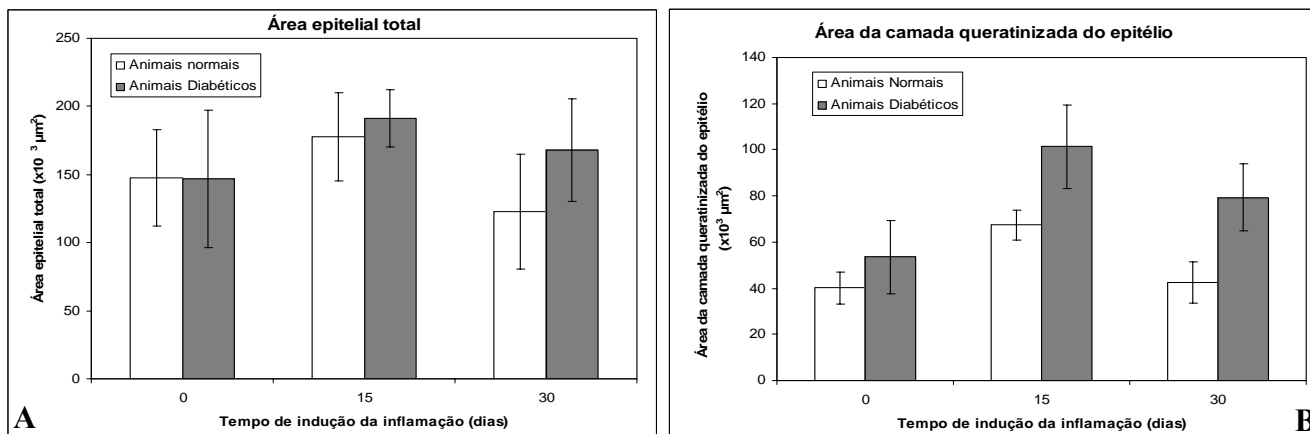


**Figura 5:** Alterações correspondentes ao número de perfis celulares inflamatórios/mm<sup>2</sup>, relativas aos animais controles (grupo normal aos 0 dias de inflamação), encontradas na extensão do tecido conjuntivo gengival, durante os tempos de inflamação em animais normais e diabéticos. Estatisticamente há diferenças significativas entre animais normais e diabéticos no geral ( $p < 0,05$ ), entretanto, não há diferenças entre animais normais e diabéticos aos 0 dias de inflamação e entre normais aos 15 e 30 dias de inflamação ( $p > 0,05$ ).

O tecido epitelial oral foi afetado pela inflamação, embora não tenha tido diferença significativa na área ocupada por esse tecido nos diferentes grupos e períodos experimentais (**Figura 6A**). Entretanto, a área da camada queratinizada ou córnea do epitélio oral revelou que houve diferença entre animais diabéticos e não diabéticos bem como entre os tempos de inflamação (**Figura 6B**).

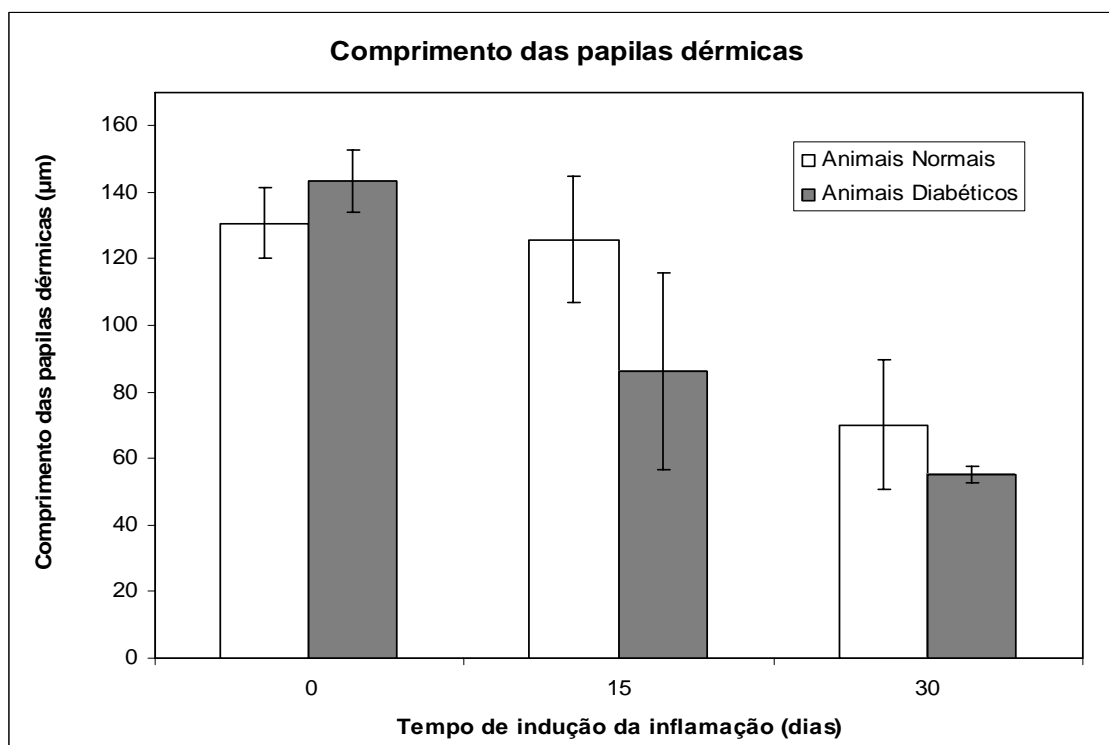
Animais normais tiveram aumento de 68% da camada córnea no 15º dia de ligadura, que, todavia, sofreu redução no 30º dia, retornando quase ao normal. Embora o perfil de crescimento nos animais diabéticos tenha sido o mesmo, com pico no 15º dia da ligadura, esta camada córnea apresentou-se maior em todos os períodos experimentais (34%, 1,5 vezes e 98% maior que a camada córnea dos controles aos 0, 15 e 30 dias de inflamação respectivamente) (**Figura 6B**).

Deste modo, devido ao aumento da camada córnea em diabéticos, mas com constante área epitelial total nos grupos normais e diabéticos, evidenciou-se que houve um achatamento das camadas: basal, espinhosa e granulosa, e diferença de relação entre a camada córnea e as demais em diabéticos.



**Figura 6:** Comparação das áreas total do epitélio e da camada queratinizada epitelial durante 0, 15 e 30 dias de inflamação em animais normais e diabéticos. **(A)** Gráfico comparando a variação relativa ao tempo controle do tamanho da área epitelial total dos animais nos diferentes dias de inflamação. Não há diferenças significativas entre diabéticos e normais e nem entre os tempos de inflamação. **(B)** Gráfico comparando a variação relativa ao tempo controle do tamanho da área da camada queratinizada epitelial dos animais nos diferentes dias de inflamação. Estatisticamente há diferenças significativas entre animais diabéticos e normais e entre os tempos de inflamação ( $p < 0,05$ ).

A altura das papilas dérmicas com relação aos animais controles, diminuiu significativamente com o avanço da doença periodontal, tanto em animais normais quanto em diabéticos. Normais tiveram diminuição de 4% e 47% aos 15 e 30 dias de inflamação, respectivamente, enquanto em diabéticos o processo inflamatório foi mais agressivo, mostrando diminuição de 34% e 58% aos 15 e 30 dias de inflamação, respectivamente. Todavia, em animais diabéticos, mesmo na ausência do estímulo inflamatório houve um aumento no comprimento das papilas dérmicas (9%).



**Figura 7:** Comparação da variação relativa ao tempo controle da altura das papilas dérmicas dos animais normais e diabéticos nos diferentes dias de inflamação. Estatisticamente há diferenças significativas, assim como interação, entre animais diabéticos e normais e entre os tempos de inflamação

Em diabéticos também não foi possível a identificação dos diferentes estratos celulares que compõe o tecido epitelial aos 15 e 30 dias de inflamação, que muitas vezes formaram figuras concêntricas (**Figura 4F e 4K**).

## DISCUSSÃO

A elevada prevalência de doenças periodontais na população humana, torna fundamental a necessidade da compreensão da sua causa e progressão, tornando mais importante a sua interrelação com doenças inflamatórias crônicas como o diabetes (TAYLOR 2001).

O Diabetes Tipo I está associado com alterações da resposta imune, resposta inflamatória e síntese da matriz extracelular (XUE *et al.* 2005). No presente estudo, a caracterização clássica do diabetes foi obtida com sucesso pelo tratamento dos ratos com STZ. As doses usadas foram suficientes para obtenção e manutenção do estado diabético até o final do experimento. Esses animais sobreviveram sem suplementação insulínica, mostraram um considerável aumento dos níveis



glicêmicos e glicosúria, além de todos os sintomas clínicos característicos da patologia, como: falta de ganho ponderal, sede intensa, apatia e poliúria, sendo a diferença no tamanho e peso dos animais bem marcantes quando comparados com os controles de mesma idade, deste modo, nossos resultados confirmam dados descritos na literatura (GYÖRFI *et al.* 1996; CONGET 2002; HOLZHAUSEN *et al.* 2004).

O periodonto fornece o suporte necessário para o dente manter-se fixo e conseqüentemente desempenhar sua função adequada. Dentre seus componentes, a gengiva é a primeira a ser afetada pelo acúmulo de placa e, com apenas 3-4 dias, a resposta inflamatória já inicia a destruição do tecido. Histologicamente é composta por dois distintos componentes – os tecidos epitelial e conjuntivo. Enquanto o epitélio gengival é predominantemente celular, o tecido conjuntivo é pouco celularizado e é composto primariamente de uma rede integrada de fibras e proteínas não fibrosas (BARTOLD *et al.* 2000-2006).

A utilização da linha de algodão para efetuar a ligadura em torno dos molares inferiores descrita por Johnson em 1975 foi eficiente na indução da doença periodontal experimental, utilizando o modelo murino. Este fio de algodão favorece a formação da placa bacteriana e induz resposta inflamatória mimetizando a doença periodontal humana. No presente estudo caracterizou-se a doença periodontal pelo aparecimento dos sinais clínicos de uma resposta inflamatória gengival, com edema, vermelhidão e perda de adesão da gengiva ao dente. Nos animais diabéticos verificou-se agravamento da resposta demonstrada por flacidez tecidual, gengiva inflamada com resistência à tração diminuída e menor adesão ao dente. Esses sinais provavelmente foram em resposta à migração de células inflamatórias para o tecido conjuntivo.

Estruturalmente demonstrou-se cronificação da inflamação, pelo aumento de células inflamatórias, acúmulo de fibras colágenas densas, aumento aparente da quantidade de fibroblastos, degradação de fibras reticulares que sustentam a membrana da basal, involução das papilas dérmicas e dificuldade de descamação da camada córnea. Esses dados caracterizaram degradação e fibrose. O processo fibrótico mostrou-se acentuado com o avanço da inflamação e afetou também a regeneração epitelial.

O processo inflamatório e fibrose foram mais intensos em diabéticos. Eles demonstraram degradação maior e mais rápida de fibras colágenas, com processo de fibrose diferenciado; maior infiltrado inflamatório, responsável pela destruição tecidual mais agressiva; involução das papilas dérmicas mais acentuada e aumento da camada córnea. A inflamação comprometeu o tecido epitelial e

conjuntivo de diabéticos de forma mais agressiva que os animais normais, mostrando seu epitélio aparentemente sem distinção entre as camadas basal, espinhosa e granulosa e visivelmente notando-se projeção do conjuntivo por falta da resistência característica do tecido epitelial, que mostrou-se tão prejudicado com a doença.

Inúmeras evidências literárias justificam a maior propensão para o desenvolvimento e caracterização mais agressiva da doença periodontal em indivíduos diabéticos. Eles têm maior propensão a infecções bacterianas e oportunistas devido a uma desordem circulatória generalizada, com prejuízo à resposta leucocitária, levando à diminuição da habilidade microbicida de leucócitos polimorfonucleares e falência na entrega de componentes do sistema imune humoral e celular (BENDER & BENDER 2003). Há inibição da quimiotaxia de leucócitos no sangue periférico, defeitos na fagocitose e morte bacteriana, aumentando a suscetibilidade dos pacientes (CUTLER *et al.* 1991; OLIVER & TERVONEN 1994). Segundo SAITO *et al.* (2004) a periodontite tem maior incidência em pacientes diabéticos, além de agravar o quadro geral patológico.

Além disso, há indícios de que o Diabetes Mellitus aumenta a glicose salivar e crevicular, o que pode influenciar a microflora oral, causando aumento no desenvolvimento de cáries e periodontites (BENDER & BENDER 2003).

Por todas essas características, o paciente com diabetes mal controlado, de longa data e idade avançada, tende a ter aumento do risco de acúmulo da placa e cálculo, podendo levar a uma doença periodontal mais severa, com aceleração na reabsorção do osso alveolar, maior facilidade da ruptura do ligamento periodontal e aumento na incidência de formação de bolsas periodontais, que se apresentam mais profundas e mais freqüentes (HOVE & STALLARD 1970; OLIVER & TERVONEN 1993; MEALEY 2000; PERSSON *et al.* 2003).

Sabe-se que o epitélio gengival (principalmente o sulcar) desempenha função muito importante na proteção e defesa do indivíduo. As células epiteliais são metabolicamente ativas e capazes de reagir a um estímulo externo sintetizando citocinas, moléculas de adesão, fatores de crescimento e enzimas (BARTOLD *et al.* 2000).

Embora os epitélios juncional e sulcar, que estão em contato direto com a placa bacteriana e não são queratinizados, sejam os responsáveis pelo início do processo inflamatório em resposta ao estímulo bacteriano (BARTOLD *et al.* 2000), a cronificação doença periodontal neste estudo, pôde ser analisada também na região mais externa do epitélio (epitélio oral), através do aumento da camada queratinizada

deste tecido, além da diminuição das papilas dérmicas (em ambos os tipos epiteliais), mostrando que a inflamação não se limitou apenas às regiões em contato com a placa.

Sabe-se também que indivíduos diabéticos têm maior espessura da parede de vasos causada pelo acúmulo de glicoproteínas anômalas (placas de ateroma) como resultado de um processo de glicação de endoprodutos, associado a uma diminuição do catabolismo de colágeno, o que reduz a absorção de nutrientes e oxigênio, danifica a resposta leucocitária, levando a prejuízos da resposta imune (MEALEY 2000; PONTE *et al.* 2001; BENDER & BENDER 2003).

De acordo com CALDEIRA *et al.* (2004), em animais diabéticos, as cristas epiteliais e células basais têm o citoplasma e volume nuclear reduzidos. E segundo AÇIKGOZ *et al.* 2004 a atividade mitótica da camada basal do epitélio gengival é aumentada nesses pacientes e o depósito de glicogênio e produtos intermediários são usados no lugar da glicose aeróbica, isso faz com que aumente a atividade mitocondrial e os produtos protéicos usados na queratinização.

Todas essas informações justificam os dados deste trabalho, que mostrou a prejudicada diferenciação e desenvolvimento das células das camadas espinhosa e granulosa, com aparente involução e diminuição dos seus números celulares, e aumento da camada córnea durante a cronificação da inflamação em diabéticos.

A lâmina própria da submucosa que suporta o epitélio é formada pelo tecido conjuntivo frouxo pouco espesso. É de consistência delicada, flexível e pouco resistente às trações. A matriz extracelular é rica em proteoglicanas, proteínas e glicoproteínas (como colágenos, elastina e fibronectinas). As fibras que formam o tecido conjuntivo frouxo são de três tipos principais: colágenas, reticulares e elásticas, sem predomínio acentuado entre elas, sendo uma rede com papel de aderência e de filtração, associadas a poucos fibroblastos espaçados e várias células inflamatórias, principalmente macrófagos, comuns dessa região (BARTOLD *et al.* 2000).

De acordo com CHAMMAS (1998), os diferentes elementos da matriz interagem de maneira complexa, sendo que os processos de remodelação são intrincados processos bioquímicos, baseados no balanço entre síntese e degradação, regulados em diferentes níveis. O estroma intersticial encontra-se em contínuo *turn-over* e distúrbios deste processo normal podem levar a uma série de alterações teciduais, coletivamente chamadas de reação estromal. Quando a síntese predomina sobre a degradação, quadros de acúmulo de matriz extracelular são observados, por exemplo, em fibroses e elastoses, facilmente identificadas em uma série de doenças infecciosas ou inflamatórias.

Podem ocorrer diferenças na remodelação tecidual da matriz extracelular de diabéticos devido a redução da síntese e maturação do colágeno e atividade aumentada da colagenase (HOLZHAUSEN *et al.* 2004), características essas que justificam os dados deste trabalho e que associadas a outras deficiências também encontradas em diabéticos, justificam a severa destruição periodontal.

Devido ao processo de degradação da matriz extracelular observado neste estudo durante os dias de inflamação analisados, pode-se justificar a involução das papilas dérmicas vista aqui, sendo que essa degradação prejudica a sustentação da base epitelial que com o avanço da doença vai perdendo a conformação e eficiência. Como em diabéticos a degradação de alguns componentes da matriz foi maior e houve redução da síntese e maturação do colágeno com atividade aumentada da colagenase, isso demonstra o padrão diferencial de involução das papilas nesses animais.

Nosso estudo permitiu a elucidação de aspectos morfológicos que medeiam a patologia desenvolvida, buscando esclarecer processos biológicos e encontrar ferramentas de potencial utilização diagnóstica ou mesmo terapêutica.

Assim, conclui-se que a doença periodontal levou a expressivas mudanças no sistema de sustentação promovido pelo tecido conjuntivo, assim como das camadas proliferativa e funcionais do epitélio, influenciadas e prejudicadas pelo diabetes. Houve modificação no curso de mecanismos de reparo da lâmina basal e epitelial frente à processos inflamatórios, que tornaram-se mais lentos e prejudicados com o diabetes, afetando os mecanismos de sustentação e reparo epitelial, os processos de reposição celular, revestimento e proteção, comprometendo a homeostase bucal.

## REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AÇIKGOZ, G.; DEVRIM, I & ÖZDAMAR, S. **2004**. Comparison of keratinocyte proliferation in diabetic and non-diabetic inflamed gingiva. *J Periodontol*, 75: 989-994.
- BAKER, P.J. **2005**. Genetic control of the immune response in pathogenesis. *J Periodontol*, 76: 2042-2046.
- BARTOLD, P.M.; WALSH, L.J. & NARAYANAN, A.S. **2000**. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontology* 2000, 24: 28-55.
- BARTOLD, P.M. & NARAYANAN, A.S. **2006**. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontology* 2000, 40: 29-49.
- BENDER, I.B. & BENDER, A.B. **2003**. Diabetes mellitus and the dental pulp. *J Endodon*, 29(6): 383-389.

- CALDEIRA, E.J.; GARCIA, P.J.; MINATEL, E.; CAMILLI, J.C. & CAGNON, V.H.A. **2004**. Morphometric analysis and ultrastructure of the epithelium of the mucosa in diabetic autoimmune NOD mice. *Braz J Morphol Sci*, 21: 930-937.
- CARSON, K.A. **1979**. Citochemical and cytopathological studies of nerve, vascular and salivary gland tissues in a hereditary mouse model for diabetes mellitus. A dissertation submitted to the faculty on the University of North Carolina at Chapel Hill.
- CHAMMAS, R. **1998**. Aspects of physiopathology of sarcoma dissemination. *Acta Oncol Bras*, 18 (1): on-line.
- COLEMAN, J.W. **2001**. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol*, 1(8): 1397-1406.
- CONGET, I. **2002**. Diagnosis, classification and pathogenesis of diabetes mellitus. *Rev Esp Cardiol*, 55: 528-538.
- CUTLER, C.W.; EKE, P.; ARNOLD, R.R. & DYKE, T.E.V. **1991**. Defective neutrophil function in an insulin-dependent diabetes mellitus patient – a case report. *J Periodontol*, 62: 394-401.
- GARLET, G.P.; MARTINS Jr, W.; FONSECA, B.A.L.; FERREIRA, B.R. & SILVA J.S. **2004**. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 31: 671-679.
- GHADA, N.; AL-MASHAT, H.; DESTA, T. & GRAVES. **2004**. Diabetes prolongs the inflammatory response to a bacterial stimulus through cytokine dysregulation. *J Invest Dermatol*, 123: 87-92.
- GYÖRFI, A.; FAZEKAS, Á.; FEHÉR, E.; ENDER, F. & ROSIVALL, L. **1996**. Effects of streptozotocin – induced diabetes on neurogenic inflammation of gingivomucosal tissue in rat. *J Periodont Res*, 31: 249-255.
- HOLZHAUSEN, M.; GARCIA, D.F.; PEPATO, M.T. & MARCANTONIO JR, E. **2004**. The influence of short-term diabetes mellitus and insulin therapy on alveolar bone loss in rats. *J Periodont Res*, 39: 188-193.
- HOVE, K.A. & STALLARD, R.E. **1970**. Diabetes and the periodontal patient. *J Periodontol*, 41: 713-718.
- JOHNSON, I.H. **1975**. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *J Periodontal Res*, 10 (6): 332-345.
- KORNMAN, K. S. **2001**. Patients are not equally susceptible to periodontitis: does this change dental practice and the dental curriculum? *J Dent Educ*, 65 (8): 777-784.

- LAPPIN, D.F.; MACLEOD, C.P.; KERR, A.; MICHELL, T. & KINANR, D. **2001**. Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. *Clinical & Experimental Immunology*, 123(2): 294-300.
- LISTGARTEN, M. A. **1986**. Pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol* 13: 418-425.
- MEALEY, B. Position Paper. **2000**. Diabetes and periodontal disease. *J Periodontol*, 71: 664-678.
- MICHALOWICZ, B. S. **1994**. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *J Periodontol*, 65: 479-488.
- OLIVER, R.C. & TERVONEN, T. **1993**. Periodontitis and tooth loss: comparing diabetes with the general population. *J Am Dent Assoc*, 124: 71-76.
- OLIVER, R.C. & TERVONEN, T. **1994**. Diabetes – a risk factor for periodontitis in adults? *J peiodontol*, 65: 530-538.
- PAPAPANOU, P.N.; WENNSTRÖM, J.L. & GRÖNDAHL, K. **1989**. A ten-year retrospective study of peridontal disease progression. *J Clin Periodontol*, 16: 403-411.
- PERSSON, R.E.; HOLLENDER, L.G.; MACENTEE, M.I.; WYATT, C.C.L.; KIYAK, H. A. & PERSSON, G.R. **2003**. Assessment of periodontal conditions and systemic disease in older subjects – focus on diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*, 30: 207-213.
- PONTE, E.; TABAJ, D.; MAGLIONE, M. & MELATO, M. **2001**. Diabetes mellitus and oral disease. *Acta Diabetol*, 38: 57-62.
- RITZ, E. **2002**. Consequences of late referral in diabetic renal disease. *Acta Diabetol*, 39: 3-8.
- ROBBINS, S.L. **1989**. Doenças sistêmicas. In: *Diabetes mellitus. Patologia estrutural e funcional*. W.B. Saunders Company, 238-250.
- SAITO, T.; SHIMAZAKI, Y.; KIYOHABA, Y.; KATO, I.; KUBO, M.; LIDA, M. & KOGA, T. **2004**. The severity of periodontal disease is associated with the development of glucose intolerance in non-diabetics: The Hisama study. *J Dent Res*, 83(6): 485-490.
- SIGUSCH, B.; EICK, S.; PFISTER, W.; KLINGER, G. & GLOCKMAN, E. **2001**. Altered chemotactic behavior of crevicular PNMs in different forms of periodontitis. *J Clin Periodontol*, 28: 162-167.
- SOUTHERLAND, J.H.; TAYLOR, G.W.; MOSS, K.; BECK, J.D. & OFFENBACHER, S. **2006**. Commonality in chronic inflammation diseases: periodontitis, diabetes, and coronary artery disease. *Periodontology* 2000, 40: 130-143.
- TAANI, D. S. **1997**. Association between cigarette smoking and periodontal health. *Quintessence Int*, 28 (8): 535-539.

- TAYLOR, G.W. **2001**. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann periodontal*, 6(1): 99-112.
- TODESCAN, J. H. **2001**. Doença Periodontal. Conceitos e classificações. Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda.
- VILAMAIOR, P.S.; FELISBINO, S.L.; TABOGA, S.R.; CARVALHO, H.F. **2000**. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. *The Prostate*, 1, 45(3): 253-8.
- WADA, L.Y. **2002**. Contagem de carboidratos: mais fácil que contar até 3. Editora Ateneu. São Paulo, 3-25.
- WILSON, T. G. **1999**. Not all patients are the same: systemic risk factors for adult periodontitis. *Gen Dent*, 47 (6): 580-588.
- XUE, M.; THOMPSON, P.J.; CLIFTON-BLIGH, R.; FULCHER, G.; GALLERY, E.D.M. & JACKSON, C. **2005**. Leukocyte matrix metalloproteinase-9 is elevated and contributes to lymphocyte activation in type I diabetes. *J Biochem and Cell Biol*, 37: 2406-2416.

**INFLUÊNCIA DO DIABETES TIPO I NA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DAS GELATINASES:  
MMP 2 E MMP 9 NA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA**

Juliete A. Francisco da Silva<sup>1</sup>, Márcio Lorencini<sup>1</sup>, Luis Antonio Peroni<sup>1</sup>, Cristiane Lucia R. de la Hoz<sup>2</sup>,  
Hernandes F. Carvalho<sup>2</sup> & Dagmar Ruth Stach-Machado<sup>1</sup>

1. Departamento de Microbiologia e Imunologia

2. Departamento de Biologia Celular

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Campinas SP, Brasil

**Correspondências para:** Dagmar Ruth Stach-Machado

Departamento de Microbiologia e Imunologia – Universidade Estadual de  
Campinas (UNICAMP)

CP 6109

13083-863 Campinas SP, Brazil

Phone: 55 19 3788 6265

Fax: 55 19 3788 6276

E-mail: [dmachado@unicamp.br](mailto:dmachado@unicamp.br)



## RESUMO

A doença periodontal caracteriza um grupo de lesões que afetam os tecidos que rodeiam e suportam os dentes nos seus alvéolos, sendo a doença crônica de maior incidência na dentição humana. Embora a placa bacteriana seja seu agente etiológico principal, é a resposta imune exacerbada o fator preponderante para o agravamento das lesões, que leva à degradação da matriz extracelular decorrente da liberação desbalanceada de substâncias inflamatórias. Entre os fatores de risco, o diabetes mellitus é um agravante de grande importância para o desenvolvimento, progressão e severidade da doença periodontal.

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência do diabetes na doença periodontal experimental, avaliando degradação da matriz extracelular através da análise da expressão gênica e protéica das MMPs 2 e 9. Para isso foram realizados estudos de imunofluorescência, quantificações da atividade gelatinolítica por zimografia e quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real. Foram utilizados ratos Wistar machos, os quais foram divididos em grupo normal e diabético, sendo avaliados 0, 15 e 30 dias após a indução da doença periodontal através da ligadura.

As MMPs 2 e 9, ambas foram localizadas em células epiteliais, endotélio de vasos e células do tecido conjuntivo. O mesmo perfil de expressão enzimática foi visto entre as MMPs 2 e 9, com pico de atividade aos 15 dias de inflamação, tanto em animais normais quanto em diabéticos, entretanto, em diabéticos a atividade gelatinolítica após estímulo inflamatório foi menor para MMP 2 e maior para MMP 9. A expressão gênica da MMP 2 decaiu com a inflamação em ambas as situações, já a MMP 9 aumentou sua expressão em animais normais após a inflamação, enquanto teve expressão diminuída com a inflamação em diabéticos.

Os resultados obtidos sugerem o envolvimento das MMPs 2 e 9 na dinâmica do tecido periodontal, as variações nos seus níveis de expressão resultam em diferentes padrões de fibrose nos animais normais e diabéticos.

**Palavras chaves:** Diabetes Mellitus, doença periodontal experimental, estreptozotocina, inflamação, MMP2, MMP9, matriz extracelular.

## INTRODUÇÃO

A doença periodontal promove a destruição progressiva dos tecidos periodontais, sendo caracterizada por uma resposta inflamatória crônica à placa bacteriana (LINDHE 1999). As bactérias liberam enzimas proteolíticas capazes de lesionar os tecidos periodontais, mas essa atividade não é o suficiente para desencadear a doença periodontal. É a resposta imune do hospedeiro contra a placa bacteriana e seus produtos que determina a susceptibilidade à doença pelo aumento de secreção de citocinas inflamatórias (POTEMPA *et al.* 2000).

A degradação tecidual do periodonto decorre da liberação desbalanceada de substâncias (como quimiocinas e proteases, além de seus ativadores e inibidores) produzidas e sintetizadas pelas células residentes nas proximidades da infecção ou por células inflamatórias recrutadas (PAGE & SCHROEDER, 1976; LISTGARTEN, 1986; SEGUIER *et al.*, 2000 e 2001; LIU *et al.*, 2001; EJEIL *et al.*, 2003).

Dentre as proteases devem ser destacadas as metaloproteinases de matriz (MMPs), as quais são caracterizadas pela dependência de íons metálicos (normalmente zinco ou cálcio) e pela sua capacidade de degradar proteínas da matriz extracelular como o colágeno, a elastina, a laminina, a fibronectina e os proteoglicanos, em diversos processos fisiológicos e patológicos (BIRKEDAL-HANSEN *et al.*, 1993; STERNLICHT & WERB 2001).

Dentre as MMPs, as gelatinases (MMP 2 e MMP 9) estão sendo muito estudadas por serem as principais responsáveis pela degradação proteolítica da matriz extracelular e por contribuir com a invasão e metastase tumorais devido à sua capacidade de degradar o colágeno do tipo IV presente na membrana basal (BOK *et al.* 2003; BJÖRKLUND & KOIVUNEN 2005; WISEMAN *et al.* 2005), inclusive em cânceres relacionados à mucosa oral (de VICENTE *et al.* 2004; KATO *et al.* 2004; PATEL *et al.* 2005).

Na inflamação, a atividade proteolítica das gelatinases tem importante papel na regulação da atividade de quimiocinas. Por outro lado, a IL8, que é considerada a principal quimioatratante de neutrófilos, induz a liberação da MMP 9 pelas células (SOUZA *et al.* 2005), que por sua vez, potencializa a atividade biológica da IL8 em pelo menos 10 vezes. Isto resulta na eficiente amplificação do influxo de neutrófilos ao tecido inflamado (XUE *et al.* 2005).

Entre os agravantes para o desenvolvimento doença periodontal está o Diabetes Mellitus. Diabéticos apresentam maior propensão a infecções bacterianas e oportunistas (BENDER & BENDER 2003). O Diabetes é uma doença crônica, caracterizada principalmente pela ineficiência na produção ou utilização inadequada de insulina pelo organismo, afetando o metabolismo de proteínas, carboidratos e

gordura, resultando em severas desordens metabólicas (ROBBINS 1989; CONGET 2002; WADA 2002).

Estudos mostraram que os níveis de expressão de MMPs 2 e 9 são aumentados em diabéticos (MAXWELL *et al.* 2001; XUE *et al.* 2005). Sabe-se também que o equilíbrio entre MMPs e seus inibidores é fundamental para a indução do reparo de lesões. Deste modo, provavelmente o distúrbio deste equilíbrio leva à proteólise excessiva e ao retardo na cicatrização das úlceras dérmicas encontradas em diabéticos (KADOGLOU *et al.* 2005), o qual parece estar relacionado à ocorrência de bolsas periodontais mais profundas e mais freqüentes nesses pacientes (MEALEY 2000; PERSSON *et al.* 2003).

A MMP 9 é um fator permissivo de degradação de insulina, estando associada às complicações vasculares decorrentes da carência desse hormônio em diabéticos. Sabe-se também que níveis de glicose aumentados em diabéticos ativam a MMP 9 latente secretada por leucócitos. Em adição, MMP 9 abundante ativa MMP 2. Além disto, a MMP 9 também promove a proliferação de células T e contribui para a inflamação em diabéticos tipo I (XUE *et al.* 2005).

Considerando que o diabetes está associado com o agravamento da doença periodontal o objetivo deste trabalho foi avaliar como a doença periodontal induzida em ratos é influenciada pelo diabetes através da quantificação dos RNAs das MMPs 2 e 9, assim como localização tecidual destas enzimas por imunofluorescência e a quantificação de suas atividades gelatinolíticas por zimografia.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Obtenção e manutenção de animais***

Foram utilizados 78 ratos (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar), machos, adultos, pesando aproximadamente 120g, originários do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Grupos de 3 e 4 animais foram acomodados em gaiolas de propileno e mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, com padrão SPF (*Specific Pathogen Free*). Os animais foram mantidos em ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas e tiveram água *ad libitum* e alimentação granulada (Labina/Purina). Os procedimentos seguiram as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo

Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do Instituto de Biologia da UNICAMP (Protocolo número 649-1).

### ***Indução de diabetes***

O diabetes foi induzido por tratamento do agente diabetogênico estreptozotocina (STZ) (Sigma Chemical Co, Saint Louis MO, USA) (CARSON 1979), na dosagem de 65mg/Kg de peso do animal, diluído em 0,3ml de tampão citrato 1,0M pH 4,4, administrado por via intraperitoneal, em três doses com intervalo de sete dias entre cada, mantendo-se regularidade de horário. O estado diabético foi monitorado semanalmente através do nível de glicosúria utilizando a fita *Glucotest* (Roche Diagnosis, Mannheim, Germany), enquanto a glicemia foi avaliada em intervalos regulares utilizando sistema *Accu-Chek Active* (Roche Diagnosis), segundo as instruções do fabricante. Os animais normais foram inoculados com volumes equivalentes do tampão citrato utilizando a mesma via e mesmo número de doses.

### ***Indução da doença periodontal***

A indução da doença periodontal foi efetuada sob os efeitos da anestesia com cloridrato de ketamina e xilasina, cujas doses foram de 80mg e 10mg, respectivamente, por Kg de peso corpóreo, através da ligação de um fio de algodão número 10 amarrado bilateralmente ao redor dos primeiros molares inferiores, segundo o procedimento descrito por JOHNSON (1975).

### ***Delineamento experimental e obtenção de amostra***

Os animais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos: animais normais e animais diabéticos. Os quais foram sacrificados em três períodos distintos.

- 0 dias de inflamação ou sem indução de doença periodontal por ligadura
- 15 dias de inflamação ou indução de doença periodontal por ligadura
- 30 dias de inflamação ou indução de doença periodontal por ligadura

Nesse trabalho foram considerados animais controles aqueles que pertenciam ao grupo normal e não tiveram doença periodontal induzida.

Os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e imediatamente após, os fragmentos de mucosa gengival, adjacentes aos primeiros molares foram removidos com bisturi e processados de acordo com os ensaios posteriores.

### ***Imunofluorescência***

Os fragmentos obtidos foram imersos em meio *Tissue Tek*® (Sakura Finetek, Torrance CA, USA), mergulhados em nitrogênio líquido e armazenados em *freezer* a 80°C negativos. Posteriormente foram processados em criostato Microm modelo HM505E para obtenção de cortes com 7 µm de espessura. Foram utilizados os anticorpos policlonais de coelho anti MMP 2 e MMP 9 humanas (Chemicon, Temecula CA, USA) e o anticorpo secundário de cabra anti-imunoglobulina de coelho conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma Chemical Co.). Os cortes foram fixados com paraformaldeído 4%. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com a solução de bloqueio (Pierce, Rockford, UK). O anticorpo primário foi diluído 1:100 e o anticorpo secundário 1:40. Os núcleos das células foram contracolorados com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma Chemical Co.) e as lâminas foram montadas em glicerol/PBS (3:1) contendo 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octane (DABCO) (Sigma Chemical Co.), como protetor da fluorescência. A imunomarcação foi observada em um microscópio Nikon modelo 50i equipado com lâmpadas de mercúrio e de halogênio, e as imagens adquiridas através de uma vídeo-câmera Nikon DNX 1200F e do programa ATC-1. Os controles da reação foram realizados omitindo-se os anticorpos primários.

### ***Zimografia***

Os fragmentos gengivais foram triturados e a extração das proteínas realizada em tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 7.4; 0.2M NaCl; 0.1% Triton; 10mM CaCl<sub>2</sub> e 1% *protease inhibitor cocktail* (Sigma Chemical Co), com o auxílio de um triturador. A quantificação protéica total foi realizada de acordo com BRADFORD (1976), utilizando uma curva padrão de soro albumina bovino (BSA). A zimografia para análise da atividade das MMPs-2 e 9 foi realizada em gel de poliacrilamida 7,5% contendo gelatina 0,1%. Aproximadamente 70µg de proteína por amostra foram aplicadas no gel. Após eletroforese, o gel foi lavado à temperatura ambiente com 2.5% Triton X-100, incubado *overnight* em tampão 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 contendo 0.1 M NaCl e 0.03% azida sódica, a 37°C. O gel foi corado com *Coomassie brilliant blue*. As bandas correspondentes à atividade gelatinolítica puderam ser observadas após lavagem com solução contendo metanol (30%) e de ácido acético (10%). Os géis foram avaliados pela densitometria das bandas através do programa *Scion Image*.

### ***Desenho de oligonucleotídeos sintéticos***

As seqüências dos RNAs mensageiros dos genes MMP 2 e MMP 9 e  $\beta$ -actina (usado como controle endógeno da reação uma vez que, a sua expressão não é alterada com a doença periodontal) foram obtidas no banco público de dados da NCBI. Os oligonucleotídeos sintéticos foram desenhados com auxílio do *Gene Runner* e do programa acoplado ao sistema *ABI Prism 7000 Sequence Detection* (Amersham Bioscience, Woolston WA, UK).

**Tabela 1:** Pares de oligonucleotídeos para PCR quantitativo

<b>Gene</b>	<b>Primer forward (5'-3')</b>	<b>Primer reverse (5'-3')</b>	<b>Número de acesso (NCBI)</b>
<b>B-actina</b>	tctctgtggcatccatgaaaacta	ccagggcagtaatctccttctg	NM_031144.2
<b>MMP-2</b>	tgcgcttttctcgaatccat	aagtgagaatctccccaacac	NM_031054.1
<b>MMP-9</b>	tctctgggcgcaaaatgtg	atacgttcccggctgatcag	NM_031055.1

### ***Extração de RNA total, transcrição reversa e PCR em tempo real***

O RNA total do tecido foi extraído com o *kit* RNeasy Mini® (Qiagen, Austin TX, USA). Após quantificação e verificação da integridade das moléculas em gel de agarose 1,5%, a transcrição reversa foi efetuada utilizando 0,63 $\mu$ g de RNA total de cada amostra, seguindo o protocolo do *kit* M-MLV *Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Carisbad CA, USA). A quantificação do DNA complementar (cDNA) foi efetuada por espectrofotômetro de luz UV por meio da avaliação das absorbâncias a 260 nm e da relação entre as as absorbâncias a 260/280nm, respectivamente. As reações de PCR em tempo real foram realizadas com o sistema *ABI Prism 7000 Sequence Detection* e utilizando o *kit* SYBR Green PCR Master Mix® (Amersham Bioscience). O ensaio foi realizado com volume final de 25 $\mu$ l por reação, cada uma contendo: 150ng de cDNA, 10pmols de cada *primer*, 12,5 $\mu$ l de SYBR Green e o volume da reação ajustado com H<sub>2</sub>O *milli* Q. As reação foram realizadas utilizando 40 ciclos de 15 segundos a 95°C para denaturação, 1 minuto a 60°C para anelamento e 1 minuto a 75°C de extensão, seguido de mais 10 minutos a 75°C para o término da reação.

### ***Seqüenciamento dos fragmentos amplificados***

A especificidade da reação de PCR em tempo real foi confirmada através do sequenciamento dos fragmentos amplificados, sendo que após PCR e análise dos amplificados em gel de agarose 2%, os

produtos de reação sofreram precipitação com isopropanol 75% e etanol 70%. Os amplificadores foram aplicados no seqüenciador ABI 3100, (Applied Biosystem, Foster City CA, USA), utilizando-se o reagente Big Dye® e os mesmos *primers* descritos neste trabalho, porém em reações isoladas.

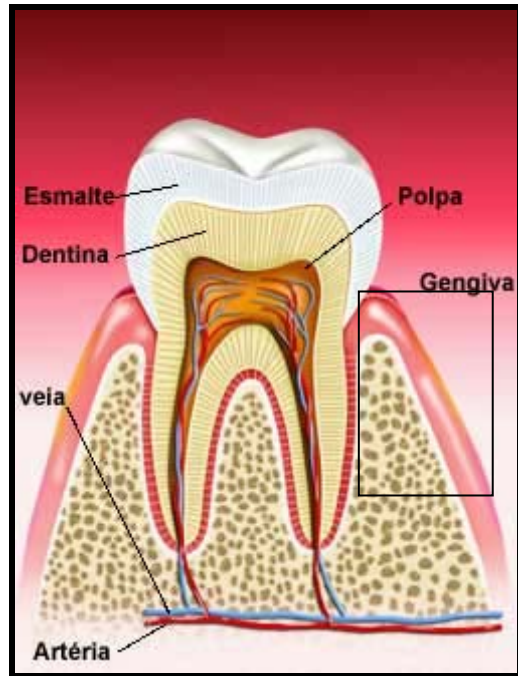
### ***Análise estatística***

As análises estatísticas dos dados foram realizadas por análise de variância Two-Way (ANOVA), usando o Teste F para determinar as diferenças entre os grupos de animais diabéticos e não diabéticos em diferentes dias da indução da doença periodontal. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Todos os testes foram feitos com o programa *Minitab 14 software*.

## **RESULTADOS**

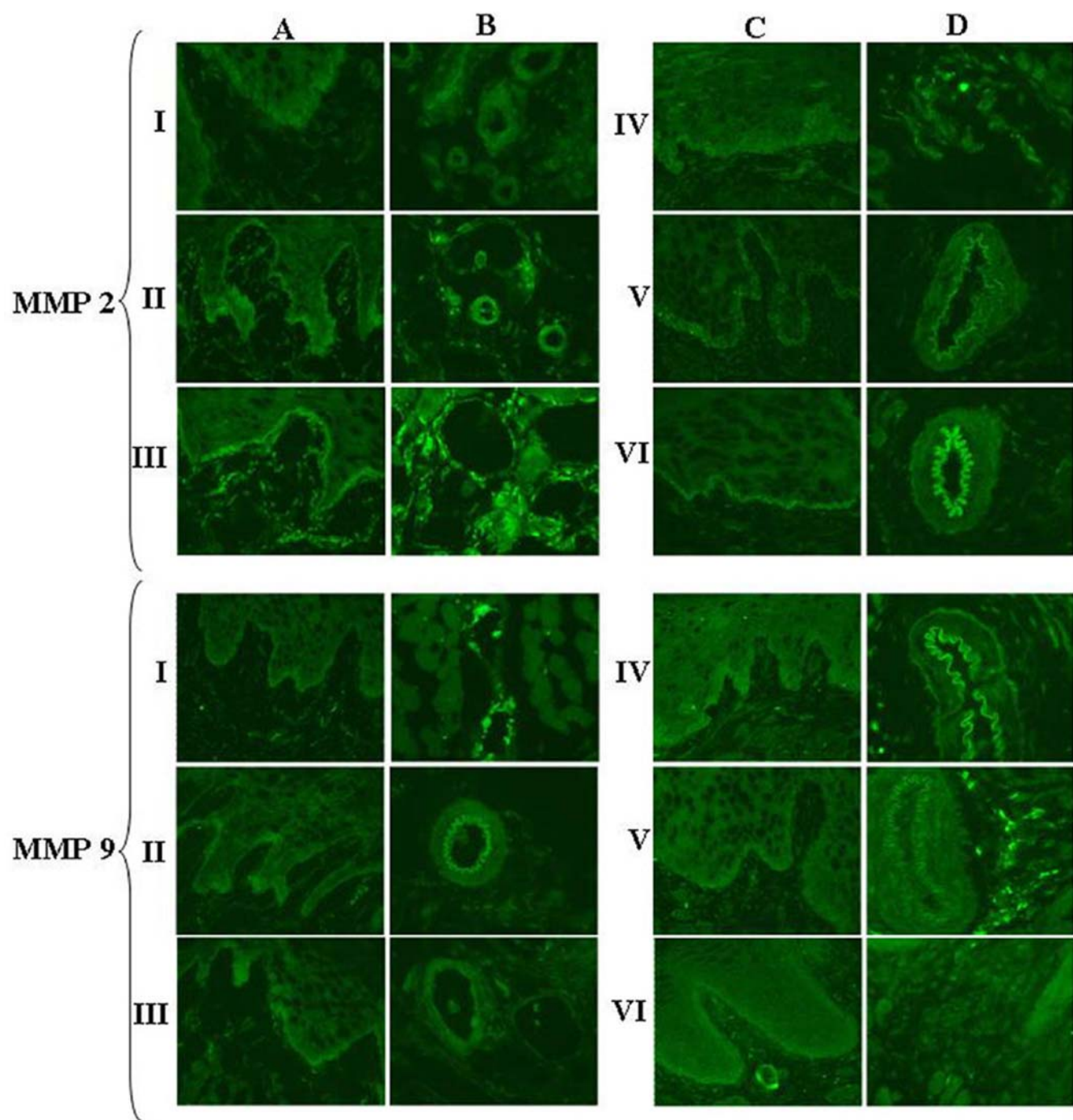
### ***Imunofluorescência***

No tecido periodontal gengival (**Figura 1**) de animais normais e diabéticos as MMPs 2 e 9 foram localizada nas células epiteliais, com marcação mais evidente nas células da camada basal (**Figura 2**), foi evidente a presença dessas MMPs no endotélio de vasos e células do tecido conjuntivo, provavelmente células inflamatórias e fibroblastos. Embora este padrão de imunofluorescência tenha sido encontrado em todos os tempos experimentais, a intensidade desta imunomarcação aumentou com o tempo de inflamação sugerindo uma maior expressão das MMPs 2 e 9 durante o processo inflamatório. Em animais diabéticos, a marcação de células epiteliais e do tecido conjuntivo, pela sua tonalidade, sugerem diferença de expressão para ambas as MMPs estudadas (**Figura 2**).



**Figura 1:** Descrição anatômica do dente no alvéolo. A parte vermelha dentro da área demarcada pelo retângulo indica o epitélio gengival coletado e analisado neste trabalho.





**Figura 2:** Imunofluorescência para MMP 2 e 9 (marcada em verde) com cortes de tecido gengival de animais normais (**Colunas A e B**) e diabéticos (**Colunas C e D**). **Linhas I** correspondem ao período controle. **Linhas II** correspondem a animais normais aos 15 dias de inflamação. **Linhas III** correspondem a animais normais aos 30 dias de inflamação. **Linhas IV** correspondem a animais diabéticos sem inflamação. **Linhas V** correspondem a animais diabéticos aos 15 dias de inflamação. **Linhas VI** correspondem a animais diabéticos aos 30 dias de inflamação. Fotos das **Colunas A e C** têm aumento de 200X e das **Colunas B e D** aumento de 400X. Note a marcação em verde mais forte na camada basal do epitélio, endotélio de vasos e células do tecido conjuntivo em todos os tempos experimentais e para ambas as MMPs.

### ***Quantificação da atividade enzimática por zimografia***

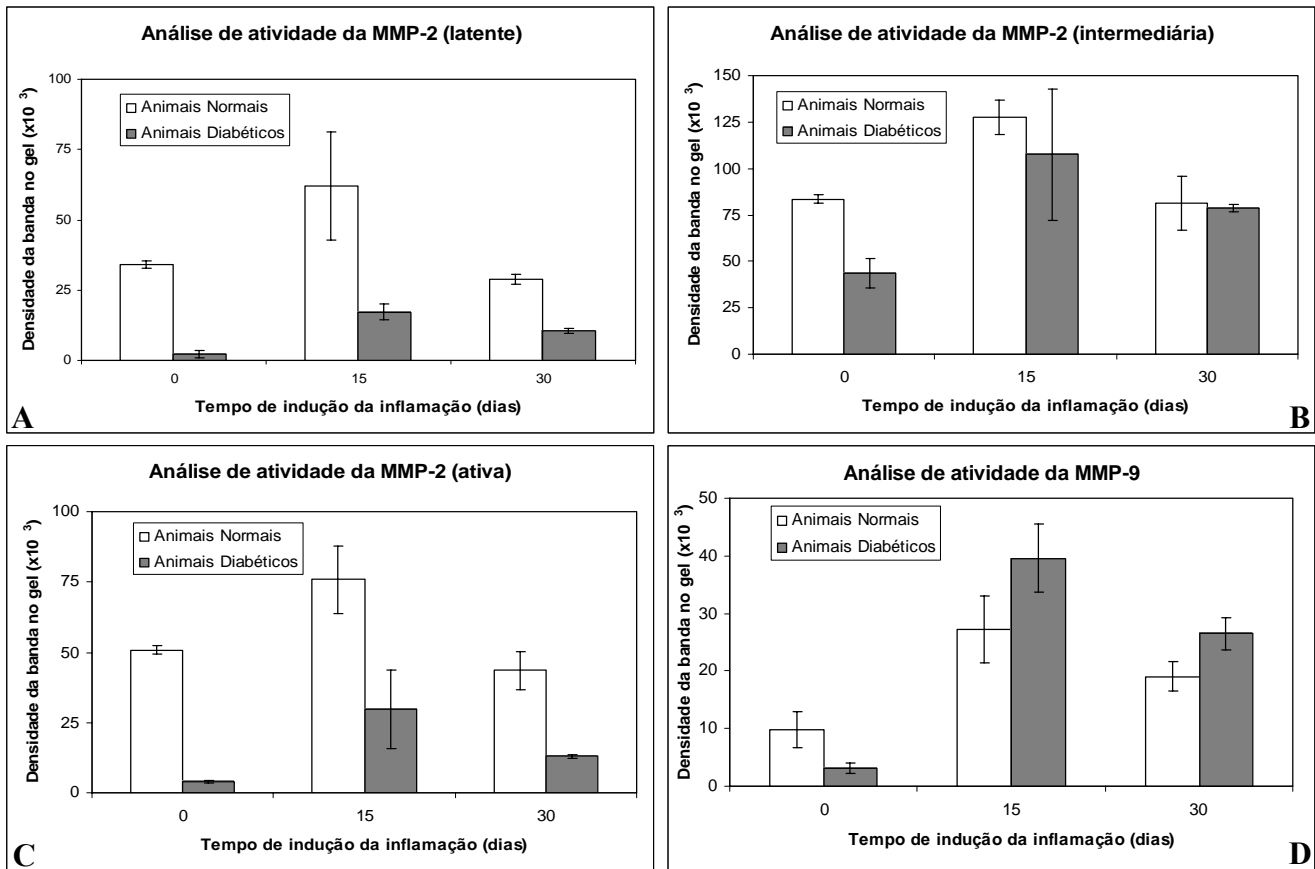
No tecido periodontal gengival foram encontradas as três isoformas da MMP 2 (latente, intermediária e ativa), cujas expressões foram maiores em animais normais do que em diabéticos em todos os períodos experimentais (**Figura 3**). As 3 isoformas mostraram pico de atividade aos 15 dias de inflamação, tanto em animais normais quanto em diabéticos.

Para melhor avaliar a atividade enzimática das MMP 2 e MMP 9, criou-se um índice de atividade comparando todos os demais tempos experimentais ao período controle. Sendo assim, a concentração de MMP 2 latente aumentou 82% e diminuiu 15% em animais normais aos 15 e 30 dias de inflamação respectivamente. Em animais diabéticos, o índice dessa isoforma foi menor: 94%, 50% e 69% aos 0, 15 e 30 dias de inflamação respectivamente (**Figura 3A**).

A isoforma MMP 2 intermediária aumentou 53% e diminuiu 3% aos 15 e 30 dias de inflamação respectivamente, em animais normais. Diabéticos tiveram queda de 48% na expressão aos 0 dias, aumento de 29% e 6% na expressão aos 15 e 30 dias respectivamente (**Figura 3B**).

MMP 2 ativa aumentou sua concentração em 49% aos 15 dias e teve queda de 14% aos 30 dias em animais normais. Em diabéticos houve diminuição da expressão dessa isoforma em todos os tempos experimentais: 92%, 42% e 76% aos 0, 15 e 30 dias de inflamação respectivamente (**Figura 3C**).

O perfil de expressão da atividade gelatinolítica da MMP 9 mostrou-se semelhante ao da MMP 2, com pico de atividade aos 15 dias de inflamação, entretanto, após o estímulo inflamatório, animais diabéticos tiveram expressão maior que animais normais, o que a diferenciou da MMP 2. A MMP 9 teve sua atividade aumentada 1,8 vezes aos 15 dias e manteve-se 96% maior aos 30 dias de inflamação em animais normais (**Figura 3D**). Em animais diabéticos, na ausência do estímulo inflamatório a atividade da MMP 9 decaiu 69%, enquanto que durante a inflamação sua atividade enzimática aumentou 3 vezes e 1,7 vezes aos 15 e 30 dias respectivamente (**Figura 3D**).

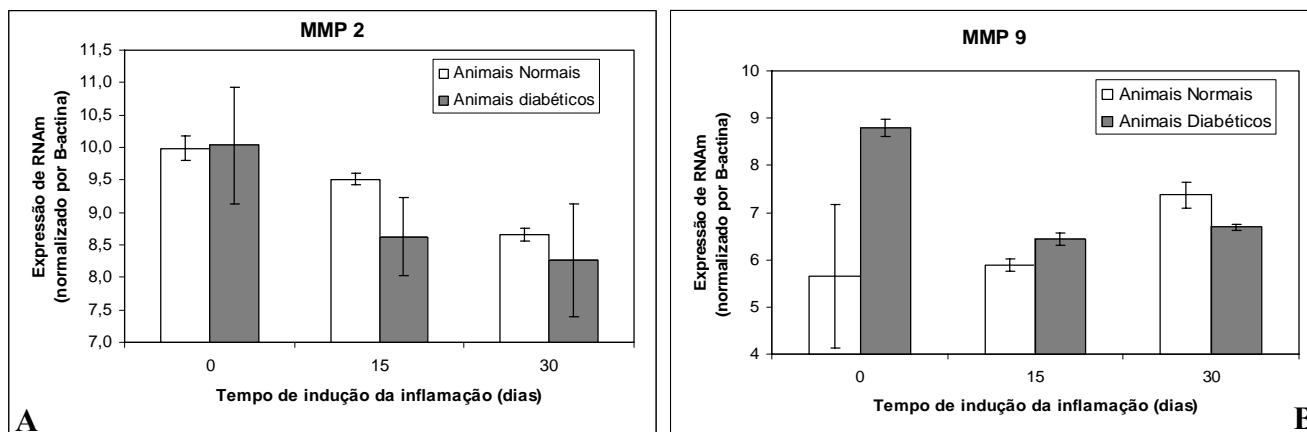


**Figura 3:** Gráficos obtidos pela densitometria de bandas no gel de zimografia entre animais normais e diabéticos durante os dias de inflamação. **A** é referente à MMP 2 latente, **B** à MMP 2 intermediária, **C** à MMP 2 ativa e **D** à MMP 9. Estatisticamente mostrou-se diferenças significativas entre os tempos de inflamação e o estado diabético em todos os gráficos.

### **PCR quantitativo**

A análise da expressão do RNAm da MMP 2 (**Figura 4A**) não mostrou diferença significativa entre diabéticos e normais, entretanto, houve diferenças entre os tempos de inflamação, mostrado por perfil decrescente com o avanço da doença periodontal (9% e 15 %, respectivamente aos 15 e 30 dias).

A expressão gênica da MMP 9 com relação ao tempo controle (**Figura 4B**) mostrou que, em animais normais não houve diferenças significativas aos 15 dias de inflamação, entretanto, aos 30 dias houve aumento de 30% no RNAm dessa MMP. Já em animais diabéticos, o índice de expressão com relação ao controle foi 56% maior aos 0 dias de inflamação e aos 15 e 30 dias foi 16% maior (não houve diferença significativa entre esses 2 tempos experimentais).



**Figura 4:** Análise da expressão gênica das MMPs 2 e 9 do tecido gengival de animais normais e diabéticos durante a indução da doença periodontal. **A** gráfico referente à expressão gênica da MMP 2 na gengiva inflamada e **B** da MMP 9. Estatisticamente não houve diferenças significativas entre animais normais e diabéticos para a MMP 2, mas houve significância entre os tempos de inflamação. Para MMP 9 houve diferenças significativas entre diabéticos e normais, porém, entre animais normais aos 0 e 15 dias de inflamação e animais diabéticos aos 15 e 30 dias não houve diferenças significativas.

## DISCUSSÃO

Inúmeros estudos têm demonstrado a correlação entre o diabetes e a prevalência e severidade da doença periodontal (GYÖRFI *et al.* 1996; MEALEY 2000; PONTE *et al.* 2001; TAYLOR 2001; BENDER & BENDER 2003; SOUTHERLAND *et al.* 2006). O Diabetes Tipo I está associado com alterações da resposta imune, resposta inflamatória e síntese da matriz extracelular (XUE *et al.* 2005).

Vários membros da família das MMPs têm mostrado relação com a destruição do tecido periodontal, dentre eles, as MMPs 2 e 9 (BIRKEDAL-HANSEN *et al.* 1993). Sabe-se que há significantes concentrações de MMPs 2 e 9 no fluido crevicular gengival e tecidos periodontais de pacientes com periodontite (MAKELA *et al.* 1994; AIBA *et al.* 1996). E que os níveis de MMP 9 no fluido crevicular gengival têm sido usados para determinar o estágio de periodontite do paciente (INGMAN *et al.* 1996).

Estudos também mostram que a degradação de colágeno em alguns níveis por MMPs, principalmente gelatinases e collagenases, pode ser regulado por bactérias periodontais e seus produtos. A placa dental e seus metabólitos, enzimas, toxinas, fatores de colonização de bactérias e componentes bacterianos como lipopolissacarídeo (LPS) são capazes de influenciar proteinases liberadas de células do hospedeiro e também induzir a produção de citocinas responsáveis pelo recrutamento de células

inflamatórias para o local (POTEMPA *et al.* 2000; SOUTHERLAND *et al.* 2006; ZHOU & WINDSOR 2006).

Os resultados deste trabalho mostraram aumento da atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9 frente ao processo inflamatório. MMP 2 latente teve aumento de aproximadamente 82%, a intermediária de 53% e a ativa de 49% em animais normais aos 15 dias de doença periodontal, voltando ao estado basal aos 30 dias. A MMP 9 esteve 1,8 vezes aumentada aos 15 dias de inflamação e manteve-se 96% maior até os 30 dias. Em diabéticos a atividade das três isoformas da MMP 2 foi diminuída durante todo o experimento, enquanto MMP 9, apesar de ter atividade diminuída nos animais sem estímulo inflamatório, teve maior atividade após inflamação.

A localização das MMPs em estudo foi igual em animais normais e diabéticos. Entretanto, houve diferenças na intensidade de marcação no decorrer da inflamação e também influenciadas pelo diabetes, sugerindo maior ou menor concentração das MMPs em estudo.

A expressão gênica da MMP 2 decaiu 15% com a inflamação em ambas as situações, já a MMP 9 aumentou 30% em normais e 16% em diabéticos. A expressão gênica das MMPs também foi afetada pela cronificação da inflamação, porém mostrando-se decadente para MMP 2 e não sendo influenciada pelo diabetes, enquanto MMP 9 teve sua expressão aumentada e foi influenciada por esse fator.

De acordo com a literatura, a doença periodontal é a inflamação crônica mais comum da atualidade, afetando mais pessoas de que se tem notícia. Ela é mais prevalente e mais intensa em pacientes diabéticos (SAITO *et al.* 2004), uma vez que diabéticos têm maior propensão a infecções bacterianas e oportunistas, principalmente devido à desordem circulatória generalizada que se estabelece nesses pacientes (BENDER & BENDER 2003).

Em estudo anterior (SILVA *et al.* 2006) verificou-se que aos 15 dias de inflamação há grande concentração de células inflamatórias e estas, apesar de diminuírem aos 30 dias, ainda permanecem em maior concentração no conjuntivo comparado aos controles. Esse perfil de migração celular foi muito mais evidente em diabéticos devido à maior quantidade de células inflamatórias encontradas durante os tempos estudados.

Neste estudo, demonstrou-se que as MMPs 2 e 9 estão localizadas, entre outros tipos celulares, em células inflamatórias. Também verificou-se que a atividade enzimática dessas 2 MMPs foi maior aos 15 dias de inflamação, podendo-se sugerir que isso foi devido à ocorrência de maior concentração de células inflamatórias nesse tempo experimental, e que estas são células são responsáveis pela maior liberação dessas MMPs. Entretanto, a atividade de MMP 9 foi maior em diabéticos durante a

inflamação, o que está de acordo com os estudos anteriores, onde também é maior o número de células inflamatórias nesses tempos experimentais. Já a atividade da MMP 2 foi menor em diabéticos durante a inflamação, isso sugere que apesar de ser liberada por células inflamatórias, essa MMP pode ter um processo de ativação diferente ou dificultado em diabéticos.

As MMPs têm importante papel na degradação da matriz extracelular. A MMP 9 é expressa constitutivamente por leucócitos polimorfonucleares (PMNs), macrófagos, queratinócitos, células endoteliais e várias células transformadas malignamente. Já a MMP 2 é preferencialmente derivada de fibroblastos e células endoteliais (BIRKEDAL-HANSEN *et al.*, 1993; XUE *et al.* 2005). Estes aspectos estão de acordo com os dados obtidos nesse estudo.

A atividade enzimática das MMPs é regulada por 3 níveis: (1.) Transcrição gênica - muitas citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e promotores tumorais como IL1 $\beta$ , IL6, fator de crescimento de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidermal, TNF $\alpha$  e fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) induzem ativação da transcrição de MMPs; (2.) Ativação - todas as MMPs são secretadas como enzimas latentes que requerem ativação por proteases ou agentes não protéicos; (3.) Inibição – há vários inibidores teciduais de MMPs (TIMPs), sendo que o equilíbrio entre as MMPs e seus inibidores determina a atividade proteolítica (KADOGLOU *et al.* 2005).

Na gengiva inflamada, os níveis de citocinas IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6, IL8, TGF $\beta$ , fatores de crescimento diversos e prostaglandinas são afetados em células inflamatórias, fibroblastos e células epiteliais (BARTOLD & NARAYANAN 2006). Diabéticos têm uma resposta anormal a LPS, o que resulta em uma secreção exagerada de mediadores inflamatórios como prostaglandinas E<sub>2</sub>, IL1 $\beta$  e TNF $\alpha$  e resposta inflamatória induzida pelo acúmulo de glicoproteínas anômalas resultantes de processo de glicação não enzimática reversível (*advanced glycation endproducts* – AGEs) que podem ligar-se a receptores de macrófagos e monócitos, o que resulta em maior secreção local e sistêmica de mediadores, levando à periodontite severa (SOUTHERLAND *et al.* 2006; HOLZHAUSEN *et al.* 2004).

IL1 pode aumentar a síntese de MMP, enquanto TGF $\beta$  é responsável pelo aumento na síntese e acúmulo de componentes da matriz extracelular e diminuição na síntese de MMP. O aumento na produção de TGF $\beta$  e IL6 parece ser característica da fibromatose gengival (BARTOLD & NARAYANAN 2006). Isso sugere que com o avanço da inflamação e fibrose, mudanças no perfil de citocinas encontradas no tecido gengival normal e diabético regulem a expressão e atividade diferenciadas das MMPs durante a inflamação e diabetes caracterizadas neste estudo.

Em estudo anterior, foi caracterizado o processo fibrótico desenvolvido durante a cronificação da doença periodontal em modelo animal e suas complicações relacionadas ao diabetes (SILVA *et al.* 2006).

Elevadas concentrações de MMP 9 e MMP 2 são encontradas no soro de pacientes diabéticos (MAXWELL *et al.* 2001; XUE *et al.* 2005), sendo a MMP 9 um permissivo fator de degradação de insulina em diabéticos quando ativada por ação da tripsina endógena, estando associada às complicações vasculares, retinopatias, nefropatias e arterosclerose desses pacientes (XUE *et al.* 2005). A atividade aumentada de MMP 9 está associada com uma disfunção endotelial e apoptose em modelos murinos de diabetes (XUE *et al.* 2005). Há um desequilíbrio entre a expressão de MMPs e TIMPs em diabéticos, o que leva à proteólise excessiva e retardo na cicatrização das úlceras dérmicas, uma vez que o aumento das concentrações de MMPs 1, 2, 3 e 9, IL6, TNF $\alpha$  e diminuição de TIMPs 1 e 2 são influenciados pela glicação da matriz e formação de AGEs, que levam ao retardo da cicatrização em diabéticos (KADOGLOU *et al.* 2005). Neste sentido parece que o aumento da atividade de MMP 9 em diabéticos como mostrado neste estudo está relacionado com complicações vistas durante a inflamação nestes animais.

Sabe-se que durante a nefropatia diabética, a hiperglicemia é responsável por aumentar a síntese de alguns componentes da matriz ao mesmo tempo que a sua degradação é diminuída. Isso promove espessamento na parede glomerular. O engrossamento da membrana basal glomerular contribui para a disfunção renal em diabéticos (DEROSA *et al.* 2005; KADOGLOU *et al.* 2005).

Através da análise de placas arteroscleróticas humanas, KADOGLOU *et al.* (2005) sugeriram que a interrelação entre glicação de macromoléculas (AGEs) e seus receptores (RAGEs) estimulam a resposta inflamatória, o que modula a atividade proteolítica das MMPs. Além disso o stress oxidativo, o distúrbio de proteínas sinalizadoras de insulina, polimorfismo genético de MMPs e insulina podem indiretamente alterar a transcrição de MMPs em Diabetes Mellitus. Isso justifica os dados obtidos nesse trabalho em relação às diferenças encontradas na expressão gênica e atividade proteica diferenciadas das MMPs 2 e 9 durante a inflamação em diabéticos.

Nosso estudo permitiu concluir que a doença periodontal sem ter o diabetes como agravante, foi responsável por mudanças nos padrões de expressão das MMPs 2 e 9, que foram afetados pela inflamação e evolução do processo fibrótico. A atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9 decaiu com o avanço da fibrose aos 30 dias de inflamação. O processo fibrótico acentuou a quantidade de RNAm da MMP 9 enquanto o da MMP 2 apresentou declínio. O estado diabético em animais sem estímulo

inflamatório diminuiu a atividade das MMPs 2 e 9, enquanto aumentou a expressão gênica da MMP 9 e não influenciou a expressão gênica da MMP 2 em nenhum tempo experimental. A inflamação em diabéticos acentuou a atividade das MMPs 2 e 9 e a fibrose caracterizou expressão gênica decrescente da MMP 9 em diabéticos.

O estudo sugere a influência de elementos pós-trancricionais e de mediadores inflamatórios como responsáveis pelos distúrbios e diferenças nas expressões das MMPs analisadas, além de indicar que as variações nos níveis de expressão e atividade destas gelatinases contribuem para a fibrose acentuada observada nos diabéticos e resultam em diferentes padrões fibróticos nos animais normais e diabéticos.

## REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIBA, T.; AKENO, N.; KAWANE, T.; OKAMOTO, H. & HORIUCHI, N. **1996**. Matrix metalloproteinases-1 and -8 and TIMP-1 mRNA levels in normal and diseased human gingivae. *Eur J Oral Sci*, 104: 562-569.
- BARTOLD, P.M. & NARAYANAN, A.S. **2006**. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontology 2000*, 40: 29-49.
- BENDER, I.B. & BENDER, A.B. **2003**. Diabetes mellitus and the dental pulp. *J Endodon*, 29(6): 383-389.
- BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W.G.I.; BODDEN, M.K.; WINDSOR, L.J.; BIRKEDAL-HANSEN, B.; DECARLO, C. & ENGLER, J.A. **1993**. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*, 4: 197-250.
- BJÖRKLUND, M. & KOIVUNEN, E. **2005**. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1755: 37-69.
- BOK, R.A.; HANSELL, E.J.; NGUYEN, T.P.; GREEBERG, N.M.; MCKERROW, J.H. & SHUMAN, M.A. **2003**. Patterns of protease production during prostate cancer progression: proteomic evidence for cascades in a transgenic model. *Prostate Cancer and Prostate Diseases*, 6: 272-280.
- BRADFORD, M. M. **1976**. A rapid and sensitive method of quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248 – 254.
- CARSON, K.A. **1979**. Citochemical and cytopathological studies of nerve, vascular and salivary gland tissues in a hereditary mouse model for diabetes mellitus. A dissertation submitted to the faculty on the University of North Carolina at Chapel Hill.



- CONGET, I. **2002**. Diagnosis, classification and pathogenesis of diabetes mellitus. *Rev Esp Cardiol*, 55: 528-538.
- De VICENTE, J.C.; FRESNO, M.F.; VILLALAIN, L.; VEGA, J.A. & VALLEJO, G.H. **2005**. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 41: 283-293.
- DEROSA, G.; AVANZINI, M.A.; GEROLDI, D.; FOGARI, R.; LORINI, R.; SILVESTRI, A.; TINELLI, C.; RONDINI, G. & D'ANNUNZIO, G. **2005**. Matrix metalloproteinase 2 may be a marker of microangiopathy in children and adolescents with type I diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, 70: 119-125.
- EJEIL, A.-L.; GAULTIER, F.; IGONDJO-TCHEN, S.; SENNI, K.; PELLAT, B.; GODEAU, G. & GOGLY, B. **2003**. Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression? *J Periodontol*, 74: 196-201.
- GYÖRFI, A.; FAZEKAS, Á.; FEHÉR, E.; ENDER, F. & ROSIVALL, L. **1996**. Effects of streptozotocin – induced diabetes on neurogenic inflammation of gingivomucosal tissue in rat. *J Periodont Res*, 31: 249-255.
- HOLZHAUSEN, M.; GARCIA, D.F.; PEPATO, M.T. & MARCANTONIO JR, E. **2004**. The influence of short-term diabetes mellitus and insulin therapy on alveolar bone loss in rats. *J Periodont Res*, 39: 188-193.
- INGMAN, T.; TERVAHARTALA, T.; DING, Y.; TSCHESCHE, H.; HAERIAN, A.; KINANE, D.F.; KONTTINEN, Y.T. & SORSA, T. **1996**. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, 23: 1127-1132.
- JOHNSON, I.H. **1975**. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *J Periodontal Res*, 10 (6): 332-345.
- KADOGLOU, N.P.; DASKALOPOULOU, S.S.; PERREA, D. & LIAPIS, C.D. **2005**. Matrix metalloproteinases and diabetic vascular complications. *Angiology*, 56: 173-189.
- KATO, K.; HARA, A.; KUNO, T.; KITAORI, N.; HUILAN, Z.; MORI, H.; TOIDA, M. & SHIBATA, T. **2005**. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in oral squamous cell carcinomas: manifestation and local localization of their activity. *J Cancer Res Clin Oncol*, 131(6): 340-346.
- LINDHE, J. **1999**. *Tratado de periodontologia clínica e implantologia oral*. 3ª edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- LISTGARTEN, M. A. **1986**. Pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol* 13: 418-425.

- LIU, R. K.; CAO, C. F.; MENG, H. X. & GAO, Y. **2001**. Polymorphonuclear neutrophils and their mediators in gingival tissues from generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol*, 72: 1545-1553.
- MAKELA, M.; SATO, T.; UITTO, V. & LARJAVA, H. **1994**. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res*, 73: 1397-1406.
- MAXWELL, P.R.; TIMMS, P.M.; CHADRAN, S. & GORDON, D. **2001**. Peripheral blood level alterations of TIMP-1, MMP-2 and MMP-9 in patients with type I diabetes. *Diabet Med*, 18: 777-780.
- MEALEY, B. Position Paper. **2000**. Diabetes and periodontal disease. *J Periodontol*, 71: 664-678.
- PAGE, R. C. & SCHROEDER, H. E. **1976**. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*, 33: 235-249.
- PATEL, B.P.; SHAH, P.M.; RAWAL.U.M.; DESAI, A.A.; SHAH, S.V.; RAWAL, R.M. & PATEL, P.S. **2005**. Activation of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol*, 90: 81-88.
- PERSSON, R.E.; HOLLENDER, L.G.; MACENTEE, M.I.; WYATT, C.C.L.; KIYAK, H. A. & PERSSON, G.R. **2003**. Assessment of periodontal conditions and systemic disease in older subjects – focus on diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*, 30: 207-213.
- PONTE, E.; TABAJ, D.; MAGLIONE, M. & MELATO, M. **2001**. Diabetes mellitus and oral disease. *Acta Diabetol*, 38: 57-62.
- POTEMPA, J.; BANBULA, A. & TRAVIS, J. **2000**. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontology 2000*, 24: 153-192.
- ROBBINS, S.L. **1989**. Doenças sistêmicas. In: *Diabetes mellitus. Patologia estrutural e funcional*. W.B. Saunders Company, 238-250.
- SAITO, T.; SHIMAZAKI, Y.; KIYOHABA, Y.; KATO, I.; KUBO, M.; LIDA, M. & KOGA, T. **2004**. The severity of periodontal disease is associated with the development of glucose intolerance in non-diabetics: The Hisama study. *J Dent Res*, 83(6): 485-490.
- SEGUIER, S.; GODEAU, G. & BROUSSE, N. **2000**. Collagen fibers and inflammatory cells in healthy and diseased human gingival tissues: a comparative and quantitative study by immunochemistry and automated image analysis. *J Periodontol*, 71: 1079-1085.

- SEGUIER, S.; GOGLY, B.; BODINEAU, A.; GODEAU, G. & BROUSSE, N. **2001**. 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*, 72: 1398-1406.
- SILVA, J.A.F.; LORENCINI, M.; REIS, J.R.R.; CARVALHO, H.F.; CAGNON, V.H.A. & STACHMACHADO, D.R. **2006**. A influência do diabetes mellitus tipo I na caracterização morfológica da doença periodontal. Submetido.
- SOUTHERLAND, J.H.; TAYLOR, G.W.; MOSS, K.; BECK, J.D. & OFFENBACHER, S. **2006**. Commonality in chronic inflammation diseases: periodontitis, diabetes, and coronary artery disease. *Periodontology* 2000, 40: 130-143.
- SOUZA, A.P.; TREVILATTO, P.C.; SCAREL-CAMINAGA, R.M.; BRITO Jr, R.B.; BARROS, S.P. & LINE, S.R.P. **2005**. Analysis of the MMP-9 (C-1562T) and TIMP-2 (G-418C) gene promoter polymorphisms in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 32: 207-211.
- STERNLICHT, M. D. & WERB, Z. **2001**. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17: 463-516.
- TAYLOR, G.W. **2001**. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann periodontal*, 6(1): 99-112.
- WADA, L.Y. **2002**. Contagem de carboidratos: mais fácil que contar até 3. Editora Ateneu. São Paulo, 3-25.
- WISEMAN, B.S.; STERNLICHT, M.D.; LUND, L.R.; ALEXANDER, C.M.; MOTT, J.; BISSELL, M.J.; SOLOWAY, P.; ITOHARA, S. & WERB, Z. **2003**. Site-specific inductive and inhibitory activities of MMP-2 and MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis. *J Cell Biol*, 162: 1123-1132.
- XUE, M.; THOMPSON, P.J.; CLIFTON-BLIGH, R.; FULCHER, G.; GALLERY, E.D.M. & JACKSON, C. **2005**. Leukocyte matrix metalloproteinase-9 is elevated and contributes to lymphocyte activation in type I diabetes. *J Biochem and Cell Biol*, 37: 2406-2416.
- ZHOU, J. & WINDSOR, J. **2006**. *Porphyromonas gingivalis* affects host collagen degradation by affecting expression, activation, and inhibition of matrix metalloproteinases. *J Periodont Res*, 41: 47-54.

## RESULTADOS COMPLEMENTARES

### *Coloração por Picrossirius Red*

Os fragmentos da mucosa gengival foram removidos e fixados em solução de Bouin por 12 horas, substituída por álcool 70% e submetidos a uma série crescente de etanol e xilol, com posterior inclusão em Paraplast Plus (Kendall, Mansfield MA, USA). Cortes seriados de 5 µm de espessura foram obtidos utilizando o micrótomo (LEICA RM 2145) e montados em lâminas.

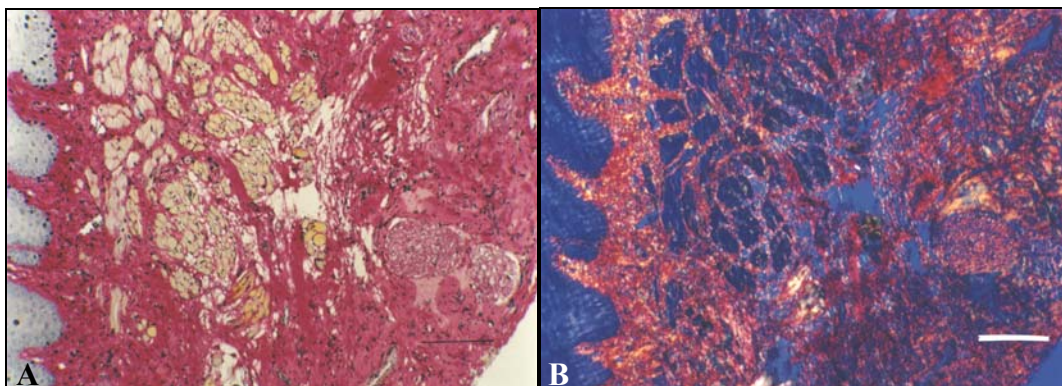
Após desidratação, os cortes foram imersos em solução aquosa de ácido pícrico (1,2g/100ml) e 0,1% de *Sirius Red*, durante 50 minutos. Após lavagem, foram contracoradas com hematoxilina e desidratadas para montagem.

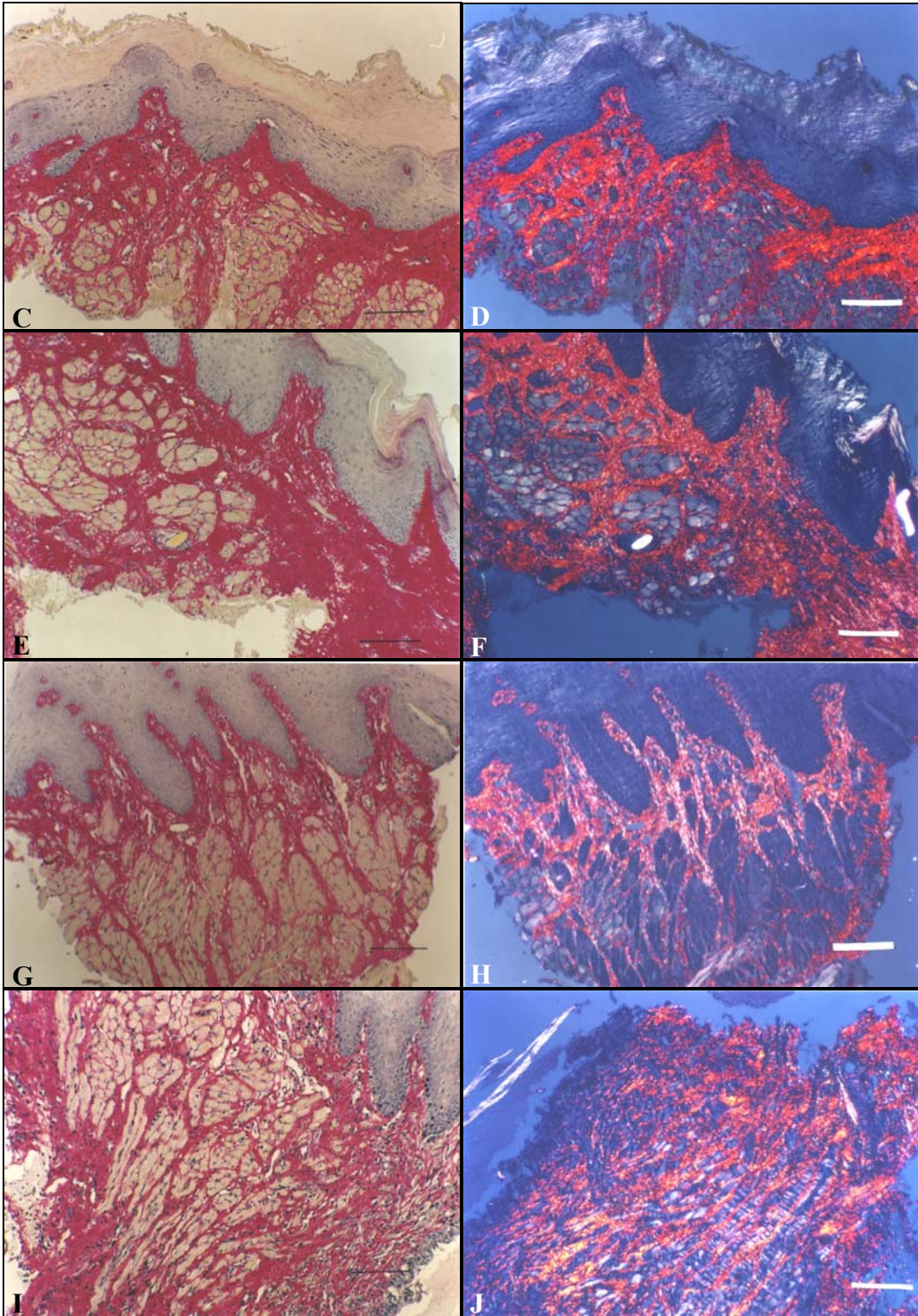
Através desta técnica, as fibras de colágeno foram marcadas na cor azul (fibras delgadas) e na variedade de cores branca a vermelha (fibras densas), quando observadas em luz polarizada.

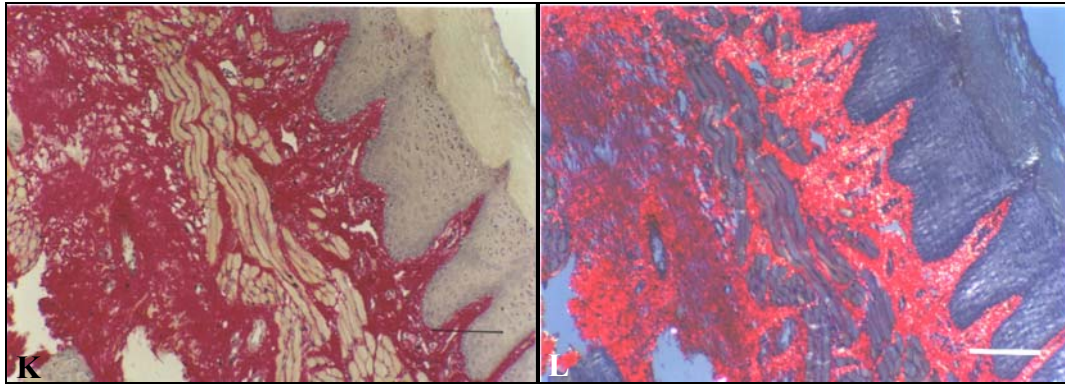
Em animais controles (grupos I e II), as fibras de grossa e fina espessura mostraram-se intercaladas entre si, com pequeno predomínio da cor avermelhada (**Figura 1**).

Com o avanço da inflamação, tanto em animais normais quanto em diabéticos, as fibras de cor azul diminuíram e aos 30 dias de inflamação foram quase inexistentes (**Figura 1**).

Essa remodelação da matriz extracelular caracterizou o processo fibrótico obtido em decorrência da inflamação.







**Figura 1:** Dinâmica da organização das fibras de colágeno na inflamação periodontal. Coloração com *Picrossirius Red* e hematoxilina. Barras representam 20  $\mu\text{m}$ . Fotos da esquerda são de microscopia óptica sem luz polarizada e da direita microscopia óptica com luz polarizada, A e B, C e D, E e F representam animais normais de 0, 15 e 30 dias de inflamação respectivamente e G e H, I e J, K e L animais diabéticos de 0, 15 e 30 dias de inflamação respectivamente.

## DISCUSSÃO GERAL

A compreensão da causa e progressão da doença periodontal tem crescido consideravelmente nesta última década tornando mais evidente a sua interrelação com o diabetes (TAYLOR 2001). A associação entre diabetes e doença periodontal tem sido tópico de discussão por muitos anos, atualmente, inúmeros estudos mostram claramente a correlação entre o diabetes com a prevalência e severidade da doença periodontal (GYÖRFI *et al.* 1996; MEALEY 2000; PONTE *et al.* 2001; TAYLOR 2001; BENDER & BENDER 2003; SOUTHERLAND *et al.* 2006).

A indução experimental ou química do diabetes em animais pode ser efetuada através da utilização de drogas antineoplásticas como a estreptozotocina (STZ) ou aloxana que apresentam citotoxicidade para as células  $\beta$  do pâncreas. Doses diabetogênicas destas drogas, induzem deficiência de insulina semelhante à forma de diabetes tipo I, as quais todavia variam de acordo com a espécie, idade e o estado metabólico do animal. (CARSON 1979; MORDES & ROSSINI 1981; GRODSKI *et al.* 1982; GYÖRFI *et al.* 1996; MONTE *et al.* 1998).

Neste trabalho optou-se pela administração da STZ por via intraperitoneal, uma vez que, essa via de administração é menos agressiva e induz resposta inflamatória contra as células  $\beta$ , mimetizando deficiência dessas células semelhante ao diabetes tipo I em humanos, enquanto a via endovenosa induz destruição agressiva das células pancreáticas (MONTE *et al.* 1998). Foram utilizadas três doses de STZ as quais foram suficientes para obtenção e manutenção do estado diabético até o final do experimento, sem perdas significativas por superdosagem.

Os animais foram mantidos sem suplementação insulínica e apresentaram todos os sintomas clínicos característicos da patologia, como: elevados níveis glicêmicos e de glicosúria, falta de ganho ponderal, sede intensa, apatia e poliúria, sendo a diferença no tamanho e peso desses animais bem marcantes quando comparados com os animais sem indução de diabetes de mesma idade. Além disso, mostraram considerável aumento nos seus níveis glicêmicos e glicosúria, os quais foram monitorados durante todo desenvolvimento do cronograma experimental. Deste modo, nossos resultados confirmam os dados descritos na literatura (GYÖRFI *et al.* 1996; CONGET 2002; HOLZHAUSEN *et al.* 2004), com a caracterização efetiva do estado diabético e sem perdas por superdosagem da droga.

A indução da doença periodontal foi efetuada segundo a técnica de ligadura, descrita por JOHNSON em 1975, através da utilização da linha de algodão a qual favorece a formação da placa bacteriana com indução da resposta inflamatória mimetizando a doença periodontal humana. A placa bacteriana, composta principalmente por microrganismos Gram-negativos anaeróbios, libera enzimas

proteolíticas que promovem injúria gengival e também libera fatores quimioatraentes responsáveis pelo recrutamento de leucócitos PMNs para o tecido (POTEMPA *et al.* 2000). Deste modo, a não remoção da placa pode levar à cronificação da doença, por estímulo constante da resposta inflamatória, responsável pela produção de mediadores inflamatórios, que promovem a degradação dos tecidos periodontais e leva à formação de granulomas no decorrer da cronificação da doença (COLEMAN 2001; LAPPIN *et al.* 2001; GARLET *et al.* 2005; KANTARCI & VAN DYKE 2005; SOUTHERLAND *et al.* 2006).

Todos os animais submetidos à ligadura apresentaram os sinais clínicos clássicos da resposta inflamatória como edema, vermelhidão e perda de adesão ao dente. Todavia, à análise macroscópica e qualitativa, a gengiva dos animais diabéticos com ligadura mostrou maior flacidez tecidual, resistência à tração diminuída, além de menor aderência ao dente quando comparados com animais não diabéticos.

O periodonto fornece o suporte necessário para o dente manter-se fixo e conseqüentemente desempenhar sua função adequada. Dentre seus componentes, a gengiva é a primeira a ser afetada pelo acúmulo de placa e, com apenas 3-4 dias, a resposta inflamatória já inicia a destruição do tecido. Histologicamente é composta por dois distintos componentes – os tecidos epitelial e conjuntivo. Enquanto o epitélio gengival é predominantemente celular, o tecido conjuntivo é pouco celularizado e é composto primariamente de uma rede integrada de fibras e proteínas não fibrosas (BARTOLD *et al.* 2000-2006).

O tecido epitelial gengival externo ou oral é formado por espessa camada de epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, no qual puderam ser distinguidas as camadas do estrato córneo, estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato basal. Todavia, em animais diabéticos, embora apresentassem a espessa camada epitelial, histologicamente houve perda na sua organização estrutural de modo que, as diferentes camadas não puderam mais ser identificadas. Verificou-se que a camada córnea consideravelmente maior nestes animais.

Estruturalmente demonstrou-se também, cronificação da inflamação, pelo aumento de células inflamatórias, acúmulo de fibras colágenas densas, aumento aparente da quantidade de fibroblastos, degradação de fibras reticulares que sustentam a membrana da basal, involução das papilas dérmicas e dificuldade de descamação da camada córnea. Esses dados caracterizaram degradação e fibrose. O processo fibrótico mostrou-se acentuado com o avanço da inflamação.

A placa dental e seus metabólitos, enzimas, toxinas, fatores de colonização de bactérias e componentes bacterianos como lipopolissacarídeo (LPS) são capazes de influenciar proteinases



liberadas de células do hospedeiro, podendo regular a degradação de colágeno em alguns níveis por MMPs, principalmente gelatinases e colagenases (POTEMPA *et al.* 2000; SOUTHERLAND *et al.* 2006; ZHOU & WINDSOR 2006).

Vários membros da família das MMPs têm mostrado relação com a destruição do tecido periodontal, dentre eles, as MMPs 2 e 9 (BIRKEDAL-HANSEN *et al.* 1993). Sabe-se que há significantes concentrações de MMPs 2 e 9 no fluido crevicular gengival e tecidos periodontais de pacientes com periodontite (MAKELA *et al.* 1994; AIBA *et al.* 1996). E que os níveis de MMP 9 no fluido crevicular gengival têm sido usados para determinar o estágio de periodontite do paciente (INGMAN *et al.* 1996).

Neste estudo, houve aumento da atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9 frente ao processo inflamatório. MMPs 2 latente teve aumento de aproximadamente 82%, a intermediária de 53% e a ativa de 49% em animais normais aos 15 dias de doença periodontal, voltando ao estado basal aos 30 dias. A MMP 9 esteve 1,8 vezes aumentada aos 15 dias de inflamação e manteve-se 96% maior até os 30 dias.

A expressão gênica da MMP 2 decaiu 15% com a inflamação, já a MMP 9 aumentou 30%, mostrando que a expressão gênica das MMPs também foi afetada pela cronificação da inflamação, porém mostrando-se decadente para MMP 2, enquanto MMP 9 teve sua expressão aumentada.

O processo inflamatório, degradação da matriz extracelular e fibrose foram mais intensos em diabéticos e comprometeram o tecido epitelial e conjuntivo desses animais de forma mais agressiva que os animais normais. Eles demonstraram degradação maior e mais rápida de fibras colágenas, com processo de fibrose diferenciado. Maior atividade gelatinolítica da MMP 9 após inflamação, possivelmente responsável pela maior degradação das fibras colágenas e maior desestruturação da membrana basal, uma vez que verificou-se a localização de MMPs 2 e 9 na camada basal do epitélio desses animais. Maior infiltrado inflamatório, responsável pela destruição tecidual mais agressiva, e caracterizado por liberação de MMPs 2 e 9. Grande concentração de MMP 9 nas células epiteliais. Involução das papilas dérmicas mais acentuada; epitélio aparentemente sem distinção entre as camadas basal, espinhosa e granulosa, notando-se visivelmente a projeção do conjuntivo por falta da resistência característica do tecido epitelial; e aumento da camada córnea. Expressão gênica da MMP 9 menos aumentada possivelmente em resposta a eventos pós transcricionais afetados pela inflamação no estado diabético.

A atividade de MMP 9 foi maior em diabéticos durante a inflamação, onde também foi maior o número de células inflamatórias nesses tempos experimentais. Já a atividade da MMP 2 foi menor em

diabéticos durante a inflamação, isso sugere que apesar ser liberada por células inflamatórias, essa MMP pode ter um processo de ativação diferente ou dificultado em diabéticos.

Esses dados caracterizaram a degradação tecidual, que foi comprometida pelo processo fibrótico, também caracterizado no experimento, o qual mostrou-se acentuado com o avanço da inflamação, afetou a regeneração epitelial, os padrões de expressão das MMPs 2 e 9 e foi diferenciado em diabéticos.

Inúmeras evidências na literatura justificam a maior propensão para o desenvolvimento e caracterização mais agressiva da doença periodontal em indivíduos diabéticos. Eles têm maior propensão a infecções bacterianas e oportunistas devido à desordem circulatória generalizada, com prejuízo à resposta leucocitária, levando à diminuição da habilidade microbicida de leucócitos polimorfonucleares e falência na entrega de componentes do sistema imune humoral e celular (BENDER & BENDER 2003). Há inibição da quimiotaxia de leucócitos no sangue periférico, defeitos na fagocitose e morte bacteriana, aumentando a suscetibilidade dos pacientes (CUTLER *et al.* 1991; OLIVER & TERVONEN 1994). Segundo SAITO *et al.* (2004) a periodontite tem maior incidência em pacientes diabéticos, além de agravar o quadro geral patológico.

Além disso, o Diabetes Mellitus aumenta a glicose salivar e crevicular, o que pode influenciar a microflora oral, causando aumento no desenvolvimento de cáries e periodontites (BENDER & BENDER 2003).

Por todas essas características, o paciente com diabetes mal controlado, de longa data e idade avançada, tende a ter aumento do risco de acúmulo da placa e cálculo, podendo levar a uma doença periodontal mais severa, com aceleração na reabsorção do osso alveolar, maior facilidade da ruptura do ligamento periodontal e aumento na incidência de formação de bolsas periodontais, que se apresentam mais profundas e mais freqüentes (HOVE & STALLARD 1970; OLIVER & TERVONEN 1993; MEALEY 2000; PERSSON *et al.* 2003).

Sabe-se que o epitélio gengival (principalmente o sulcar) desempenha função muito importante na proteção e defesa do indivíduo. As células epiteliais são metabolicamente ativas e capazes de reagir a um estímulo externo sintetizando citocinas, moléculas de adesão, fatores de crescimento e enzimas (BARTOLD *et al.* 2000).

Embora os epitélios juncional e sulcar, que estão em contato direto com a placa bacteriana e não são queratinizados, sejam os responsáveis pelo início do processo inflamatório em resposta ao estímulo bacteriano (BARTOLD *et al.* 2000), a cronificação doença periodontal neste estudo, pôde ser analisada

também na região mais externa do epitélio (epitélio oral), através do aumento da camada queratinizada deste tecido, além da diminuição das papilas dérmicas (em ambos os tipos epiteliais), mostrando que a inflamação não se limitou apenas às regiões em contato com a placa.

Na gengiva inflamada, os níveis de citocinas IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6, IL8, TGF $\beta$ , fatores de crescimento diversos e prostaglandinas são afetados em células inflamatórias, fibroblastos e células epiteliais (BARTOLD & NARAYANAN 2006). Diabéticos têm uma resposta anormal a LPS, o que resulta em uma secreção exagerada de mediadores inflamatórios como prostaglandinas E<sub>2</sub>, IL1 $\beta$  e TNF $\alpha$ . Também apresentam resposta inflamatória induzida pelo acúmulo de glicoproteínas anômalas resultantes de processo de glicação não enzimática reversível (*advanced glycation endproducts* – AGEs) que podem ligar-se a receptores de macrófagos e monócitos, o que resulta em maior secreção local e sistêmica de mediadores, levando à periodontite severa (SOUTHERLAND *et al.* 2006; HOLZHAUSEN *et al.* 2004).

Sabe-se também que indivíduos diabéticos têm maior espessura da parede de vasos causada pelo acúmulo de glicoproteínas anômalas (placas de ateroma) como resultado de um processo de glicação de endoprodutos (AGEs), associado a uma diminuição do catabolismo de colágeno, o que reduz a absorção de nutrientes e oxigênio, prejudica a resposta leucocitária e leva a prejuízos na resposta imune (MEALEY 2000; PONTE *et al.* 2001; BENDER & BENDER 2003).

De acordo com CALDEIRA *et al.* (2004), em animais diabéticos, as cristas epiteliais e células basais têm o citoplasma e volume nuclear reduzidos. E segundo AÇIKGOZ *et al.* 2004 a atividade mitótica da camada basal do epitélio gengival é aumentada nesses pacientes e o depósito de glicogênio e produtos intermediários são usados no lugar da glicose aeróbica, isso faz com que aumente a atividade mitocondrial e os produtos protéicos usados na queratinização.

Todas essas informações e a aumentada atividade de MMP 9 associada com uma disfunção endotelial e apoptose descritas por XUE *et al.* 2005 em modelos murinos de diabetes, justificaram os dados deste trabalho, que mostrou a prejudicada diferenciação e desenvolvimento das células das camadas espinhosa e granulosa, com aparente involução e diminuição dos seus números celulares, e aumento da camada córnea durante a cronificação da inflamação em diabéticos.

A lâmina própria da submucosa que suporta o epitélio é formada pelo tecido conjuntivo frouxo pouco espesso. É de consistência delicada, flexível e pouco resistente às trações. Substância fundamental do tecido conjuntivo, a matriz extracelular é rica em proteoglicanas, proteínas e glicoproteínas (como colágenos, elastina e fibronectinas). As fibras que formam o tecido conjuntivo

frouxo são de três tipos principais: colágenas, reticulares e elásticas, sem predomínio acentuado entre elas, sendo a matriz extracelular composta de fibras delgadas de colágeno do tipo IV e densas intercaladas e sem predomínio entre elas, conhecidas como um dos principais componentes das lâminas próprias, cujas moléculas se associam para formar uma rede com papel de aderência e de filtração, associadas a poucos fibroblastos espaçados e várias células inflamatórias, principalmente macrófagos, comuns dessa região (BARTOLD *et al.* 2000).

De acordo com CHAMMAS (1998), os diferentes elementos da matriz interagem de maneira complexa, sendo que os processos de remodelação são intrincados processos bioquímicos, baseados no balanço entre síntese e degradação, regulados em diferentes níveis. O estroma intersticial encontra-se em contínuo *turn-over* e distúrbios deste processo normal podem levar a uma série de alterações teciduais, coletivamente chamadas de reação estromal. Quando a síntese predomina sobre a degradação, quadros de acúmulo de matriz extracelular são observados, por exemplo, em fibroses e elastoses, facilmente identificadas em uma série de doenças infecciosas ou inflamatórias.

As MMPs têm importante papel na degradação da matriz extracelular. A MMP 9 é expressa constitutivamente por leucócitos polimorfonucleares (PMNs), macrófagos, queratinócitos, células endoteliais e várias células transformadas malignamente. Já a MMP 2 é mais preferencialmente derivada de fibroblastos e células endotélias (BIRKEDAL-HANSEN *et al.*, 1993; XUE *et al.* 2005). Estes aspectos estão de acordo com os dados obtidos nesses estudos.

A atividade enzimática das MMPs é regulada por 3 níveis: (1.) Transcrição gênica - muitas citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e promotores tumorais como: IL1 $\beta$ , IL6, fator de crescimento de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidermal, TNF $\alpha$  e fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) induzem ativação da transcrição de MMPs; (2.) Ativação - todas as MMPs são secretadas como enzimas latentes que requerem ativação por proteases ou agentes não protéicos; (3.) Inibição – há vários inibidores teciduais de MMPs (TIMPs), sendo que o equilíbrio entre as MMPs e seus inibidores determina a atividade proteolítica (KADOGLOU *et al.* 2005).

IL1 pode aumentar a síntese de MMP, enquanto TGF $\beta$  é responsável pelo aumento na síntese e acúmulo de componentes da matriz extracelular e diminuição na síntese de MMP (BARTOLD & NARAYANAN 2006). TGF $\beta$  e PDGF têm importante papel na patogênese da fibrose, TGF $\beta$  por estimular a deposição de colágeno por miofibroblastos recém replicados, aumentando a síntese e acúmulo de componentes da matriz extracelular e diminuição na síntese de MMP e PDGF por

promover a proliferação dos miofibroblastos, quimiotaxia, estimulação da produção de colágeno e produção e estimulação de células de adesão (BONNER 2004).

Esses dados sugerem que, com o avanço da inflamação e fibrose, mudanças no perfil de citocinas encontradas no tecido gengival normal e diabético regulem a expressão e atividade diferenciadas das MMPs, que são influenciados pela fibrose também através da expressão de mediadores inflamatórios característicos desse processo, por isso durante o avanço da inflamação e consequente cronificação da fibrose, esses mediadores regulam o aumento e diminuição da ativação e expressão gênica das MMPs caracterizadas neste estudo.

Podem ocorrer diferenças na remodelação tecidual da matriz extracelular de diabéticos devido a uma redução da síntese e maturação do colágeno e atividade aumentada da colagenase (HOLZHAUSEN *et al.* 2004).

Sabe-se que elevadas concentrações de MMP 9 e MMP 2 são encontradas no soro de pacientes diabéticos (MAXWELL *et al.* 2001; XUE *et al.* 2005), sendo a MMP 9 um permissivo fator de degradação de insulina em diabéticos quando ativada por ação da tripsina endógena, estando associada às complicações vasculares, retinopatias, nefropatias e arterosclerose desses pacientes (XUE *et al.* 2005). Há um desequilíbrio entre a expressão de MMPs e seus inibidores em diabéticos, o que leva à proteólise excessiva e retardo na cicatrização das úlceras dérmicas, uma vez que o aumento das concentrações de MMPs 1, 2, 3 e 9, IL6, TNF $\alpha$  e diminuição de inibidores são influenciados pela glicação da matriz e formação de AGEs, que levam ao retardo da cicatrização em diabéticos (KADOGLU *et al.* 2005). Neste sentido parece que o aumento da atividade de MMP 9 em diabéticos, como mostrado neste estudo, está relacionado com complicações vistas durante a inflamação nestes animais. Características essas que justificam os dados deste trabalho e que associadas a outras deficiências também encontradas em indivíduos diabéticos, justificam a severa destruição periodontal e perda acelerada do dente destes pacientes.

Devido ao processo de degradação da matriz extracelular observado neste estudo durante os dias de inflamação analisados, pode-se justificar a involução das papilas dérmicas vista aqui, sendo que essa degradação prejudica a sustentação da base epitelial que com o avanço da doença vai perdendo a conformação e eficiência. Como em diabéticos a degradação de alguns componentes da matriz foi maior e houve redução da síntese e maturação do colágeno com atividade aumentada da colagenase, isso demonstra o padrão diferencial de involução das papilas nesses animais.

Mecanismos biológicos importantes como: microangiopatia, alterações no fluido crevicular gengival, alterações no metabolismo do colágeno, resposta inflamatória do hospedeiro alterada, microflora subgengival alterada e predisposição genética são propostos como contribuintes do prejuízo causado por reações inflamatórias em diabéticos. Afetam desfavoravelmente sua saúde periodontal e são preferencialmente multifatoriais (TAYLOR 2001).

Sabe-se que infecções agudas ou inflamações aumentam os níveis de glicose no sangue, necessitando da utilização de mais insulina, o que em diabéticos é prejudicial (MILLER *et al.* 1992; LAFFEL 1999). O controle glicêmico em diabéticos é alterado devido à maior vascularização do periodonto inflamado. Esse tecido serve como fonte endócrina preferencial de TNF $\alpha$  e outros mediadores inflamatórios. Sabe-se que TNF $\alpha$  interfere no metabolismo de lipídios e é um antagonista da insulina, assim como IL6 e IL1 que também são reportados por antagonizar a ação da insulina e também têm seus níveis aumentados com a inflamação (TAYLOR 2001).

O aumento da glicose sanguínea nesses pacientes causado pela doença periodontal, faz com que cresçam os riscos de complicações sistêmicas como: problemas cardíacos, complicações vasculares, nefropatias e outras. Estas, caso já estejam estabelecidas, são agravadas por esse fator, sendo que muitos desses pacientes podem até chegar a não perder o dente, já que correm o risco de morrer antes em consequência do agravamento dessas doenças. O diabetes, devido a essas complicações, é responsável por 2% dos óbitos e está entre as dez doenças que mais matam, com taxa anual de cerca de cinquenta e quatro mil óbitos e constitui a sétima causa principal dos óbitos nos EUA (PARKER *et al.* 1997). E pelo menos uma, entre vinte mortes em todo mundo é atribuída ao diabetes, segundo a OMS.

## CONCLUSÕES

1. Nosso estudo permitiu a elucidação de aspectos que medeiam a patologia desenvolvida, buscando esclarecer processos biológicos e encontrar ferramentas de potencial utilização diagnóstica ou mesmo terapêutica.
2. A doença periodontal levou a expressivas mudanças no sistema de sustentação promovido pelo tecido conjuntivo, assim como das camadas proliferativa e funcionais do epitélio, influenciadas e prejudicadas pelo diabetes.
3. Houve modificação no curso de mecanismos de reparo da lâmina basal e epitelial frente a processos inflamatórios, que tornaram-se mais lentos e prejudicados com o diabetes, afetando os mecanismos de sustentação e reparo epitelial, os processos de reposição celular, revestimento e proteção, comprometendo a homeostase bucal.
4. A doença periodontal sem ter o diabetes como agravante, foi responsável por mudanças nos padrões de expressão das MMPs 2 e 9, que foram afetados pela inflamação e evolução do processo fibrótico. A atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9 decaiu com o avanço da fibrose aos 30 dias de inflamação. O processo fibrótico acentuou a quantidade de RNAm da MMP 9 enquanto o da MMP 2 apresentou declínio. O estado diabético em animais sem estímulo inflamatório diminuiu a atividade das MMPs 2 e 9, enquanto aumentou a expressão gênica da MMP 9 e não influenciou a expressão gênica da MMP 2 em nenhum tempo experimental. A inflamação em diabéticos acentuou a atividade das MMPs 2 e 9 e a fibrose caracterizou expressão gênica decrescente da MMP 9 em diabéticos.
5. O estudo sugere a influência de elementos pós-transcricionais e de mediadores inflamatórios como responsáveis pelos distúrbios e diferenças nas expressões das MMPs analisadas, além de indicar que as variações nos níveis de expressão e atividade destas gelatinases contribuem para a fibrose marcante observada nos diabéticos e resultam em diferentes padrões fibróticos nos animais normais e diabéticos.
6. Esses resultados propõem que a cronificação da inflamação e fibrose deixam o processo de degradação tecidual e de matriz extracelular mais lentos, mas não finalizados e as funções do tecido saudável vão se perdendo com a cronificação da inflamação e o avanço da fibrose. Em diabéticos, os prejuízos periodontais são muito maiores devido à constante exposição à hiperglicemia e que associada à inflamação, podem levar a respostas sistêmicas graves nesses pacientes.

## REFERÊNCIAS CITADAS

- AÇIKGOZ, G.; DEVRIM, I & ÖZDAMAR, S. **2004**. Comparison of keratinocyte proliferation in diabetic and non-diabetic inflamed gingiva. *J Periodontol*, 75: 989-994.
- AIBA, T.; AKENO, N.; KAWANE, T.; OKAMOTO, H. & HORIUCHI, N. **1996**. Matrix metalloproteinases-1 and -8 and TIMP-1 mRNA levels in normal and diseased human gingivae. *Eur J Oral Sci*, 104: 562-569.
- ALEXANDER, C. M. & WERB, Z. **1991**. Extracellular matrix degradation. In *Cell Biology of Extracellular matrix* (Edited by Hay, E. D.). Second Edition. Plenum Press.
- ANDERSON, T.; SCHEIN, P.S.; McMENAMIN, M.G. & COONEY, D.A. **1974**. Streptozotocin diabetes: correlation with extent of pancreatic islet nicotinamide adenine dinucleotide. *J Clin Invest*, 54: 672-677.
- ARDUÍNO, F. **1980**. Diabetes mellitus e suas complicações. Editora Ateneu. São Paulo, 1-78.
- BAKER, P.J. **2005**. Genetic control of the immune response in pathogenesis. *J Periodontol*, 76: 2042-2046.
- BARTOLD, P.M.; WALSH, L.J. & NARAYANAN, A.S. **2000**. Molecular and cell biology of the gingival. *Periodontology* 2000, 24: 28-55.
- BARTOLD, P.M. & NARAYANAN, A.S. **2006**. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontology* 2000, 40: 29-49.
- BENDER, I.B. & BENDER, A.B. **2003**. Diabetes mellitus and the dental pulp. *J Endodon*, 29(6): 383-389.
- BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W.G.I.; BODDEN, M.K.; WINDSOR, L.J.; BIRKEDAL-HANSEN, B.; DECARLO, C. & ENGLER, J.A. **1993**. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*, 4: 197-250.
- BONNER, J.C. **2004**. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*, 15: 255-273.
- CALDEIRA, E.J.; GARCIA, P.J.; MINATEL, E.; CAMILLI, J.C. & CAGNON, V.H.A. **2004**. Morphometric analysis and ultrastructure of the epithelium of the mucosa in diabetic autoimmune NOD mice. *Braz J Morphol Sci*, 21: 930-937.
- CARSON, K.A. **1979**. Citochemical and cytopathological studies of nerve, vascular and salivary gland tissues in a hereditary mouse model for diabetes mellitus. A dissertation submitted to the faculty on the University of North Carolina at Chapel Hill.



- CHAMMAS, R. **1998**. Aspects of physiopathology of sarcoma dissemination. *Acta Oncol Bras*, 18 (1): on-line.
- COLEMAN, J.W. **2001**. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol*, 1(8): 1397-1406.
- CONGET, I. **2002**. Diagnosis, classification and pathogenesis of diabetes mellitus. *Rev Esp Cardiol*, 55: 528-538.
- CUTLER, C.W.; EKE, P.; ARNOLD, R.R. & DYKE, T.E.V. **1991**. Defective neutrophil function in an insulin-dependent diabetes mellitus patient – a case report. *J Periodontol*, 62: 394-401.
- DAHAN, M.; NAWROCKI, B.; ELKAÏM, R.; SOELL, M.; BOLCATO-BELLEMIN, A. L.; BIREMBAUT, P. & TENENBAUM, H. **2001**. Expression of matrix metalloproteinases in healthy and diseased human gingiva. *J Clin Periodontol*, 28: 128-136.
- EJEIL, A.-L.; GAULTIER, F.; IGONDJO-TCHEN, S.; SENNI, K.; PELLAT, B.; GODEAU, G. & GOGLY, B. **2003**. Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression? *J Periodontol*, 74: 196-201.
- GARLET, G.P.; MARTINS Jr, W.; FONSECA, B.A.L.; FERREIRA, B.R. & SILVA J.S. **2004**. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 31: 671-679.
- GARLET, G.P.; AVILA-CAMPOS, M.J.; MILANEZI, C.M.; FERREIRA, B.R. & SILVA, J.S. **2005**. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. *Oral Microbiol Immunol*, 7: 738-747.
- GEIVELIS, M.; TURNER, D.W.; PEDERSON, E.D. & LAMBERTS, B.L. **1993**. Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *J Periodontol*, 64: 980-983.
- GRAVES, D. T. & COCHRAN, D. **2003**. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, 74: 391-401.
- GRAVES, D.T.; LIU, R.; ALIKHANI, M.; AL-MAHAT, H. & TRACKMAN, P.C. **2006**. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis-impact on periodontal pathology. *J Dent Res*, 85(1): 15-21.
- GRODSKY, G.M. et al. **1982**. Metabolic and underlying causes of diabetes mellitus. *Diabetes*, 31: Suppl 1, 45-53.

- GUO, M.; HAN, Y. W.; SHARMA, A. & DE NARDIN, E. **2000**. Identification and characterization of human immunoglobulin G Fc receptors of *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol Immunol*, 15: 119-123.
- GYÖRFI, A.; FAZEKAS, Á.; FEHÉR, E.; ENDER, F. & ROSIVALL, L. **1996**. Effects of streptozotocin – induced diabetes on neurogenic inflammation of gingivomucosal tissue in rat. *J Periodont Res*, 31: 249-255.
- HIROSE, K.; ISOGAI, E.; MIURA, H. & UEDA, I. **1997**. Levels of *Porphyromonas gingivalis* Fimbriae and inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid from adult human subjects. *Microbiol & Immunol*, 41: 21-26.
- HOLZHAUSEN, M.; GARCIA, D.F.; PEPATO, M.T. & MARCANTONIO JR, E. **2004**. The influence of short-term diabetes mellitus and insulin therapy on alveolar bone loss in rats. *J Periodont Res*, 39: 188-193.
- HOVE, K.A. & STALLARD, R.E. **1970**. Diabetes and the periodontal patient. *J Periodontol*, 41: 713-718.
- INGMAN, T.; TERVAHARTALA, T.; DING, Y.; TSCHESCHE, H.; HAERIAN, A.; KINANE, D.F.; KONTTINEN, Y.T. & SORSA, T. **1996**. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, 23: 1127-1132.
- JOHNSON, I.H. **1975**. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *J Periodontal Res*, 10 (6): 332-345.
- KADOGLU, N.P.; DASKALOPOULOU, S.S.; PERREA, D. & LIAPIS, C.D. **2005**. Matrix metalloproteinases and diabetic vascular complications. *Angiology*, 56: 173-189.
- KANTARCI, A. & VAN DYKE, T.E. **2005**. Resolution of inflammation in periodontitis. *J Periodontol*, 76: 2168-2174.
- KAWASAKI, E.; ABIRU, N. & EGUCHI, K. **2004**. Prevention of type 1 diabetes: from the view point of  $\beta$  cell damage. *Diabetes Res Clin Pract*, 66: 27-32.
- KOMATSU, T.; KUBOTA, E. & SAKAI, N. **2001**. Enhancement of matrix metalloproteinase (MMP)-2 activity in gingival tissue and cultured fibroblasts from Down's syndrome patients. *Oral Dis*, 7: 45-55.
- KORNMAN, K. S. **2001**. Patients are not equally susceptible to periodontitis: does this change dental practice and the dental curriculum? *J Dent Educ*, 65 (8): 777-784.

- LAFFEL, L. **1999**. Corpos cetônicos: Uma revisão da fisiologia, patologia e aplicação da monitoração de diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 15: 412-426.
- LAPPIN, D.F.; MACLEOD, C.P.; KERR, A.; MICHELL, T. & KINANR, D. **2001**. Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. *Clinical & Experimental Immunology*, 123(2): 294-300.
- LERNMARK, A. **1999**. Type I diabetes. *Clin Chem*, 45(8) 1331-1338.
- LINDHE, J. **1999**. Tratado de periodontologia clínica e implantologia oral. 3ª edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- LISTGARTEN, M. A. **1986**. Pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol* 13: 418-425.
- LIU, R. K.; CAO, C. F.; MENG, H. X. & GAO, Y. **2001**. Polymorphonuclear neutrophils and their mediators in gingival tissues from generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol*, 72: 1545-1553.
- LYONS, C.R. **1995**. The role of nitric oxide in inflammation. *Adv Immunol*, 60: 323–371.
- MAKELA, M.; SALO, T.; UITTO, V. J. & LARVAJA, H. **1994**. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res*, 73 (8): 1397-1406.
- MATHIS, D.; VENCE, L. & BENOIST, C. **2001**.  $\beta$ -Cell death during progression to diabetes. *Nature*, 414: 792-798.
- MAXWELL, P.R.; TIMMS, P.M.; CHADRAN, S. & GORDON, D. **2001**. Peripheral blood level alterations of TIMP-1, MMP-2 and MMP-9 in patients with type I diabetes. *Diabet Med*, 18: 777-780.
- MEALEY, B. Position Paper. **2000**. Diabetes and periodontal disease. *J Periodontol*, 71: 664-678.
- MICHALOWICZ, B. S. **1994**. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *J Periodontol*, 65: 479-488.
- MILLER, L.S.; MANWELL, M.A.; NEWBOLD, D.; READING, M.E.; RASHEED, A.; BLODGETT, J. & KORNMAN, K.S. **1992**. The relationship between reduction in periodontal inflammation and diabetes control: a report of 9 cases. *J Periodontol*, 63: 843-848.
- MIYASAKI, K.T. **1991**. The neutrophil: Mechanism of controlling periodontal bacteria. *J Periodontol*, 62: 761-774.
- MONTE, O.; LONGUI, C.A. & CALLIARI, L.E.P. **1998**. Endocrinologia para a o pediatra. 2ª edição., Editora Ateneu, São Paulo.

- MORDES, I.P.; ROSSINI, A.A. **1981**. Animal models of diabetes. *Am J Méd*, 70: 353-360.
- NANCI, A. & BOSSHARDT, D.D. **2006**. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology 2000*, 40: 11-28.
- NATTRAS, M. & HALLES, P.F. **1988**. Clinical endocrinology and diabetes. In: *Diabetes Mellitus*. Churchill Livingstone, 155-182.
- OLIVER, R.C. & TERVONEN, T. **1993**. Periodontitis and tooth loss: comparing diabetes with the general population. *J Am Dent Assoc*, 124: 71-76.
- OLIVER, R.C. & TERVONEN, T. **1994**. Diabetes – a risk factor for periodontitis in adults? *J periodontol*, 65: 530-538.
- OWEN, C. A. & CAMPBELL, E. J. **1995**. Neutrophil proteinases and matrix degradation. The cell biology of pericellular proteolysis. *Seminars in Cell Biology*, 6: 367-376.
- PAGE, R. C. & SCHROEDER, H. E. **1976**. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*, 33: 235-249.
- PAGE, R. C. & SCHROEDER, H. E. **1982**. Periodontitis in man and other animals. A comparative review. Basel. S. Karger.
- PAPAPANOU, P.N.; WENNSTRÖM, J.L. & GRÖNDAHL, K. **1989**. A ten-year retrospective study of periodontal disease progression. *J Clin Periodontol*, 16: 403-411.
- PARKER, S.L. **1997**. Cancer statistic. *Ca Cancer J Clin*, 47: 5.
- PARKS, W. C. & MECHAM, R. P. **1998**. Matrix metalloproteinases. Academic Press.
- PERSSON, R.E.; HOLLENDER, L.G.; MACENTEE, M.I.; WYATT, C.C.L.; KIYAK, H. A. & PERSSON, G.R. **2003**. Assessment of periodontal conditions and systemic disease in older subjects – focus on diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*, 30: 207-213.
- PONTE, E.; TABAJ, D.; MAGLIONE, M. & MELATO, M. **2001**. Diabetes mellitus and oral disease. *Acta Diabetol*, 38: 57-62.
- POTEMPA, J.; BANBULA, A. & TRAVIS, J. **2000**. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontology 2000*, 24: 153-192.
- PREBER, H.; BERGSTRÖM, J. & LINDER, L. E. **1992**. Occurrence of periopathogens in smoker and non-smoker patients. *J Clin Periodontol*, 19: 667-671.
- REINHARDT, R.A.; MASADA, M. P.; KALDAHL, W.B.; DUBOIS, L.M. & KORNMAN, K.S. **1993**. Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol*, 20: 225-231.

- ROBBINS, S.L. **1989**. Doenças sistêmicas. In: Diabetes mellitus. Patologia estrutural e funcional. W.B. Saunders Company, 238-250.
- ROBBINS, S.L.; KUMAR, V. & COTRAN, R. **1989**. Patologic basis of disease, 4ª edição. W.B. Saunders Company, 992-1010.
- SAITO, T.; SHIMAZAKI, Y.; KIYOHABA, Y.; KATO, I.; KUBO, M.; LIDA, M. & KOGA, T. **2004**. The severity of periodontal disease is associated with the development of glucose intolerance in non-diabetics: The Hisama study. *J Dent Res*, 83(6): 485-490.
- SEGUIER, S.; GODEAU, G. & BROUSSE, N. **2000**. Collagen fibers and inflammatory cells in healthy and diseased human gingival tissues: a comparative and quantitative study by immunochemistry and automated image analysis. *J Periodontol*, 71: 1079-1085.
- SIGUSCH, B.; EICK, S.; PFISTER, W.; KLINGER, G. & GLOCKMAN, E. **2001**. Altered chemotactic behavior of crevicular PNMs in different forms of periodontitis. *J Clin Periodontol*, 28: 162-167.
- SOCRANSKY, S. S. **1977**. Microbiology of periodontal disease. Present status and future considerations. *J Periodontol*, 48 (9): 497-504.
- SOUTHERLAND, J.H.; TAYLOR, G.W.; MOSS, K.; BECK, J.D. & OFFENBACHER, S. **2006**. Commonality in chronic inflammation diseases: periodontitis, diabetes, and coronary artery disease. *Periodontology 2000*, 40: 130-143.
- STERNLICHT, M. D. & WERB, Z. **2001**. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17: 463-516.
- TAANI, D. S. **1997**. Association between cigarette smoking and periodontal health. *Quintessence Int*, 28 (8): 535-539.
- TAYLOR, G.W. **2001**. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann periodontol*, 6(1): 99-112.
- TERVAHARTIALA, T; PIRILA, E.; CEPONIS, A.; MAISI, P.; SALO, T.; TUTER, G.; KALLIO, P.; TORNWALL, J.; SRINIVAS, R.; KONTTINEN, Y. T. & SORSA, T. **2000**. The in vivo expression of collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2, -8, -13 and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res*, 79 (12): 1969-1977.
- TODESCAN, J. H. **2001**. Doença Periodontal. Conceitos e classificações. Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda.

- TOKORO, Y.; YAMAMOTO, T. & HARA, K. **1996**. IL-1 beta mRNA as the predominant inflammatory cytokine transcript: correlation with inflammatory cell infiltration into human gingiva. *J Oral Pathol Med* 25 (5): 225-231.
- TSAI, C-C.; HO, Y-P & CHEN, C-C. **1995**. Levels of interleukin -1 $\beta$  and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adults periodontitis. *J Periodontol*, 66: 852-859.
- VAN DER ZEE, E.; EVERTS, V. & BEETERSON, W. **1997**. Cytokines modulate routes of collagen breakdown. Review with special emphasis on mechanisms of collagen degradation in the periodontium and the burst hypothesis of periodontal disease progression. *J Clin Periodontol*, 24: 297-305.
- VARELA-CALVINO, R.; SGARBI, G.; ARIF, S. & PEAKMAN, M. **2000**. T-Cell reactivity to the P2C nonstructural protein of a diabetogenic strain of coxsackievirus B4. *Virology*, 274(1): 56-64.
- WADA, L.Y. **2002**. Contagem de carboidratos: mais fácil que contar até 3. Editora Ateneu. São Paulo, 3-25.
- WAHL, S.M. HINES, K.L. IMAHICHI, T. et al. **1994**. Regulation of chronic inflammation. In: *Molecular Pathogenesis of Periodontal Disease*. Washington DC: The American Society for Microbiology, 183-190.
- WILSON, T. G. **1999**. Not all patients are the same: systemic risk factors for adult periodontitis. *Gen Dent*, 47 (6): 580-588.
- WOLLEY, D. E. & DAVIES, R. M. **1981**. Immunolocalization of collagenase in periodontal disease. *J Periodont Res*, 16: 292-297.
- WYNN, T.A. **2004**. Fibrotic disease and the Th1/Th2 paradigm. *Nat Rev Immunol*, 4(8): 583-594.
- XUE, M.; THOMPSON, P.J.; CLIFTON-BLIGH, R.; FULCHER, G.; GALLERY, E.D.M. & JACKSON, C. **2005**. Leukocyte matrix metalloproteinase-9 is elevated and contributes to lymphocyte activation in type I diabetes. *J Biochem and Cell Biol*, 37: 2406-2416.
- ZHOU, J. & WINDSOR, J. **2006**. *Porphyromonas gingivalis* affects host collagen degradation by affecting expression, activation, and inhibition of matrix metalloproteinases. *J Periodont Res*, 41: 47-54.
- ZIMMET, P.; ALBERTTI, K.G.M.M. & SHAW, J. **2001**. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414: 782-787.