

Níveis elevados de metaloproteinase da matriz-9 em sítios com destruição tecidual de pacientes com periodontite crônica generalizada

Carlos Marcelo da S. Figueredo*

Alessandra Ferreira Crispino**

Eduardo Muniz Barreto Tinoco*

Resumo

O objetivo deste estudo foi determinar os níveis de MMP-9 (gelatinase B) presentes no fluido crevicular gengival de sítios com destruição tecidual (PP) de pacientes com periodontite crônica generalizada e compará-los aos níveis de MMP-9 de sítios com inflamação gengival, mas sem sinais de perda de inserção, destes mesmos pacientes (GP) e de pacientes afetados apenas por gengivite (GG). O grupo teste constituiu-se de 24 pacientes com periodontite crônica, sendo 7 homens e 17 mulheres, com média de idade de 48,2 anos ($DP \pm 7,4$) e o grupo controle, de 22 pacientes, 10 homens e 12 mulheres, com média de idade de 47,5 anos ($DP \pm 9,4$), sem sinais clínicos de perda de inserção. Os parâmetros clínicos analisados foram Índice de Placa (IP), Índice Gengival (IG), Profundidade de Bolsa à Sondagem (PBS) e Nível de Inserção Clínica (NI). As amostras de fluido gengival foram coletadas com o método de lavagem intra-sulcular. Os níveis de MMP-9 nas amostras coletadas foram determinados através da técnica de ELISA. Os resultados mostraram que a quantidade de MMP-9 nos sítios PP (318,5 $DP \pm 304,9$) é significativamente maior do que em sítios GG (média 110 $DP \pm 121$) ($p < 0,003$) e GP (106 $DP \pm 118$) ($p < 0,001$), e nenhuma diferença significativa foi observada entre GG e GP, apesar de todos os sítios apresentarem níveis de IG e IP similares. Concluindo, a elevação dos níveis de MMP-9 nos sítios PP sugere que essa enzima pode estar envolvida no complexo processo de destruição tecidual que ocorre na periodontite.

Palavras-chave: Periodontite. MMP-9.

INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença crônica inflamatória iniciada e mantida pela placa bacteriana e seus produtos, que se caracteriza pela destruição dos tecidos periodontais, com uma subsequente perda de inserção conjuntiva. A progressão da lesão periodontal durante o processo inflamatório é consequência do colapso da porção mais coronária das fibras de Sharpey ancoradas no cimento radicular (VAN DER ZEE; EVERST; BEERTSEN, 1996).

A integridade dos tecidos conjuntivos do corpo humano é determinada pelo balanço entre reabsorção e reparo de componentes da matriz extracelular. Existe considerável evidência de que, entre as possíveis proteinases, as metaloproteinases da matriz desempenham papel principal na reabsorção fisiológica do colágeno e outras macromoléculas durante o desenvolvimento e a remodelação pós-natal e, também, na reabsorção patológica associada, por exemplo, à invasividade de tumores malignos, à reabsorção de estruturas na doença periodontal e à destruição de articulações

* Professor Adjunto de Periodontia da UNIGRANRIO e da UERJ
Av. Marechal Henrique Lott 180 bl 1 ap 1904 Barra da Tijuca
22.631-370 Rio de Janeiro RJ Brasil

E-mail: cmfigueredo@hotmail.com

** Mestre em Periodontia pela UNIGRANRIO

na artrite reumatóide (KRANE, 1994; INGMAN et al., 1996).

As metaloproteinases da matriz (MMP) constituem uma família de enzimas proteolíticas que, coletivamente, são capazes de degradar a maioria das macromoléculas da matriz extracelular, incluindo o colágeno intersticial e o da membrana basal, fibronectina, laminina e proteoglicanas (BIRKED HANSEN, 1993; NIKKARI et al., 1996; ALPAGOT et al., 2001).

Os neutrófilos, que representam a primeira linha de defesa do organismo contra agentes agressores, expressam dois tipos de metaloproteinases — MMP-8, localizada no grânulo secundário, e MMP-9, localizada no grânulo terciário (INGMAN et al., 1994) — e liberam rapidamente essas enzimas em resposta a vários estímulos (BIRKEDAL-HANSEN, 1993).

Apesar do importante papel que exercem na defesa do hospedeiro, os neutrófilos têm sido apontados como mediadores de eventos teciduais destrutivos na doença periodontal, por sua habilidade de gerar metabólitos oxigenados reativos, combinada à capacidade de liberar proteinases, tornando-se capazes de destruir células normais e degradar estruturas de tecido conjuntivo (WEISS, 1989). Entre as enzimas contidas nos neutrófilos, a MMP-8 e a MMP-9, juntamente com a elastase, são as enzimas proteolíticas com o maior potencial para agir como mediadoras da destruição tecidual na injúria imunológica.

Como o colágeno tipo IV, principal constituinte da membrana basal, e o colágeno tipo V, contido nos tecidos intersticiais, são substratos para MMP-9 (gelatinase B), considera-se que a sua exocitose a partir dos grânulos terciários seja essencial para a migração dos neutrófilos através das membranas basais e tecidos conjuntivos (DELCLAUX et al., 1996; BORREGAARD; COWLAND, 1997).

Durante os últimos anos, a análise da resposta do hospedeiro através da avaliação dos níveis de proteases no fluido gengival tem despertado grande interesse. Ela visa a identificar, principalmente, mecanismos do hospedeiro envolvidos no desenvolvimento das lesões periodontais (LAMSTER; SMITH; CELENTI, 1994). A

medição dos níveis de metaloproteinases tem sido considerada promissora na busca dos papéis específicos dessas enzimas na etiopatogenia das diferentes formas de doença periodontal (McCULLOCH, 1994) e aponta para um futuro próximo no qual as metaloproteinases possam ser alvos importantes para a terapia da doença periodontal.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi determinar os níveis de MMP-9 (gelatinase B) no fluido crevicular gengival de sítios com destruição tecidual (PP) de pacientes com periodontite crônica generalizada e compará-los aos níveis dessa enzima em sítios com inflamação gengival, mas sem sinais de perda de inserção destes mesmos pacientes (GP) e de pacientes afetados apenas por gengivite (GG).

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção de pacientes

Foram selecionados 24 pacientes portadores de periodontite crônica generalizada, classificados de acordo com a Academia Americana de Periodontia (1999). Deste grupo, 17 eram do sexo feminino e 7 do masculino, com média de idade de 48,2 anos ($DP \pm 7,4$). Todos apresentavam pelo menos 5 sítios com Profundidade de Bolsa à Sondagem (PBS) superior ou igual a 5 mm e possuíam, no mínimo, 20 dentes. Deste grupo, 5 pacientes eram fumantes.

O grupo controle foi formado por 22 pacientes com gengivite, 12 do sexo feminino e 10 do masculino, com média de idade de 47,5 anos ($DP \pm 9,4$). Todos possuíam no mínimo 20 dentes, os quais não apresentavam sinais clínicos de perda de inserção. Somente 3 dos pacientes eram fumantes.

Os participantes do estudo não apresentavam doenças sistêmicas relatadas, não haviam utilizado antibióticos ou antiinflamatórios, nem haviam sido submetidos a tratamento periodontal nos seis meses anteriores ao início da investigação. O objetivo do estudo foi transmitido aos pacientes selecionados, que forneceram consentimento por escrito para participarem da pesquisa.

Parâmetros clínicos

A presença de placa supragengival (IP) e de inflamação gengival (IG) foi registrada antes da coleta, utilizando-se o critério de Silness e Løe (1964) e Løe (1967). Somente sítios com valor de IG de 1 ou 2 foram incluídos. Em sítios sem inflamação gengival clínica (valor 0), o volume de fluido crevicular gengival foi insuficiente para permitir a medição, enquanto sítios com intensa inflamação (IG = 3) foram descartados do exame, devido à dificuldade de se evitar a contaminação com sangue. O registro da PBS, caracterizada pela distância da margem gengival até o fundo da bolsa ou sulco, e a medida do Nível de Inserção Clínica (NI), caracterizada pela distância da junção amelocementária ao fundo da bolsa ou sulco, foram realizados com uma sonda periodontal manual calibrada, tipo Williams (HU-Friedy®, USA), mantendo-a paralelamente ao longo eixo do dente e registrando o milímetro mais próximo. As medidas foram tomadas em seis faces de todos os dentes dos pacientes. O registro dos parâmetros clínicos e a coleta das amostras foram realizados por um único examinador.

Sítios selecionados

No grupo de pacientes com periodontite, foram selecionados 5 sítios por paciente, com bolsas periodontais superiores ou iguais a 5 mm e IG entre 1 e 2. Esses sítios com destruição tecidual foram identificados como sítios PP. Ainda neste grupo, selecionaram-se 5 sítios por paciente, com PBS inferior ou igual a 3 mm e IG entre 1 e 2, para que possuíssem fluido gengival suficiente. Esses sítios com gengivite em pacientes com periodontite foram identificados como sítios GP.

No grupo controle, a coleta foi realizada em 5 sítios por paciente, com PBS inferior ou igual a 3 mm e IG entre 1 e 2. Tais sítios foram identificados como sítios GG.

Somente foram incluídos no estudo sítios que apresentaram níveis de inserção à sondagem iguais aos níveis de profundidade à sonda-

gem, a fim de excluir sítios com retrações gengivais ou hiperplasias gengivais.

Coleta das amostras

Foi utilizada a técnica de lavagem intra-sulcular modificada de Salonen e Paunio (1991). No momento da coleta, isolavam-se os elementos dentários com roletes de algodão e secava-se a região com leve jato de ar. Quando necessário, removia-se a placa supragengival. Aguardavam-se 30 segundos para que houvesse fluxo de fluido gengival. As amostras foram coletadas por um aparelho denominado Fill-Master® tipo 251 (Delta Scientific Medical, Dinamarca), com liberação controlada de solução salina tamponada, conectada à unidade suctora. O cabo coletor era gentilmente aproximado da margem gengival, e, então, os sulcos ou bolsas eram lavados pelo sistema de liberação lenta. Uma alíquota de 0,5 ml de solução salina tamponada (pH 7,4) era drenada, simultaneamente, através do cabo coletor para dentro do tubo Eppendorf. Amostras contaminadas com sangue foram descartadas. Após a coleta, o tubo era preenchido, se necessário, até 1,0 ml com a solução salina tamponada. Em intervalo máximo de 30 minutos, o tubo Eppendorf era centrifugado (Microcentrífuga CT-801®/Inova, Suécia), durante 5 minutos, a 15.000 rpm. O sobrenadante era transferido para um novo tubo Eppendorf e transportado para um *freezer* com temperatura de -70°C, sendo estocado até o momento da análise.

Análise da MMP-9

O conteúdo de MMP-9 (gelatinase B) nas amostras de fluido crevicular gengival foi medido com um *Kit* ELISA comercialmente disponível (Quantikine® R & D Systems Inc., Minneapolis, MN, EUA). As amostras foram diluídas 100 vezes e adicionadas a uma placa de poliestireno de 96 depressões, coberta previamente com anticorpos monoclonais contra MMP-9. Em cada depressão, foram dispensados 100 µl da amostra a ser analisada. A placa

foi, então, encubada por 1h em temperatura ambiente e, posteriormente, foi lavada com uma solução tampão e secada manualmente. Esse processo foi repetido três vezes para completar um total de quatro lavagens. Foram, então, adicionados a cada depressão 200 µl de anticorpo policlonal contra MMP-9 total conjugado a peroxidase. Novamente a placa foi encubada por 1h nas mesmas condições anteriores. A lavagem com uma solução tampão e a aspiração foram repetidas por mais quatro vezes. A cada depressão foram adicionados 200 µl do substrato contendo peróxido de hidrogênio e cromógeno tetrametilbenzidina estabilizado. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, foi adicionada a solução finalizadora (100 mL de ácido sulfúrico). A determinação da densidade óptica de cada depressão foi realizada por um espectrofotômetro com absorção a 405 nm. Cada placa possuía uma curva padrão obtida por uma diluição seriada de uma Solução Padrão de MMP-9 fornecida pelo fabricante.

Análise estatística

O teste de Mann-Whitney-U foi utilizado para comparar as diferenças obtidas entre os

sítios de pacientes com periodontite (GP e PP) e os sítios de pacientes do grupo controle (GG). O teste Wilcoxon foi usado para comparar valores obtidos entre as duas categorias de sítios dos pacientes com periodontite (GP e PP). O nível de significância foi determinado em 5% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

Os resultados clínicos mostraram que o IP e o IG foram similares em sítios com perda de inserção de pacientes com periodontite (PP) e em sítios apenas com gengivite (GG) (TABELA 1). Tais índices foram ligeiramente mais baixos em sítios com bolsas rasas (GP) de pacientes com periodontite, sem, contudo, alcançar significância estatística (TABELA 1).

Os níveis de MMP-9 no fluido gengival de sítios com perda de inserção (PP) de pacientes com periodontite (média 318,5 DP \pm 304,9) foram significativamente maiores do que os de amostras de pacientes afetados somente por gengivite (GG) (média 110 DP \pm 121). Não se constataram diferenças significativas entre a quantidade de MMP-9 de sítios GG (média 110

TABELA 1

Valores médios (\pm desvio padrão) para Índice Gengival (IG), Índice de Placa (IP) e Profundidade de Bolsa à Sondagem (PBS) em amostras de bolsas gengivais rasas inflamadas em pacientes afetados apenas por gengivite (GG n=22), em amostras de bolsas rasas (GP n=24) e de bolsas profundas (PP n=24) em pacientes com periodontite

	GG (n=22)	<i>p1</i>	GP (n=24)	<i>p2</i>	PP (n=24)	<i>p3</i>
Índice Gengival (IG)	1,2 (\pm 0,4)	N.S.	1,2 (\pm 0,6)	N.S.	1,7 (\pm 0,3)	N.S.
Índice de Placa (IP)	1,7 (\pm 0,5)	N.S.	1,5 (\pm 0,6)	N.S.	2,1 (\pm 0,5)	N.S.
Profundidade de Sondagem (PB)	2,1 (\pm 0,2)	N.S.	1,7 (\pm 0,4)	<0,0001	6,2 (\pm 0,7)	<0,0001

Notas: *p1* - indica a probabilidade da diferença entre sítios GG e GP calculados com teste U Mann-Whitney.

p2 - indica a probabilidade da diferença entre sítios GP e PP calculados com teste Wilcoxon.

p3 - indica a probabilidade da diferença entre sítios GG e PP calculados com teste U Mann-Whitney.

N.S. - não significante.

DP \pm 121) e de sítios GP (média 106 DP \pm 118) (FIGURA 1).

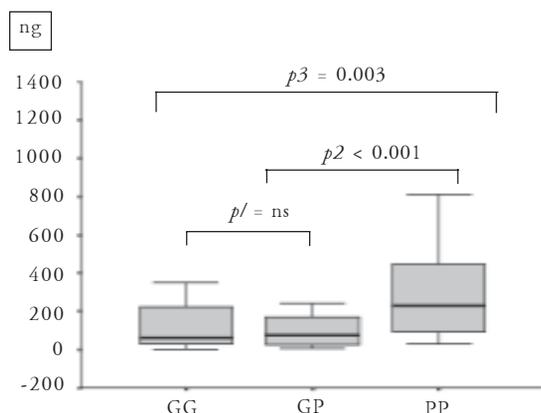


FIGURA 1 – Quantidade total de MMP-9 em nanogramas (ng) nos grupos GG, GP e PP

p1 - indica a probabilidade da diferença entre sítios GG e GP calculados com teste U Mann-Whitney.

p2 - indica a probabilidade da diferença entre sítios GP e PP calculados pelo teste Wilcoxon.

p3 - indica a probabilidade da diferença entre sítios GG e PP calculados com teste U Mann-Whitney.

Comparando-se as duas categorias de sítios dentro do grupo de pacientes com periodontite, os níveis de MMP-9 foram mais elevados nos sítios com destruição tecidual (PP) do que naqueles com inflamação gengival apenas (GP) (FIGURA 1). A diferença entre PP e GP foi significativa ($p < 0,001$).

DISCUSSÃO

Neste estudo, encontramos a presença de MMP-9 no fluido gengival de pacientes com gengivite e de pacientes com periodontite crônica. Comparando entre si os diferentes tipos de sítios analisados, aqueles com perda de inserção (PP) apresentaram níveis significativamente mais elevados de MMP-9 do que os sítios com inflamação, mas sem destruição periodontal (GG e GP).

Os elevados níveis de gelatinase encontrados no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica corroboram estudos anteriores nos quais se relata que os níveis de gelatinase nos fluidos orais aumentam com a severidade

da doença periodontal (GANGBAR et al., 1990; TENG; SODEK; McCULLOCH, 1992; MÄKELA et al., 1994; SÉGUIER et al., 2001; SOELL et al., 2002).

Mäkela et al. (1994), investigando enzimas gelatinolíticas em fluidos orais, verificaram que a quantidade de MMP-9 em indivíduos com periodontite do adulto avançada era aproximadamente 10 vezes mais elevada (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) do que em indivíduos com periodonto saudável (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Soell et al. (2002) também encontraram níveis de MMP-9 significativamente mais elevados no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica avançada do que no de indivíduos portadores de saúde periodontal.

Nosso estudo procurou analisar os pacientes com periodontite de duas formas: investigando a quantidade de MMP-9 em sítios com destruição tecidual e, também, em sítios com inflamação gengival, mas sem perda de inserção periodontal. Os resultados mostram que os sítios com perda de inserção (PP) apresentaram níveis significativamente mais elevados do que aqueles com inflamação mas sem perda de inserção (GP) presentes nestes mesmos pacientes. Além disso, níveis de MMP-9 de sítios de pacientes com gengivite (GG) foram semelhantes aos de sítios com o mesmo nível de inflamação e, também sem perda de inserção, de pacientes com periodontite (GP).

Os altos níveis de gelatinase e colagenase no fluido gengival e na saliva de pacientes com periodontite fez com que fosse indicada a sua utilização como marcadores de diagnóstico da fase destrutiva de doença periodontal crônica (INGMAN et al., 1993; GOLUB et al., 1995; SÉGUIER et al., 2001). Segundo Teng, Sodek e McCulloch (1992), indivíduos com perda de inserção progressiva exibiram níveis de gelatinase no fluido gengival aproximadamente 40% mais elevados do que indivíduos com lesões periodontais estáveis.

Evidências da atuação da MMP-9 no extravasamento e na migração dos neutrófilos (WESTERLUND et al., 1996), na degradação de colágeno (INGMAN et al., 1994), na reabsorção óssea normal e patológica (OKADA et al., 1995; KUSANO et al., 1998) e no au-

mento do poder quimiotático da IL-8 (OPDENAKKER et al., 2001) revelam efeitos pró-inflamatórios desta metaloproteinase e sugerem papel relevante da MMP-9 na patogênese de doenças inflamatórias, como a periodontite.

Vários autores têm proposto que a liberação de MMP e sua ativação possam representar passos regulatórios cruciais em diferentes fases da doença periodontal (TENG, SODEK; McCULLOCH, 1992; WESTERLUND et al., 1996). Os mecanismos de ativação *in vivo* da gelatinase derivada dos neutrófilos ainda não são claros (FRENCH et al., 1994). Segundo a literatura, eles podem resultar da ação de metabólitos oxigenados reativos, gerados pela mieloperoxidase dos neutrófilos durante o surto respiratório (PEPPIN; WEISS, 1986; SORSA et al., 1994; HALINEN et al., 1996), ou da ação de metabólitos bacterianos, como o sulfito de hidrogênio (TENG, SODEK; McCULLOCH, 1992). A pró-enzima também pode ser ativada proteoliticamente por enzimas, como a plasmina, catepsina G e elastase (SORSA et al., 1994; DELCLAUX et al., 1996; NIKKARI et al., 1996). Esta última pode ativar diretamente a MMP-9 ou, de forma alternativa, inativar seu inibidor tecidual TIMP. Em contrapartida, a gelatinase já ativada pode inativar proteoliticamente inibidores endógenos de proteinases, como a antitripsina- $\alpha 1$, que representa o principal inibidor de elastase, colaborando para o aumento do colapso tecidual. De fato, Mäkela et al. (1994) e Ingman et al. (1994) encontraram boa correlação entre atividade de elastase e de gelatinase em amostras salivares de pacientes com periodontite do adulto.

Recentemente, Alpagot et al. (2001) constataram que os níveis de MMP-3 (estromalisina) e TIMP-1 no fluido gengival de pacientes com periodontite não tratada podem ser utilizados como fatores de prognóstico para progressão de periodontite. A MMP-3 também exerce significativo papel na ativação da pró-MMP-9 latente (OGATA; ENGHILD; NEGASE, 1992; KRANE, 1994; MURPHY et al., 1994; KUSANO et al., 1998), o que tem sido referido como efeito cooperativo importante entre gelatinases e estromalisinas na degradação tecidual

(KUSANO et al., 1998). Dessa forma, a presença de níveis mais altos de MMP-3 no fluido gengival de sítios com perda de inserção progressiva em relação a sítios estáveis, encontrada por Alpagot et al. (2001), pode estar associada também à maior atividade de MMP-9 nestes sítios.

A detecção de altos níveis de MMP-9 em pacientes com periodontite crônica por meio da técnica de ELISA no presente estudo confirma os resultados obtidos por INGMAN et al. (1996) e SOELL et al. (2002), que também utilizaram esta técnica para avaliar níveis de MMP-9 no fluido gengival. Ramos-DeSimone e French (1994) demonstraram, por meio de pesquisa *in vitro*, que anticorpos monoclonais contra MMP-9 humana são úteis para avaliar o papel da MMP-9 em processos patológicos. Os anticorpos monoclonais são gerados contra os peptídeos das extremidades amino- e carboxílicas da MMP-9 e são específicos para MMP-9, não reagindo com a MMP-2 (gelatinase A) por ELISA (OPDENAKKER et al., 2001).

A técnica de ELISA adotada neste estudo utiliza anticorpos contra MMP-9 total humana e consegue quantificar a MMP-9 ativa somada a pró-MMP-9. Esta técnica não é capaz de analisar a atividade gelatinolítica total, nem as frações ativas e latentes separadamente. No entanto, ela é extremamente sensível, logrando detectar, segundo Zucker et al. (1994), uma concentração mínima de MMP-9 de 0,2 ng/ml, enquanto, no ensaio zimográfico com gelatina, a concentração mínima detectável é de 3 ng/ml. Outra limitação do ensaio zimográfico para a avaliação da MMP-9 deriva do fato de que as gelatinases são freqüentemente lábeis, e sua atividade enzimática pode diminuir durante a purificação e a estocagem da enzima (ZUCKER et al., 1994).

Com relação aos fumantes, não foi necessário apresentar independentemente seus dados, devido ao baixo número de amostras dos mesmos e à não influência do fumo nos resultados.

Concluindo, a elevação dos níveis de MMP-9 nos sítios PP sugere que essa enzima pode estar envolvida no complexo processo de destruição tecidual que ocorre na periodontite.

High levels of metalloproteinase-9 in sites showing tissue destruction of patients with generalized chronic periodontitis

Abstract

The aim of this study was to evaluate the levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in tissue destruction sites of patients with chronic generalized periodontitis (PP) and to compare them to gingival inflammation sites without tissue destruction, in the same patients (GP) and in patients just with gingivitis (GG). The test group consisted of 24 patients with chronic periodontitis, 7 males and 17 females (mean age 48.2, SD \pm 7.4 years), and the control group was formed by 22 subjects, 10 males and 12 females (mean age 47.5 DP \pm 9.4), without signs of periodontal destruction. The analyzed clinical parameters were Plaque Index (PI), Gingival Index (GI), Pocket Probing Depth (PPD) and Attachment Level (AL). GCF samples were collected by an intracrevicular washing method. The MMP-9 levels of the samples were analysed by ELISA. The results revealed that the amount of MMP-9 in PP sites (318 ± 304.9) was remarkably higher than in GP sites (106 ± 118) ($p < 0.003$) and GG sites (110 ± 121) ($p < 0.001$). No significant difference was noticed between GP and GG sites, in spite of presenting similar GI and PI levels. In conclusion, the high levels of MMP-9 in PP sites suggest that that enzyme may be involved in the complex process of tissue destruction which occurs during the periodontitis.

Keywords: Periodontitis. MMP-9.

REFERÊNCIAS

ALPAGOT, T. et al. Longitudinal evaluation of GCF MMP-3 and TIMP-1 levels as prognostic factors for progression of periodontitis. *J Clin Periodontol*, v.28, p.353-359, 2001.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol*, v.64, p.474-484, 1993.

BORREGAARD, N.; COWLAND, J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, v.89, n.10, p.3503-3521, 1997.

DELCLAUX, C. et al. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v.14, n.3, p.288-295, 1996.

FRENCH, D. L. et al. Matrix metalloproteinase-9 in tumor cell invasion. *Ann NY Acad Sci*, v.732, p.324-333, 1994.

GANGBAR, S. et al. Identification of polymorphonuclear leukocyte collagenase and gelatinase activities in mouthrinse samples: correlation with periodontal disease activity in adult and juvenile periodontitis. *J Periodontol Res*, v.25, p.257-267, 1990.

GOLUB, L. M. et al. Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. *J Clin Periodontol*, v.22, p.100-109, 1995.

HALINEN, S. et al. Characterization of matrix metalloproteinase (MMP-8 and -9) activities in the saliva and in gingival crevicular fluid of children with Down's syndrome. *J Periodontol*, v.67, p.748-754, 1996.

INGMAN, T. et al. Salivary collagenase, elastase- and trypsin-like proteases as biochemical markers of periodontal tissue destruction in adult and localized juvenile periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, v.8, p.298-305, 1993.

INGMAN, T. et al. Multiple forms of gelatinases/type IV collagenases in saliva and gingival crevicular fluid of periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, v.21, p.26-31, 1994.

INGMAN, T. et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, v.23, p.1127-1132, 1996.

KRANE, S. M. Clinical importance of metalloproteinases and their inhibitors. *Ann NY Acad Sci*, v.732, p.1-10, 1994.

KUSANO, K. et al. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9 and -13) by Interleukin-1 and Interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinol*, v.139, n.3, p.1338-1345, 1998.

LAMSTER, I. B.; SMITH, Q. T.; CELENTI, R. S. Development of a risk profile for periodontal disease: microbial and host response factors. *J Periodontol*, v.65, p.511-520, 1994.

- LÖE, H. The gingival index, the plaque index and the retention index system. *J Periodontol*, v.38, p.610-616, 1967.
- MÄKELA, M. et al. Matrix metalloproteinases (MMP-2 e MMP-9) of oral cavity: cellular origin and relationships to periodontal status. *J Dent Res*, v.73, n.8, p.1397-1406, 1994.
- McCULLOCH, C. A. G. Collagenolytic enzymes in gingival crevicular fluid as diagnostic indicators of periodontitis. *Ann NY Acad Sci*, v.732, p.152-164, 1994.
- MURPHY, G. et al. Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann NY Acad Sci*, v.732, p.31-41, 1994.
- NIKKARI, S. T. et al. Macrophages contain 92-kDa gelatinase (MMP-9) at the site of degenerated internal elastic lamina in temporal arteritis. *Am J Pathol*, v.149, n.5, p.1427-1433, 1996.
- OGATA, Y.; ENGHILD, J. J.; NEGASE, H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem*, v.267, p.3581-3584, 1992.
- OKADA, Y. et al. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone reabsorption. *Lab Invest*, v.72, n.3, p.311-322, 1995.
- OPDENAKKER, G. et al. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol*, v.69, p.851-859, 2001.
- PEPPIN, G. J.; WEISS, S. J. Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.83, p.4322-4326, 1986.
- RAMOS-DeSIMONE, N.; FRENCH, D. L. Monoclonal antibodies to human MMP-9. *Ann NY Acad Sciences*, v.732, p.469-471, 1994.
- SALONEN, J. I.; PAUNIO, K. U. An intracrevicular washing method for collection of crevicular contents. *Scan J Dent Res*, v.99, p.406-412, 1991.
- SÉGUIER, S. et al. 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*, v.72, p.1398-1406, 2001.
- SILNESS, J.; LÖE, H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand*, v.22, p.121-135, 1964.
- SOELL, M. et al. Cathepsin C, matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in gingival and gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Dent Res*, v.81, n.3, p.174-178, 2002.
- SORSA, T. et al. Effects of tetracyclines on neutrophil, gingival and salivary collagenases. *Ann NY Acad Sci*, v.732, p.112-131, 1994.
- TENG, Y. T.; SODEK, J.; McCULLOCH, C. A. G. Gingival crevicular fluid gelatinase and its relationship to periodontal disease in human subjects. *J Periodontol Res*, v.27, p.544-552, 1992.
- VAN DER ZEE, E.; EVERST, V.; BEERTSEN, W. Cytokine-induced endogenous procollagenase stored in the extracellular matrix of soft connective results in a burst of collagen breakdown following its activation. *J Periodontol Res*, v.31, p.483-488, 1996.
- WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. *New Engl J Med*, v.320, n.6, p.365-375, 1989.
- WESTERLUND, U. et al. Human neutrophil gelatinase and associated lipocalin in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res*, v.75, n.8, p.1553-1563, 1996.
- ZUCKER, S. et al. Comparison of techniques for measurement of gelatinases/type IV collagenases: enzyme-linked immunoassays versus substrate degradation assays. *Clin Exp Metastasis*, v.12, n.1, p.13-23, 1994.