

Marcelo Rocha Marques

**Avaliação do efeito do PTH nas citocinas
IL-1beta, IL-6, TNF-alfa, nas metaloproteinases
da matriz 2 e 9, e na atividade osteoclástica em
ratos com periodontite induzida**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Doutor em
Biologia Buco-Dental - Área de
concentração Histologia e Embriologia.

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Pereira Barros
Co-orientador: Sérgio Roberto Peres Line

Piracicaba
2007

M348a	<p>Marques, Marcelo Rocha. Avaliação do efeito do PTH nas citocinas IL-1beta, IL-6, TNF-alfa, nas metaloproteinases da matriz 2 e 9, e na atividade osteoclástica em ratos com periodontite induzida. / Marcelo Rocha Marques. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.</p> <p>Orientadores: Silvana Pereira Barros, Sérgio Roberto Peres Line.</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Periodontite. 2. Hormônio paratireóideo. 3. Citocinas. 4. Mealoproetinas. 5. Osteoclastos. 6. Interleucinas. I. Barros, Silvana Pereira. II. Line, Sérgio Roberto Peres. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.</p> <p>(mg/fop)</p>
-------	--

Título em Inglês: Effect of PTH administration on the IL-1beta, IL-6, TNF-alfa, MMP-2, MMP-9 and TRAP expression in the periodontal tissues of rats with experimental periodontitis

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Periodontitis. 2. Parathyroid hormone. 3. Cytokines. 4. Metalloproteins. 5. Osteoclasts. 6. Interleukins

Área de Concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Pedro Duarte Novaes, Francisco Humberto Nociti Júnior, Rui Barbosa Brito Júnior, Antônio Wilson de Almeida, Sérgio Roberto Peres Line

Data da Defesa: 05-10-2007

Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 05 de Outubro de 2007, considerou o candidato MARCELO ROCHA MARQUES aprovado.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Sergio Line".

PROF. DR. SERGIO ROBERTO PERES LINE

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Rui Barbosa de Brito Junior".

PROF. DR. RUI BARBOSA DE BRITO JÚNIOR

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Antonio Wilson de Almeida".

PROF. DR. ANTONIO WILSON DE ALMEIDA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Francisco Humberto Nociti Junior".

PROF. DR. FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JÚNIOR

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Pedro Duarte Novaes".

PROF. DR. PEDRO DUARTE NOVAES

Dedicatória

À minha família, minha mãe Maria Geralda Rocha Marques (em memória), ao meu pai, Márcio Gabriel Marques, e aos meus irmãos Roseli, Mauro, Mari e Júnior que foram e sempre serão as minhas referências de valores humanos e de amor ao próximo

Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida, por ter me dado a família que tenho, por todas as oportunidades e conquistas, e pelos bons amigos sempre presentes;

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa de seu diretor Prof. Dr. FRANCISCO HAITER NETO, por propiciar minha formação acadêmica;

Ao coordenador geral dos cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba Prof. Dr. MÁRIO ALEXANDRE COELHO SINHORETI;

À Profa. Dra. SILVANA PEREIRA BARROS, pela oportunidade a mim dada, pela orientação, confiança e liberdade na condução deste trabalho;

Ao Prof. Dr. SÉRGIO ROBERTO PERES LINE, por estar a todo tempo disposto a ajudar com muita boa vontade, e sempre despertando o interesse pela busca de novos desafios e conhecimentos;

Ao Prof. Dr. ANTÔNIO WILSON DE ALMEIDA, pela amizade e por ter me iniciado no caminho acadêmico, tendo sempre como alicerce a busca pelo conhecimento e respeito pela Biologia;

Ao Prof. Dr. PEDRO DUARTE NOVAES, ao Prof. Doutor JOSÉ MERZEL, e à Profa. Dra. DARCY DE OLIVEIRA TOSELLO, do departamento de morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelos exemplos de dedicação ao ensino e à pesquisa, e que muito me ajudaram durante toda a minha pós-graduação;

Ao Prof. Dr. FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JR, exemplo de dedicação e compromisso com o trabalho, por aceitar participar da banca de defesa de tese, pela amizade, pela constante disponibilidade para discussões, e pelo auxílio neste trabalho;

Ao Prof. Dr. RUI BARBOSA BRITO JUNIOR, por aceitar participar como membro da banca da minha defesa de tese, e pela amizade desde quando eu iniciei a minha pós-graduação;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão de bolsa de estudo e auxílio para a realização deste trabalho;

Às secretárias da pós-graduação ÉRICA ALESSANDRA PINHO, TATIANE CRISTINA GAVA e RAQUEL Q. MARCONDES CESAR SACCHI, muito competentes, e sempre prontas a ajudar com boa vontade;

Ao amigo Prof. Dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PERES, pelo incentivo, pelo exemplo de seriedade e humildade tanto profissional como pessoalmente;

Às funcionárias do departamento de Morfologia: ELIENE, CIDINHA, JOELMA, IVANI e SUZETE, pelo apoio, pela atenção e por estarem sempre dispostos a ajudar;

Aos amigos, Prof. Dr. JOÃO BATISTA CÉSAR NETO, Profa. Dra. POLIANA MENDES DUARTE e Profa. Dra. KARINA GOTTARDELLO ZECCHIN, pela colaboração, sugestões de grande utilidade;

Ao amigo GILSON CÉSAR KUNTZ MARTINI, pela amizade, e por ser um amigo que sempre pude contar desde quando mudei para Piracicaba;

Aos amigos do programa de pós-graduação em Biologia Buco-dental: DANIEL, EDUARDO, MARCO, ALEXANDRE, ADRIANA, LIZA, NÁDIA, JOSÉ, JULIANA, ANA PAULA, NAILA, GILCY, CAROL, DENISE, MARISI, CRIS BORGES, CRIS SALMON, MARCOS pelo prazeroso convívio diário durante todo esse tempo nas aulas, no laboratório e momentos de lazer;

Aos amigos de outros depts da FOP: FLÁVIA, FABÍOLA, LUCIANO e RODRIGO, que em muito me ajudaram por todo o tempo que passei em Piracicaba;

Aos eternos amigos companheiros: GLAUCE (MALA-ALMA-LAMA), MARIA CRISTINA (CRICA), GU (BALUBA), HUGO, RAFAEL (BARMAN) e MARCELIM, por serem pessoas que me fazem ver e sentir que ter bons amigos, mais do que necessário, é essencial para entender um pouco o sentido do que realmente importa na vida.

*“... a ciência não avança,
a ciência alcança a ciência em si.”*

*“Qualquer curva de qualquer destino
que desfaça o curso de qualquer certeza.”*

(Arnaldo Antunes)

RESUMO

O hormônio paratireóideo (PTH), um mediador da remodelação óssea, é o principal regulador da homeostasia do cálcio, sendo capaz de promover reabsorção e aposição ósseas. Em trabalhos realizados recentemente, foi verificado que o tratamento com PTH, administrado de maneira intermitente, diminuiu a perda óssea e também células inflamatórias no tecido gengival, em ratos com periodontite induzida. No intuito de melhor explicar os resultados obtidos nesses trabalhos, doença periodontal foi induzida em primeiros molares de ratos e após 15 e 30 dias de tratamento com PTH os animais foram sacrificados com o objetivo investigar o periodonto para: 1) avaliar a expressão gênica, por meio de RT-PCR, e localizar, por meio de reação imunohistoquímica, algumas citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF-alfa) e certas metaloproteinases da matriz (MMP-2 e MMP-9), 2) verificar, por meio de histoquímica, a atividade de fosfatase ácida tatarato resistente (TRAP) na superfície óssea alveolar, e 4) medir a atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9. Como resultados, observou-se que o PTH diminuiu a expressão de mRNA para MMP-2 (15 e 30 dias experimentais) e IL-6 (30 dias experimentais) nas gengivas dos animais estudados; que a localização de IL-1beta, MMP-2 e MMP-9 se deu basicamente no tecido conjuntivo da gengiva, e que a IL-6 foi detectada principalmente na superfície do osso alveolar. O número de células TRAP-positivas foi diminuído nos animais tratados 30 dias com PTH, e atividade gelatinolítica de MMP-9 foi diminuída após 15 dias de tratamento com o hormônio. Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que a administração intermitente de PTH pôde modular moléculas (MMP-2, MMP-9, IL-6 e número de células TRAP-positivas) que têm relação com degradação tecidual na doença periodontal em ratos.

Palavras-chave: Hormônio Paratireóideo, Doença Periodontal, Citocinas Inflamatórias, Metaloproteinases de Matriz, Interleucinas.

ABSTRACT

Intermittent Parathyroid hormone (PTH) administration has been used as an anabolic agent, and when it is administered in rats with induced periodontitis, it is able to decrease alveolar bone loss, and reduce the inflammatory cells on the marginal gingival tissue. A possible action of the PTH in cytokines and metalloproteinase (MMPs), related with breakdown tissue in periodontitis, was hypothesized. After inducing periodontitis with cotton ligature in rats and PTH intermittent treatment during 15 and 30 days, inflamed gingival tissue was removed, and a decrease of IL-6 and MMP-2 mRNA expression was observed by semi-quantitative RT-PCR analysis. Zymography assay demonstrated that PTH treatment decreased MMP-9 activity after 15 experimental days. After jaw decalcification, TRAP positive cells were found in higher number on the alveolar bone surface in the group without PTH treatment, after 30 experimental days. Using immunohistochemistry, MMP-2, MMP-9, IL-beta and TNF-alpha were identified in all groups and they were found on the gingival tissue and IL-6 on alveolar bone surface. Within the limits of this study, it can be concluded that intermittent PTH administration may modulate IL-6, MMP-2, MMP-9 and TRAP-positive cells in experimental periodontitis.

Key words: Periodontitis, Parathyroid hormone, Cytokines, Metalloproteins, Osteoclasts, Interleukins

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	01
2.	JUSTIFICATIVA E PROPOSIÇÃO	07
3.	MATERIAL E MÉTODOS	08
4.	RESULTADOS	15
5.	DISCUSSÃO	34
6.	CONCLUSÃO	38
7.	REFERÊNCIAS	38
8.	ANEXOS	48

1.0 Introdução

1.1 Hormônio paratireóideo (PTH)

O PTH, organiza, por meio da remodelação óssea, o fluxo de íons minerais (cálcio e fosfato) dos ossos e rins (Habener *et al.*, 1984; Swarthout *et al.*, 2001). Nestes tecidos o PTH interage com um receptor de superfície celular específico, o PTH/PTHrP receptor (ou PTHR1) (Calvi *et al.*, 2001; Whitfield *et al.*, 2002), que pertence à família dos receptores de superfície associados à membrana. O PTH é um polipeptídeo sintetizado pelas quatro glândulas paratireóides (Brown, e Loe 1993) é originado de um pré-hormônio (prepro-PTH), constituído de 115 aminoácidos (aa) com peso molecular de ~9.5 kDa. Após duas clivagens, encontra-se com 90 aa, e é transportado para o complexo de Golgi, onde é mais uma vez clivado, adquirindo sua forma final (84 aa) (Strewler *et al.*, 1987; Spiegel & Marx 1983; Genuth, 1998; Martin & Gonzalez, 2001; Swarthout *et al.*, 2002).

O PTH é um mediador da remodelação óssea, sendo o principal regulador da homeostasia do cálcio. A sua capacidade de regular a remodelação óssea é observada em diferentes e distintos caminhos, podendo ora promover reabsorção óssea, ora aposição. Por exemplo: contínua infusão de PTH provoca um decréscimo na massa óssea, pelo aumento da atividade osteoclástica; já uma administração intermitente promove um aumento da massa óssea, por estimular diferenciação de osteoblastos (Neer *et al.*, 2001; Horwitz *et al.*, 2003).

O fragmento PTH (1-34) compreende os primeiros 34 aminoácidos do hormônio que produzem seus principais efeitos biológicos (Neer *et al.*, 2001). Dos diversos análogos do PTH, o fragmento hPTH (1-34) se apresenta como o mais efetivo no aumento da densidade óssea, da força mecânica e diminuição da circunferência endosteal (Morley *et al.*, 1997, Mohan *et al.*, 2000). Foi relatado, ainda, que o PTH (1-34) quando administrado em humanos, não aumenta a incidência de tumores e não apresenta efeitos mutagênicos ou tóxicos (Morley *et al.*, 1997; Mohan *et al.*, 2000; Neer *et al.*, 2001) ou qualquer outro efeito colateral, dados estes confirmados por estudos envolvendo aproximadamente 1000 pacientes, tratados com PTH (1-34) por 3 anos (Horwitz *et al.*, 2000).

Várias ações do PTH nas células da linhagem osteoblástica afetam o processo de remodelação. O PTH modula a morfologia, proliferação, expressão protéica e gênica destas células (Canalis *et al.*, 1989). Esses efeitos do PTH no metabolismo, acontecem por ele se ligar a um receptor (GPCR), que está presente nas células osteoblásticas (Swarthout *et al.*, 2001), tendo controle direto na estimulação da atividade osteoblástica, e indireto, via osteoblasto, na atividade osteoclástica. Além disso, fatores como o OPG (osteoprotegerin) e RANKL (receptor activator of NK-KappaB ligand) secretados pelos osteoblastos e linfócitos T, e ligados à aposição e reabsorção óssea respectivamente, sofrem uma regulação direta do PTH (Simonet *et al.*, 1997; Swarthout *et al.*, 2001).

1.2 Citocinas inflamatórias e reabsorção óssea

Além da regulação hormonal, a remodelação óssea sofre influência do sistema imune. Citocinas inflamatórias produzidas por células do sistema imune podem promover um importante papel na regulação da reabsorção óssea.

A interleucina-1 β (IL-1 β), o fator de necrose tumoral- α e - β (TNF- α , - β) e a interleucina-6 (IL-6), são consideradas citocinas capazes de promover reabsorção óssea (Lorenzo, 1991; Puzas *et al.*, 1994). Outra citocina, a interleucina-8 (IL-8), secretada por macrófagos, não promove reabsorção diretamente, mas é quimiotática para neutrófilos e induz a secreção de citocinas como IL-1 β e TNF- α (Lorenzo, 1991). A interleucina-3 (IL-3), RANK-ligand e interferon gama, quando secretados pelos linfócitos T, também podem trabalhar como indutores de reabsorção (Baker, 2000). Outros fatores ligados à reabsorção óssea, que podem ser observados após o estímulo de macrófagos por exemplo, incluem a prostaglandina E₂ (PGE₂) e o óxido nítrico (NO) (Zubery *et al.*, 1998). Os efeitos destas citocinas inflamatórias dependem diretamente da sua concentração, sendo que a concentração destas no tecido afeta diretamente sua função. Como exemplo pode-se citar o papel da IL-1 em induzir reabsorção óssea quando em altas concentrações, enquanto que em baixas concentrações, IL-1 induz a formação óssea (Lorenzo, 1991).

A regulação da osteoclastogênese e conseqüente reabsorção óssea são determinadas principalmente pelos seguintes fatores: RANK-ligand, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-11, M-CSF, e prostaglandina E (Rodan e Martin, 2000). Algumas interleucinas como a interleucina 1 (IL-1), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e outras citocinas

induzem formação de osteoclastos via osteoblasto (Bertolini *et al.*, 1986; Thomson *et al.*, 1986; Thomson *et al.*, 1987), já que quando estimulados por estas citocinas, os osteoblastos ativam sua produção de IL-6, que promove diferenciação osteoclástica culminando com reabsorção óssea (Gowen *et al.*, 1983). A IL-6 pode ser expressa por várias células como linfócitos, osteoblastos, monócitos, macrófagos, queratinócitos, células endoteliais e fibroblastos (van Snik, 1990) e em geral, sua secreção é realizada por intermédio de algum estímulo como exemplo após a ativação celular por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ou citocinas (Kishimoto, 1989).

Bactérias e seus produtos podem causar perda óssea inflamatória em diferentes infecções como: periodontite, otite média crônica e perda de implantes ortopédicos (Moriyama *et al.*, 1984; Sokransky e Haffajee, 1992; Harris, 1995). Na maioria dos casos de inflamação crônica associada com infecção, um infiltrado de células mononucleares está tipicamente presente. Um tipo celular encontrado no infiltrado mononuclear é o monócito. Esta célula tem um papel central no mecanismo de resposta para o lipopolissacarídeo bacteriano e bactérias gram-negativas. Embora os monócitos tenham sido relacionados com osteólise, o mecanismo específico pelo qual eles promovem reabsorção óssea ainda não é conclusivo (Athanasou e Sabokar, 1999; Burger, 1984). A expressão de OPGL por linfócitos T aumenta a possibilidade de que os leucócitos tenham um papel proeminente na geração de sinais primários que induzem osteoclastogênese (Kong *et al.*, 1999).

Bactérias e seus produtos como o LPS, ao entrarem em contato com receptores de monócitos ou de linfócitos B, estimulam a produção de mediadores inflamatórios (Raiz *et al.*, 1981). A produção destes mediadores aumenta a capacidade da produção de OPGL pelos leucócitos que induzem osteólise, o que demonstra uma outra via de ativação de reabsorção óssea que não seja por meio de osteoblastos (Jiang *et al.*, 2002).

1.3 Doença periodontal

A periodontite representa uma doença inflamatória crônica. É um processo complexo, multifatorial no qual as interações entre os componentes da placa bacteriana subgingival e os mecanismos de defesa do hospedeiro determinam o início e a progressão da doença. Clinicamente, a periodontite se caracteriza por inflamação dos

tecidos de proteção e suporte dos dentes, ocasionando perda de inserção dentária e perda óssea alveolar.

Na placa bacteriana periodontopatogênica são encontradas bactérias gram-negativas como *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (CRPD, 1996). A presença de bactérias e a liberação de seus produtos desencadeiam uma reação inflamatória no tecido gengival que, dependendo da expressão dos componentes inflamatórios do hospedeiro, pode culminar com a degradação de componentes periodontais como o cemento, o ligamento periodontal e o osso alveolar.

Endotoxina ou lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) foi a primeira substância bacteriana capaz de induzir reabsorção óssea *in vitro* (Hausmann et al., 1970). A cápsula da bactéria *A. actinomycetemcomitans* formada por polissacarídeo é capaz de induzir apoptose em osteoblastos (Yamamoto et al., 1999), e extratos desta mesma bactéria inibem osteoblastos *in vitro* (Murata et al., 1997). LPS purificado de *P. Gingivalis* inibe a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos (Kodono et al., 1999), além de estimular osteoblastos maduros a secretarem colagenase (Sismey-Durrant e Hopps, 1989), que é o primeiro passo para reabsorção óssea.

Células inflamatórias, incluindo neutrófilos, linfócitos e monócitos, são encontradas na gengiva de pacientes com doença periodontal (Fujihashi et al., 1993; Baker, 2000). Vários fatores de reabsorção ,como IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 e IGF, estão presentes na gengiva inflamada durante a doença periodontal em concentrações capazes de induzir reabsorção óssea (Fujihashi et al., 1993; Wiebe et al., 1996; Fujihashi et al., 1996; Gemmell et al., 1997; Baker, 2000). Dentre estas citocinas a IL-1 β provavelmente apresenta o papel mais importante na patogênese da doença periodontal (Howells, 1995), uma vez que os níveis de mRNA desta citocina estão aumentados em gengivas inflamadas (Tokoro et al., 1996) e no fluido gengival crevicular de sítios periodontalmente doentes (Honig et al., 1989; Masada et al., 1990), além de estar dentre os indutores de reabsorção óssea (Heath et al., 1985; Gowen e Mundy, 1986) e também promover degradação de tecido conjuntivo por meio de indução de metaloproteinases da matriz (MMP) (Meikle et al., 1989).

Análises imunohistoquímicas de tecidos gengivais demonstraram um aumento na concentração de IL-6 em gengiva inflamada (Takahashi et al., 1994). Altos níveis de

IL-6 e do seu mRNA são encontrados em gengiva inflamada de regiões com periodontite (Matsuki *et al.*, 1992; Takahashi *et al.*, 1994), em contraste com baixos níveis encontrados em tecido gengival sadio. A IL-6 pode ser produzida por osteoblastos em resposta a agentes de reabsorção óssea presente em tecido gengival inflamado como IL-1, TNF- α e LPS (Littlewood *et al.*, 1991) e age como um potente indutor de osteoclastogênese *in vitro* (Kurihara *et al.*, 1990).

1.4 Metaloproteinases da matriz (MMPs) e doença periodontal

Metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) representam uma importante família de endopeptidases zinco-dependentes, que coletivamente são capazes de degradar todas as proteínas da matriz extracelular (ME). São classificadas em subgrupos de acordo com a capacidade de degradar substratos específicos pelos quais têm afinidade. Os subgrupos são: collagenases intersticiais (MMP-1 e MMP-8), estromelisinases (MMP-3 e MMP-10), gelatinases (MMP-2 e MMP-9) e MMPs de membrana (MT-MMPs) (Woessner, 1998). As MMPs são expressas pelas células do tecido conjuntivo em respostas a estímulos específicos, assim mantêm a homeostasia tecidual. São também produzidas por células polimorfonucleadas que eventualmente possam estar presentes no tecido conjuntivo (Woessner, 1998). Sua atividade no tecido é regulada por inibidores específicos, denominados inibidores teciduais de metaloproteinases da matriz (TIMPs) (Rifas *et al.*, 1989). Atividade excessiva de MMPs, em particular as pertencentes ao grupo das collagenases e das gelatinases, é observada em processos patológicos como: a periodontite, osteoartrite, cânceres metastáticos e aneurismas (Birkedal-Hansen, 1993).

As collagenases representam as únicas enzimas do organismo humano capazes de quebrar a tríplice hélice do colágeno tipo I devido à ação de sua atividade helicase. Recentemente esta atividade tem sido alvo de estudo na enzima MMP-2 (ou gelatinase A - 72 kDa) que é secretada por fibroblastos (Salo *et al.*, 1985), células endoteliais (Kalebic *et al.*, 1983), monócitos e osteoblastos (Birkedal-Hansen, 1993; Rifas *et al.*, 1989). Diferente das outras MMPs que são sintetizadas após estímulo, a MMP-2 representa uma enzima constitutiva, ou seja, de expressão contínua. Já a MMP-9 (ou gelatinase B - 92 kDa) é expressa por leucócitos polimorfonucleares (Hibbs *et al.*, 1984), macrófagos (Mainardi *et al.*, 1984) e células epiteliais (Woodley *et al.*, 1987).

Pacientes com periodontite apresentam aumento significativo na expressão e na atividade de MMP-2 e MMP-9 no tecido gengival e no fluido crevicular, o que sugere a participação destas enzimas na destruição tecidual durante a periodontite (Gangbar *et al.*, 1990; Mäkelä *et al.*, 1994). O LPS é capaz de aumentar a secreção de MMPs por macrófagos *in vitro* (Wahl *et al.*, 1974), e injeções gengivais de LPS geram um infiltrado de leucócitos polimorfonucleares, os quais também secretam MMPs (Llavaneras *et al.*, 1999). Foi demonstrado que *P. gingivalis* e IL-1 foram capazes de induzir fibroblastos do ligamento periodontal humanos a produzir MMP-2 *in vitro* (Pattamapun *et al.*, 2003).

Citocinas como IL-1 β e TNF- α possuem efeito indutivo na expressão gênica das MMPs (McGeehan *et al.*, 1994; Irwin e Myrillas, 1998). Estas citocinas, e também a IL-6, influenciam a expressão dos TIMPs, podendo ter um papel importante na degradação tecidual em doenças inflamatórias ((McGeehan *et al.*, 1994, Sato *et al.*, 1990).

Pela importante relação entre atividade das MMPs e a sua capacidade de destruição tecidual, têm sido investigado *in vivo* a regulação destas enzimas, por inibição da produção das mesmas ou inibição da atividade na matriz extracelular, servindo como um suporte terapêutico que visa inibir a perda óssea alveolar ocasionada por processos inflamatórios como a periodontite (Golub *et al.*, 1994 ; Karatzas *et al.*, 2000; Ramamurthy *et al.*, 2002).

2.0 Justificativa e Proposição

O PTH quando administrado intermitentemente possui a capacidade de promover anabolismo ósseo, por estimular a diferenciação e atividade osteoblástica (Neer *et al.*, 2001; Horwitz *et al.*, 2003). Trabalhos realizados no nosso laboratório (Barros *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2005), demonstraram que o PTH administrado de maneira intermitente, frente a estímulos inflamatórios ocasionados por uma periodontite induzida, foi capaz de diminuir a reabsorção óssea alveolar que é comumente observada neste tipo de experimento. Outro achado importante em um destes trabalhos, foi a verificação de um menor número de células inflamatórias nas gengivas inflamadas dos animais que receberam PTH.

Partindo de um embasamento na literatura sobre a atividade inflamatória observada na doença periodontal, com a presença de citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF-alfa), e ainda mesmo com as limitações do modelo em animais para indução de perda óssea por periodontite, no qual também é relatada a participação de citocinas inflamatórias como indutoras de perda óssea (Assuma *et al.*, 1998; Gaspersic *et al.*, 2003; Koide *et al.*, 1995, de Lima *et al.*, 2000), foi possível traçar um raciocínio investigativo para buscar um entendimento de como o PTH (1-34) foi capaz de inibir perda óssea inflamatória, especulando e pesquisando possíveis ações na expressão destas citocinas.

Com o intuito de investigar melhor a ação do PTH nos mecanismos de degradação tecidual ocorrida na periodontite, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do hormônio PTH (1-34), utilizado de maneira intermitente, sobre a expressão de algumas citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6) e sobre a expressão e atividade de certas metaloproteinases da matriz (MMP-2 e MMP-9), no tecido gengival de ratos que receberão indução de periodontite. Além disso, foi feita a localização no tecido dessas moléculas estudadas, além de identificar uma possível relação das mesmas com a atividade osteoclástica no periodonto.

3.0 Material e Métodos

3.1 Indução de periodontite e tratamento com PTH

Periodontite foi induzida colocando-se um fio de algodão ao redor dos primeiros molares inferiores de 80 ratos Wistar machos com 4 semanas de idade . No mesmo dia da colocação das ligaduras, 40 animais (grupo **T**) começaram a receber injeções subcutâneas de hPTH (1-34) (Sigma) na dose de 40 µg/Kg na frequência 3 vezes por semana, e 40 animais controles (grupo **C**) receberam ácido acético a 0,1%, veículo do PTH, como placebo na mesma frequência dos animais tratados. Após 15 dias de tratamento, 10 ratos de cada grupo foram sacrificados por meio de deslocamento cervical, e ao término de 30 dias os animais restantes dos dois grupos foram sacrificados, e os grupos foram denominados como:

Grupo **C15**: 15 dias de doença + injeções de placebo

Grupo **T15**: 15 dias de doença + injeções de PTH

Grupo **C30**: 30 dias de doença + injeções de placebo

Grupo **T30**: 30 dias de doença + injeções de PTH

3.2 RT-PCR Semi-quantitativo

3.2.1 Extração de RNA total

Após o sacrifício as gengivas ao redor dos primeiros molares inferiores direitos de 5 ratos de cada grupo foram removidas, agrupadas e congeladas em freezer – 80⁰C. As gengivas foram então transferidas para um gral de vidro estéril e foram maceradas com 0,3 ml de Trizol (4°C) seguida por homogeneização por 5 minutos com mais 0,3 ml de Trizol a 24°C. O material foi transferido para outro tubo de polipropileno e incubado com 1ml de clorofórmio (Merck) por 3 minutos a 24°C, seguida por centrifugação a 9000 rpm a 4°C por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para outro tubo de polipropileno e incubada por 10 minutos a 24°C, após adição de 0,8 ml de isopropanol (Merck). Novamente o material foi centrifugado a 9000 rpm a 4°C por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. O precipitado de RNA foi lavado com etanol gelado a 75% (Merck) e centrifugado a 6000 rpm a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado desidratado por cerca de 40 minutos a 24°C. Em seguida o

material foi resuspenso por, em média, 30µl de água livre de nucleases, e incubado a 56°C por 10 minutos e guardado em freezer -70°C.

3.2.2 Determinação da concentração, pureza e qualidade do material

Para determinação da concentração e pureza do material, foi realizada a leitura da densidade óptica das soluções de RNA total em um espectrofotômetro (Eppendorf) para comprimentos de onda de 260 e de 280nm. O RNA foi considerado puro quando a razão entre as duas leituras ficou acima de 1.8.

Para a verificação da qualidade dos RNAs obtidos, aproximadamente 1µg de cada amostra foi separado em um gel de agarose a 1,2%, por meio de eletroforese a 100V constante, em tampão contendo 20mM de MOPS, 5mM de acetato de sódio e 1mM de EDTA. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado por meio do programa Image Master VDS (Pharmacia Biotech, Israel). A qualidade do material foi determinada pela presença das bandas do RNA ribossômico (28S e 18S), assim como pela presença da banda correspondente ao RNA transportador (Figura 1A).

3.2.3 Transcrição reversa

As amostras de RNA extraídas, com comprovada boa qualidade e pureza, foram tratadas com Dnase (Amp. Grade/Invitrogen) IU/ug de RNA por 10 minutos a 24°C, para eliminar possíveis traços de DNA genômico contaminante. Para a síntese de cDNA, cerca de 1µg de RNA total de cada grupo foi reversamente transcrito em uma reação com volume final de 21µl contendo 0,5 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 40 U de inibidor de RNAase, 50 U de enzima Superscript III RT (Invitrogen), 0,5 µg de *primers* oligo-dT e tampão de reação 1X, contendo 1,5 mM MgCl₂. Esta solução foi incubada por 50 minutos a 50°C e 5 minutos a 85°C, finalizando a 4°C por 1 minuto. Em seguida, a solução foi incubada por 20 minutos a 37°C com 2U da enzima Rnase H (*E.coli*). Reações sem a presença da enzima RT foram usadas como controles negativos.

3.2.4 PCR

Para a amplificação específica dos cDNAs através de PCR, 0,2 mM de cada par de *primers* gene-específico foram adicionados a 50µl de solução contendo 2µl de cDNA, 2U da enzima Taq DNA polimerase, 0,05 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂ e

tampão da reação 1x. Os tubos foram levados ao termociclador Robocycler, seguindo-se reações cíclicas de 1'25'' a 95°C, 1'25'' a X°C e 1'25'' a 72°C, onde X é a temperatura de anelamento específica para cada par de primers.

Para assegurar que quantidade de ciclos escolhidos para a amplificação por PCR correspondesse à fase exponencial (i.e., para que mudanças nos níveis originais de transcrição resultassem em mudanças relativamente similares na densidade do produto em eletroforese), cada par de *primers*, para beta-actina, MMP-2, IL-6 e IL-1beta foram amplificados em números de ciclos individualizados (Palmon *et al.*, 2001), caracterizando a RT-PCR semi-quantitativa. Inicialmente cada par de *primers* foi amplificado em números diferentes de ciclos, as amostras foram separadas em géis de agarose 1.2% e as bandas foram submetidas à densitometria óptica (D.O.). O número de ciclos para cada par de *primers* foi estabelecido de acordo com o aumento da D.O. das bandas. Para cada gene estudado, foram feitas 3 reações de PCR, sendo que cada uma dessas reações, foi feita a partir de soluções cDNAs obtidas separadamente. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo ANOVA e Teste Tukey.

3.2.5 Desenhos dos primers e temperatura de anelamento T.A.:

Beta-actina: forward: 5' -TGACATCCGTAAAGACCTCT-3',
reverse: 5'-AGATGTGATCAGCAAGCAG-3; T.A.: 48°C.

MMP-2: forward: 5'-GAGTTGGCAGTGCAATACCT-3',
reverse: 5'-GCCGTCCTT CTCAAAGTTGT-3'; T.A.: 54°C

IL-6: forward: 5'-TAGAGTCACAGAAGGAGTGG-3',
reverse: 5'-GCCAGTTCTTCGTAGAGAAC-3'; T.A.: 48°C

L-1beta: forward: 5'-TCCATGAGCTTTGTACAAGG-3',
reverse: 5'-GGTGCTGATGTACCAGTTGG-3'; T.A.: 60°C

TNF- α : forward: 5'-AAATGGGCTCCCTCTCATCA-3',
reverse: 5'- AGCCTTGTCCCTTGAAGAGA-3'; T.A.: 56°C

MMP-9: forward: 5'-CATGGCCTATCCCACA-3',

reverse: 5'-TCCTCC GTGATTCGAGAAC-3'; T.A.: 52°C

3.3 Atividade gelatinolítica por meio de Zimografia

Após o sacrifício dos animais em cada tempo experimental, a gengiva ao redor do primeiro molar com periodontite induzida de 4 animais por grupo, foi removida, cortada em fragmentos menores e colocada em um tubo de eppendorf estéril contendo 1,2 mL de meio de cultura (DMEM-Gibco, New York, USA), suplementado com 40ug/mL de gamicina, e foi mantida em uma estufa 37 °C por 24h. Após esse período, o sobrenadante, foi coletado e guardado em nitrogênio líquido. A quantificação de proteínas totais de cada amostra foi realizada em triplicata pelo método de Bradford. Foram aplicados 3 ug de proteína total, homogeneizadas em um tampão de amostra não-redutor (2% de SDS, 125 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10% de glicerol e 0,001% de azul de bromofenol), em um gel de poliacrilamida a 10%, copolimerizados com 1,6 mg/mL de gelatina (Sigma) como substrato. A eletroforese de todas as amostras juntos foi realizada com o uso de um tampão contendo 2,5 mM de Tris, 19 mM de glicina e 0,3 mM de SDS. Após eletroforese, o gel foi lavado, sob agitação suave a 24°C, em 2 banhos de 20 minutos cada em solução aquosa de Triton-X100 a 2% (Gibco) para a remoção do SDS e retorno da conformação natural das MMPs. Em seguida, o gel foi incubado em tampão de ativação contendo 50mM de Tris-HCl pH 7,4 e 5mM de CaCl₂ a 37°C por 16 horas. A atividade gelatinolítica foi detectada após coloração com Coomassie blue R-250 0,05% (BioRad), após remoção do excesso de corante com solução aquosa de metanol 50%. O gel foi digitalizado pelo aparelho Image Máster VDS (Pharmacia Biotech), a densitometria óptica das bandas foi analisada e os resultados foram submetidos à análise estatística pelo ANOVA e Teste Tukey.

3.4 Caracterização da MMP-2 e MMP-9 por meio de imunoprecipitação

A partir do sobrenadante (que contém MMPs) coletado para a análise de zimografia, foram separadas alíquotas, 50µg de proteínas totais (determinada por Bradford), que foram então incubada com 5µg de anticorpo anti-rato MMP-2 ou MMP-9 (Labvision -USA) por 4h à temperatura ambiente. O imuno-complexo (anticorpo MMP-2 + proteinase MMP-2, ou anticorpo MMP-9 + proteinase MMP-9) foi precipitado com A-Sepharose Beads (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) por 14h à temperatura ambiente. Após a lavagem do material não adsorvido à sefarose com 50

mM Tris pH 7.4, 200mM NaCl, o material imunoprecipitado foi homogeneizado em um tampão não redutor para zimografia por 10 minutos 70°C. O material foi então levado a um ensaio gelatinolítico, como o descrito no item 2.6. Após o término da zimografia, o gel foi visualizado por meio do programa Image Master VDS, e as bandas obtidas foram analisadas, e confrontadas com as bandas obtidas no ensaio de zimografia (sem imunoprecipitação), para confirmar que se tratam realmente das metaloproteinase 2 e 9, e não outra metaloproteinase com peso molecular semelhante ao das estudadas.

3.5 Reação Imunohistoquímica

Após o sacrifício, 5 animais de cada um dos grupos (C15, T15, C30 e T30), tiveram suas mandíbulas removidas, fixadas em Karnovsky modificado (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 0,5% e ácido pícrico 0,2%). Após 12 horas de fixação, as peças foram lavadas em tampão Tris-HCl e descalcificadas em Edta (Merck) 4,13% tamponado com Tris-HCl por aproximadamente 80 dias. Após a descalcificação, as peças foram novamente lavadas em tampão, e em seguida sofreram desidratação em concentrações crescentes de etanol, até 100%. A diafanização foi realizada em banhos de xilol e após a infiltração em paraplast as peças foram emblocadas.

Cortes histológicos de 3µm de espessura, feitos no sentido méso-vestibular da região de primeiro molar inferior, dos blocos de cada animal foram coletados em lâminas de vidro previamente banhadas por Organosilano (Sigma).

Para reação imunohistoquímica, foi seguido o seguinte protocolo:

- A. Os cortes foram desparafinados em 2 banhos de xilol de 10 minutos cada.
- B. Hidratação: etanol 100%, 80%, 50% e água MiliQ, dois banhos de 2 minutos em cada.
- C. Inativação da peroxidase endógena com H₂O₂ 10vol (Dinâmica), 3 banhos de 5 minutos.
- D. Digestão enzimática com tripsina (Sigma), necessária para MMP-9 (30 min.), MMP-2 (30 min) e IL-6 (60 min.) à 37°C.
- E. Bloqueio das proteínas inócuas do tecido por meio de BSA (Sigma) 3% durante 30 minutos em câmara úmida em temperatura ambiente.
- F. Incubação com anticorpo primário em câmara úmida:

MMP-2 (Labvision -USA), concentração 1: 100, durante 20 horas a 4°C.

IL-1beta (Serotec-UK), concentração 1: 80, durante 20 horas a 4°C.

IL-6 (Serotec-UK), concentração 1: 20, durante 40 horas, a 4°C.

MMP-9 (Labvision -UK), concentração 1: 50, durante 20 horas a 4°C.

TNF-alfa (Serotec-UK), concentração 1: 900, durante 20 horas a 4°C.

Controle Negativo: como controle negativo da reação, cortes foram incubados com soro da espécie do animal em que foi produzido o anticorpo primário, omitindo-se o anticorpo primário.

G. Incubação com anticorpo secundário kit LSAB-2 (Dako), por 30 minutos para cada um dos dois componentes do kit.

H. Revelação com Diaminobenzidina (Sigma) em solução PBS contendo também H₂O₂ (Dinâmica) e DMSO por 5 minutos.

I. Contra-coloração com Hematoxilina.

J. Desidratação dos cortes e montagem lâmina com permount.

Após a montagem das lâminas, os cortes foram observados em microscópio óptico para determinar a localização e o padrão de marcação das citocinas e das de MMPs estudadas. Para isso, utilizamos de cada animal, 4 lâminas com 2 cortes em cada uma das lâminas.

A região analisada por meio de imunomarcação, foi a correspondente à estudada em outros animais em que avaliamos a expressão de mRNA, que envolve o tecido periodontal adjacentes à ligadura de algodão, e também de parte periodonto de inserção dessa região, inclusive superfície óssea alveolar.

3.6 Histoquímica para Fosfatase Ácida Tartarato Resistente (TRAP)

Após o sacrifício dos animais destinados à análise do TRAP, as mandíbulas foram fixadas em solução contendo glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato com 7% de sacarose (pH 7.4) por 4 horas a 4°C. Após a fixação, as peças foram lavadas 24h a 4°C e em seguidas descalcificadas com EDTA a 4,13% em tampão Tris-HCl pH 7,4 na geladeira (4°C) por aproximadamente 70 dias. As peças foram então emblocadas em historesina e foram cortes de 3µm no sentido méso-vestibular na região de primeiro molar inferior. Os cortes foram encubados por 2h a 37°C em câmara úmida com uma solução para detecção de Fosfatase Ácida Tartarato Resistente-(Sigma), contendo:

Naftol AS-BI fosfato, acetato de sódio, Fast Red Garnet GBC, Solução de tartarato, Nitrato de Sódio. Após a incubação os cortes foram lavados em água corrente por 30 minutos, e contra-corados com hematoxilina por 50 segundos. Foram então contadas as células marcadas na região de superfície óssea voltadas para a crista óssea alveolar de 5 cortes por animal. Essa etapa foi feita com o auxílio do programa KS400, e foi realizada por dois observadores. Após a contagem, foi feita uma média por animal, e posteriormente uma média por grupo. Os valores obtidos foram submetidos à análise estatística pelo ANOVA e Teste Tukey.

4.0 Resultados

4.1 Qualidade do RNA total extraído

Apenas amostras com comprovada qualidade, verificada em gel de agarose, figura 3A, foram submetidas à reações de RT-PCR.

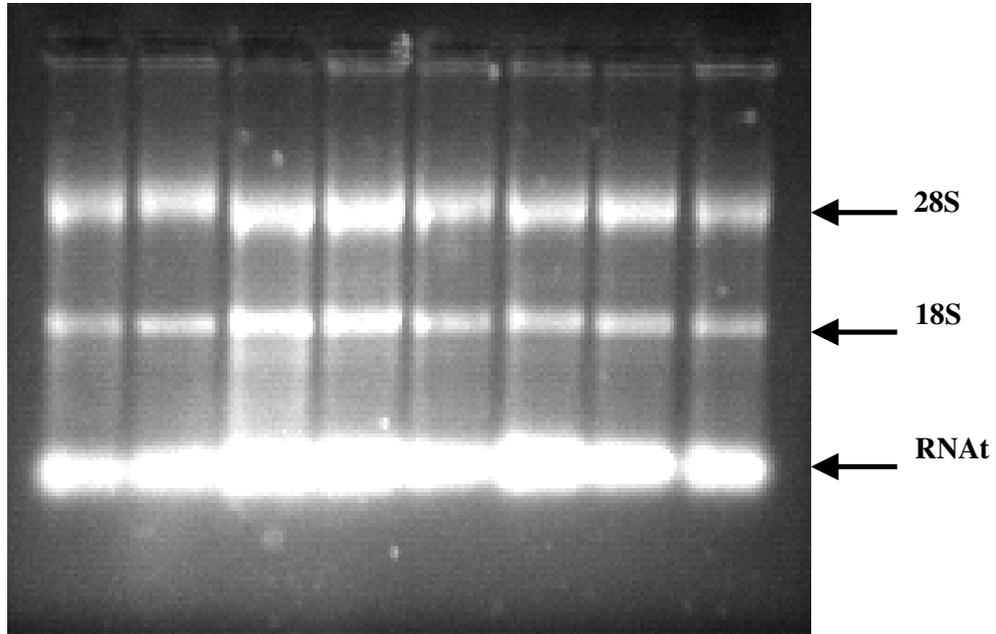


Figura 1A. Ilustração da verificação da qualidade do RNA extraído. Gel de agarose 1,2% corado com brometo etídio. Em cada canaleta foi aplicado 10µl de amostra (1µg de RNA total mais loading buffer) extraída de gengiva de ratos dos animais experimentais. As bandas 28S e 18S representam RNA ribossômico. Nota-se também a presença de RNA transportador (RNAt)

4.2 RT-PCR

4.2.1 Detecção do número de ciclos para as reações de PCR

4.2.1.1 Beta-actina

A partir das reações de PCR, foi definido que com apenas 15 ciclos o gene da beta-actina foi expresso em níveis elevados nas amostras avaliadas.

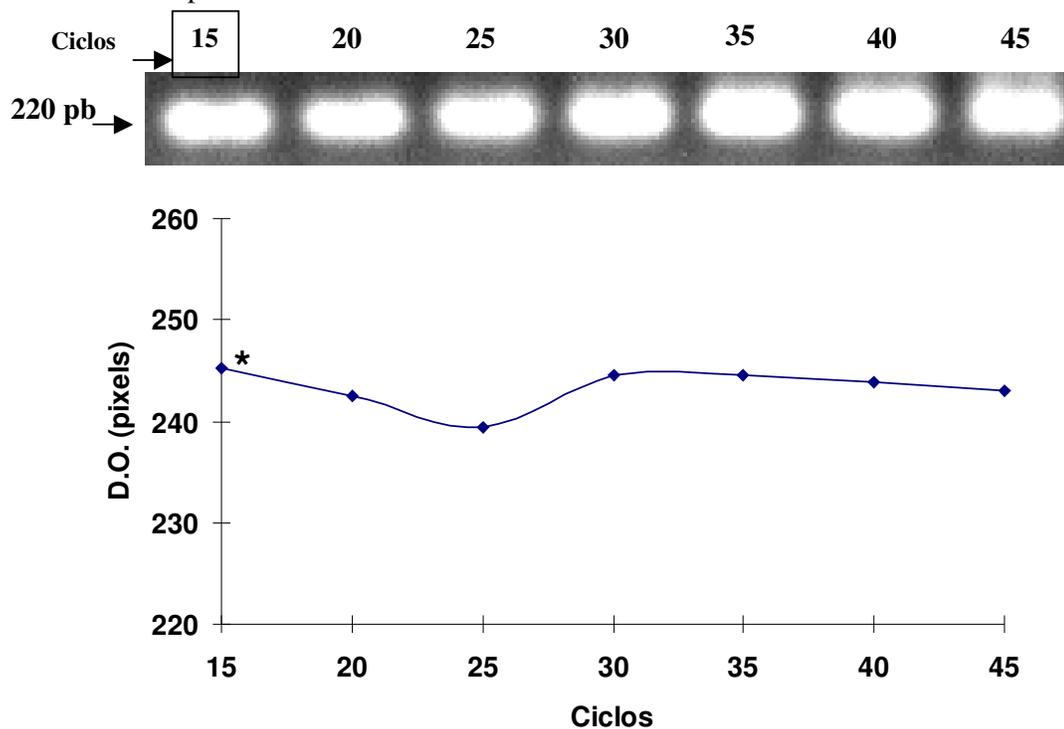


Figura 1B. Determinação do número de ciclos de PCR para a Beta-actina a partir da densitometria óptica (em pixels) de cada banda visualizada em gel de agarose a 1.2%. Notar o número de ciclos escolhido para fazer a comparação entre os grupos (*).

4.2.1.2 Interleucina 1 beta (IL-1beta)

A partir das reações de PCR, foi detectado que com 40 ciclos o gene da IL-1beta estava na fase exponencial de amplificação, e portanto poderia ser usado este número de ciclos para análise comparativa das amostras avaliadas.

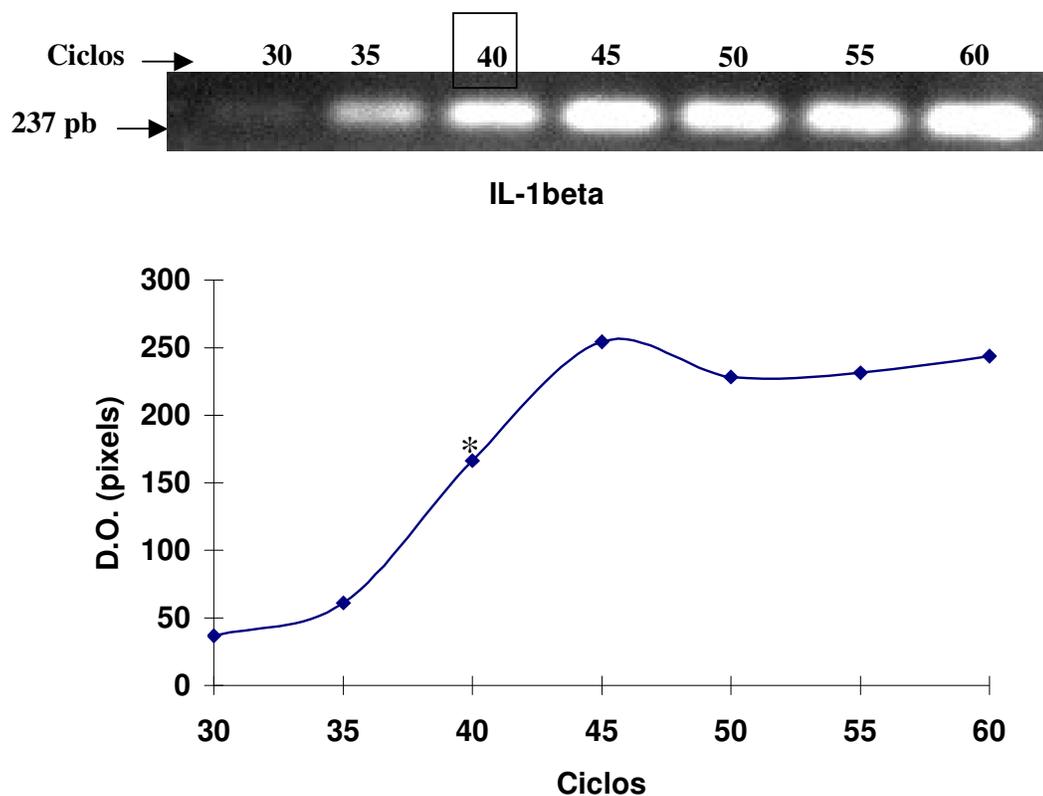


Figura 1C. Determinação do número de ciclos de PCR para a IL-1beta a partir da densitometria óptica (em pixels) de cada banda visualizada em gel de agarose a 1.2%. Notar o número de ciclos escolhido para fazer a comparação entre os grupos (*).

4.2.1.3 Metaloproteinase 2 (MMP-2)

A partir das reações de PCR, foi detectado que com 30 ciclos o gene da MMP-2 estava na fase exponencial de amplificação, e portanto poderia ser usado este número de ciclos para análise comparativa das amostras avaliadas.

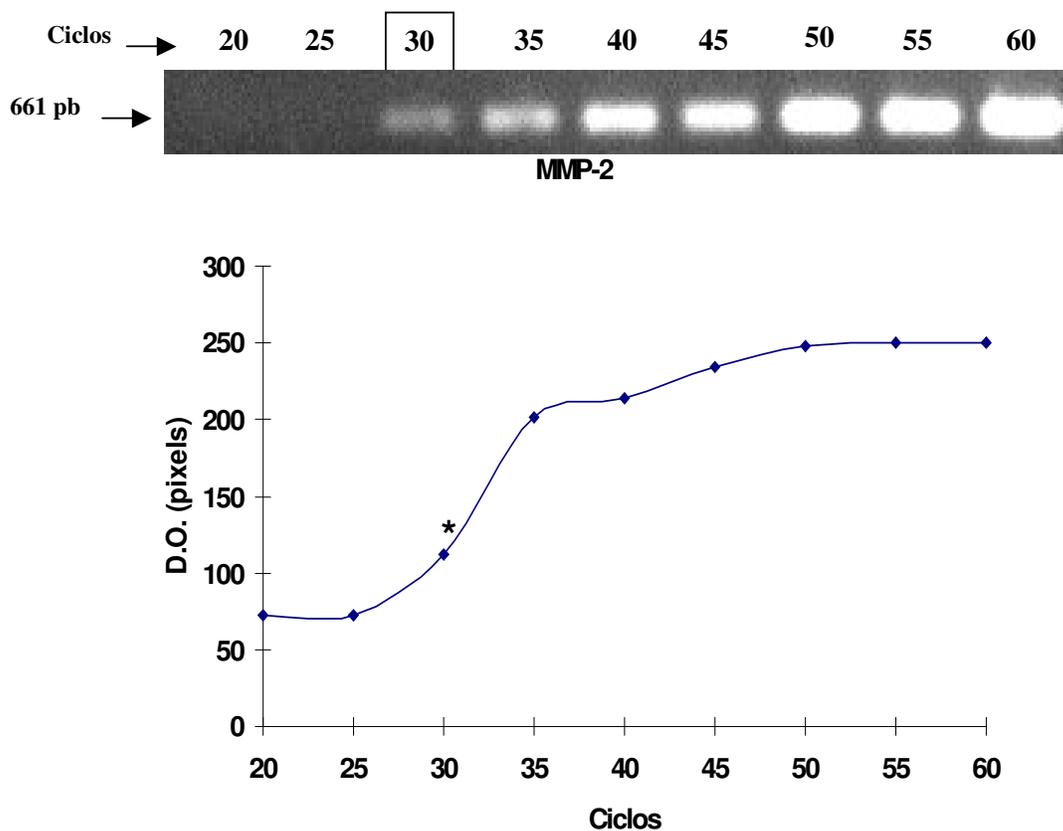


Figura 1D. Determinação do número de ciclos de PCR para a MMP-2 a partir da densitometria óptica (em pixels) de cada banda visualizada em gel de agarose a 1.2%. Notar o número de ciclos escolhido para fazer a comparação entre os grupos (*).

4.2.1.4 Interleucina 6 (IL-6)

A partir das reações de PCR, foi detectado que com 40 ciclos o gene da IL-6 estava na fase exponencial de amplificação, e portanto poderia ser usado este número de ciclos para análise comparativa das amostras avaliadas.

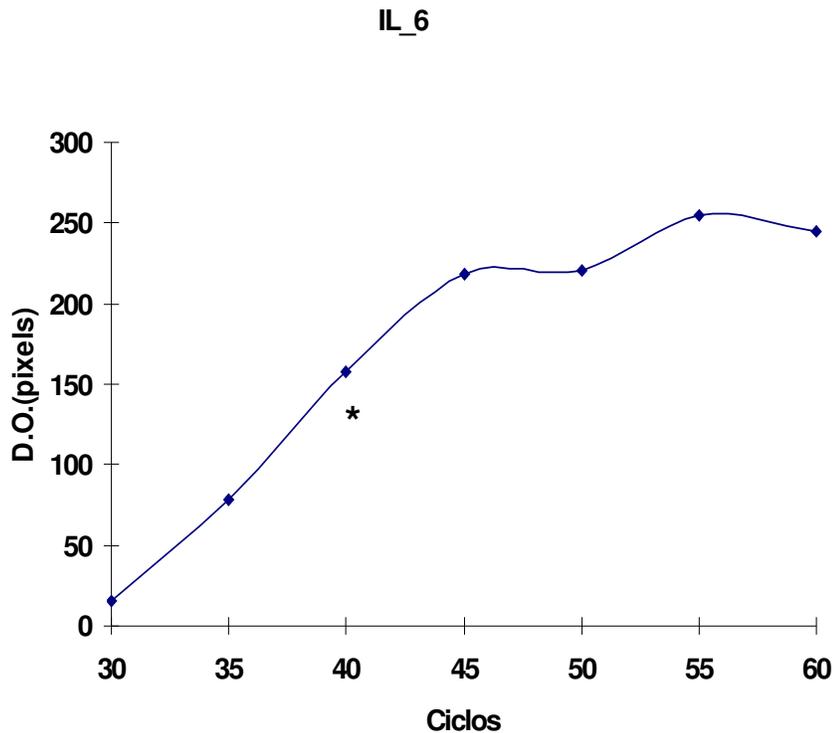
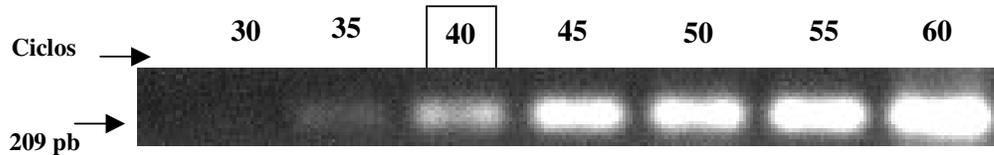


Figura 1E. Determinação do número de ciclos de PCR para a IL-6 a partir da densitometria óptica (em pixels) de cada banda visualizada em gel de agarose a 1.2%. Abaixo da imagem do gel, notar no gráfico o número de ciclos escolhido para fazer a comparação entre os grupos (*).

4.2.2 Confirmação da especificidade dos primers para MMP-9 e TNF- α

Após variações de temperatura de anelamento, e também de concentrações dos reagentes, e ainda confecção de novos primers, não foi obtido sucesso para na amplificação dos fragmentos dos genes MMP-9 e TNF- α das amostras de cDNA dos experimento. Para descartar a possibilidade de ineficiência dos primers, foram feitos testes de amplificação de fragmentos da MMP-9 e TNF- α a partir de DNA genômico de rato. A confirmação de que o fragmento amplificado era o correto, seria possível comparando o peso molecular do fragmento amplificado, que deveria corresponder ao número de pares de bases entre os primers, verificados por meio do BLAST.

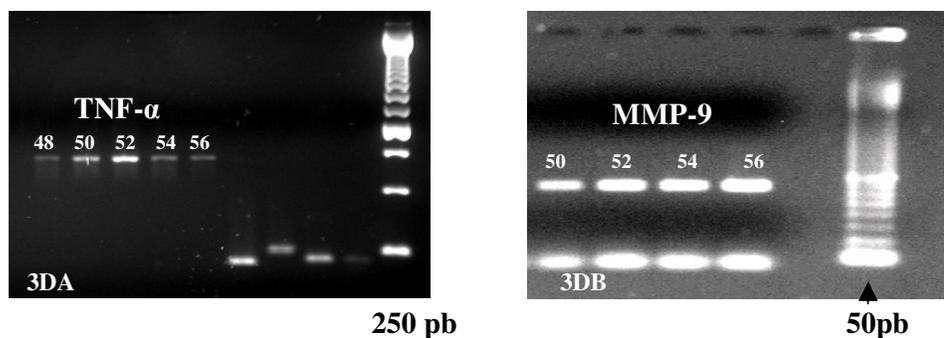


Figura 1F. Imagem de gel de agarose 1,2%, contendo produtos de pcr de TNF- α (681pb) Fig. 3DA, e de MMP-9 (321pb) Fig 3DB, com variação da temperatura de anelamento (MMP-9: 50°C , 52°C , 54°C , 56°C), (TNF- α : 48°C, 50°C , 52°C , 54°C , 56°C). Fragmentos amplificados a partir de DNA genômico de rato.

4.2.3 Comparação da expressão de mRNA por RT-PCR semi-quantitativo

4.2.3.1 Metaloproteinase da Matriz 2 (MMP-2)

Após análise das densidades ópticas dos produtos de RT-PCR para a MMP-2 em gel de agarose, foi observado que as amostras dos animais que receberam PTH, tiveram a expressão gênica de MMP-2 diminuída, tanto 15 dias quanto após 30 dias de tratamento ($p < 0,05$), quando comparadas aos animais que não receberam a droga.

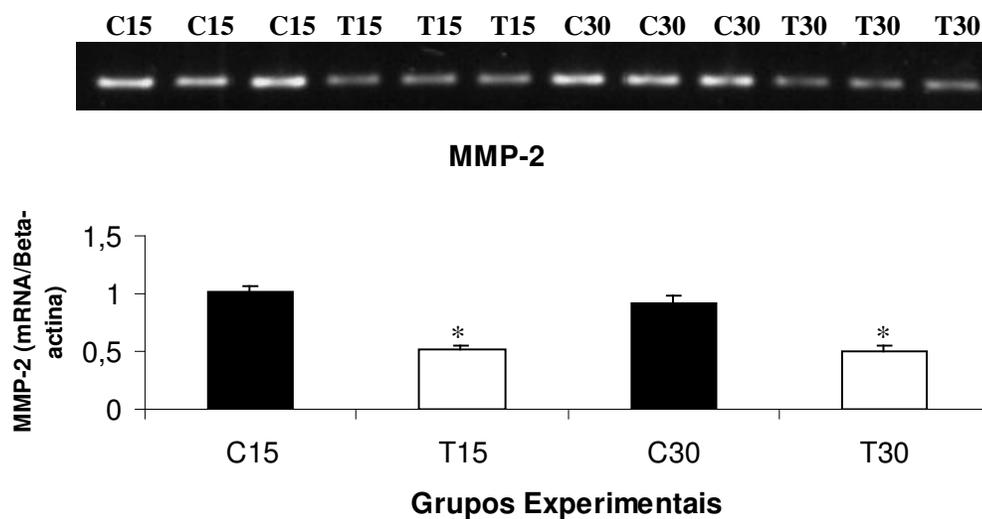


Figura 1G. Imagem do gel de agarose a 1,2%, demonstrando em triplicata o produto de RT-PCR para MMP-2 das amostras dos animais controle (C) e tratados com PTH (T), nos diferentes tempos experimentais (15 e 30 dias). Abaixo da imagem do gel, gráfico das médias e \pm dp das densidades ópticas das bandas de cada grupo, normalizadas pela beta-actina. Notar menor expressão nos grupos T15 e T30 (*).

4.2.3.3 Interleucina 1 beta (IL-1beta)

Após análise das densidades ópticas dos produtos de RT-PCR para a IL-1beta em gel de agarose, foi observado que não houve diferença estatística entre as amostras dos animais controles e dos tratados, independentemente do período, 15 ou 30, analisado. ($p>0,05$).

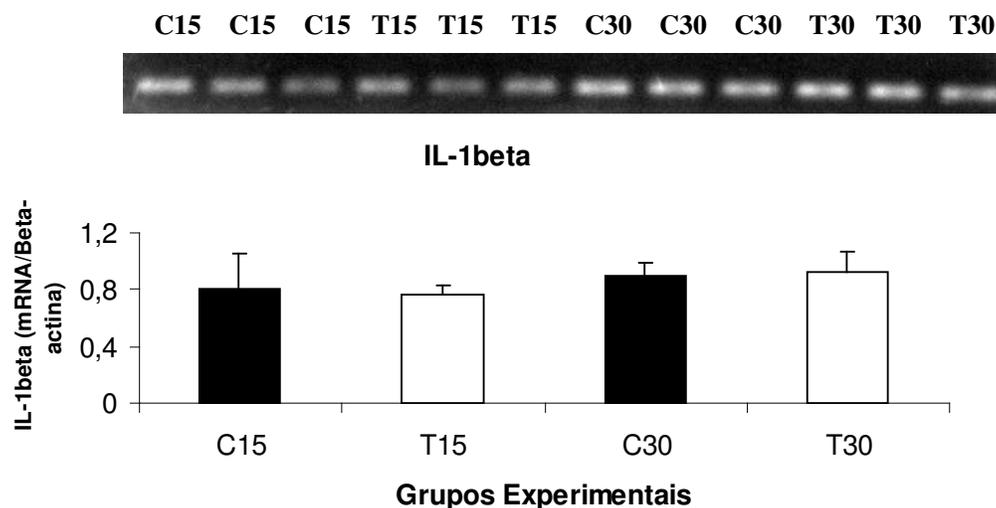


Figura 1H. Imagem do gel de agarose a 1,2%, demonstrando, em triplicata, o produto de RT-PCR para IL-1-beta das amostras dos animais controle (C) e tratados com PTH (T), nos diferentes tempos experimentais (15 e 30 dias). Abaixo da imagem do gel, gráfico das médias e \pm dp das densidades ópticas das bandas de cada grupo, normalizadas pela beta-actina.

4.2.3.4 Interleucina 6 (IL-6)

Após análise das densidades ópticas dos produtos de RT-PCR para a IL-6 em gel de agarose, foi observado que as amostras dos animais controle com 30 dias de doença, tiveram uma maior expressão desse gene, quando comparado com todas outras amostra (tratados 15 e 30 dias, e controle 15 dias) $p < 0,01$.

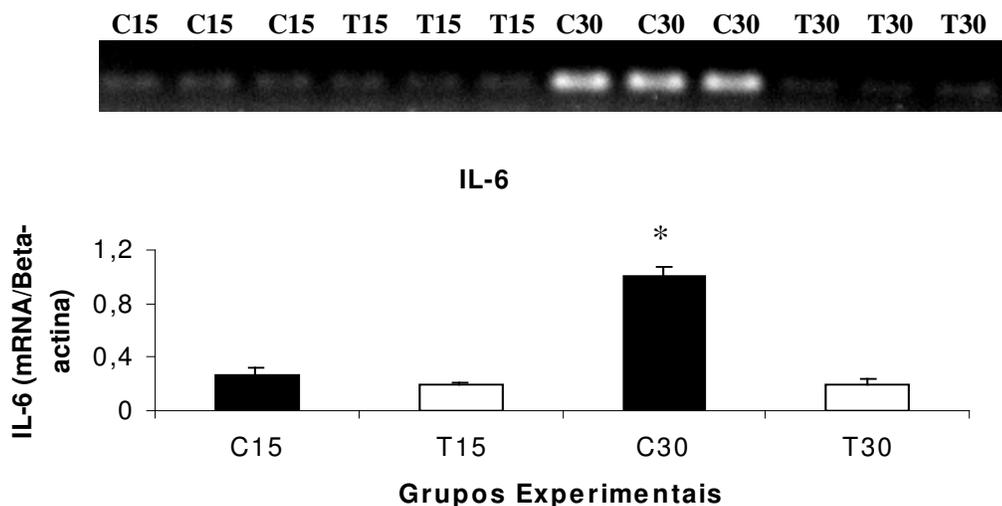


Figura 11. Imagem do gel de agarose a 1,2%, demonstrando em triplicata o produto de RT-PCR para IL-6 das amostras dos animais controle (C) e tratados com PTH (T), nos diferentes tempos experimentais (15 e 30 dias). Abaixo da imagem do gel, gráfico das médias e \pm dp das densidades ópticas das bandas de cada grupo, normalizadas pela beta-actina. Notar maior expressão de IL-6 no grupo C30 (*).

4.3 Zimografia

Após análise das bandas do gel de zimografia, foi observado que a atividade gelatinolítica da MMP-2 decresceu com o tempo tanto nos animais tratados, como nos controles, decréscimo este notado nas formas pró, ativa e na atividade total desta MMP, figura 1J e 1K. Além disso houve uma diminuição da atividade da MMP-9 (~86kDa) nos animais tratados com PTH apenas por 15 dias (figura 1).

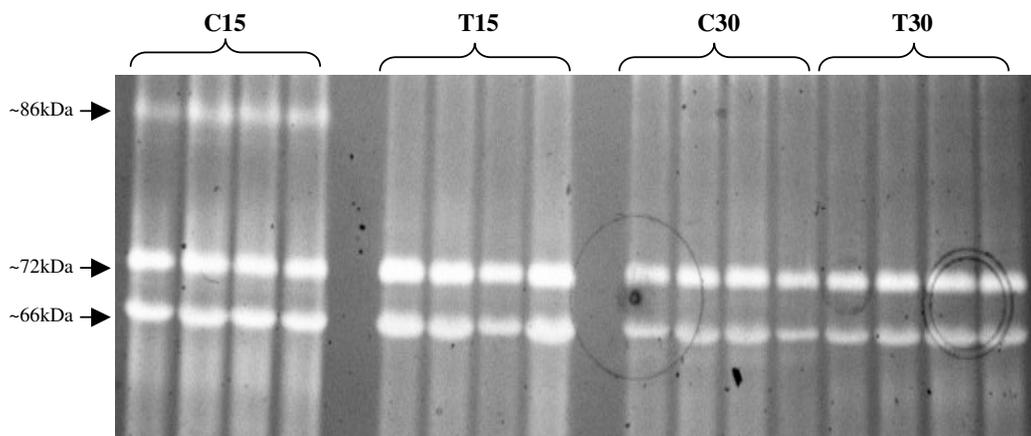


Figura 1J. Imagem do gel de zimografia das amostras de 4 animais (1amostra/canaleta) de cada um dos grupos controle (C) e tratados com PTH (T), nos diferentes tempos experimentais (15 e 30 dias). Notar que a atividade da MMP-9 (85kDa), foi maior no grupo C15, e que após 30 dias de doença, e que as formas latente (72kDa) e ativa (66kDa) da MMP-2 tiveram a sua atividade diminuídas com o decorrer do tempo, 15 para 30 dias.

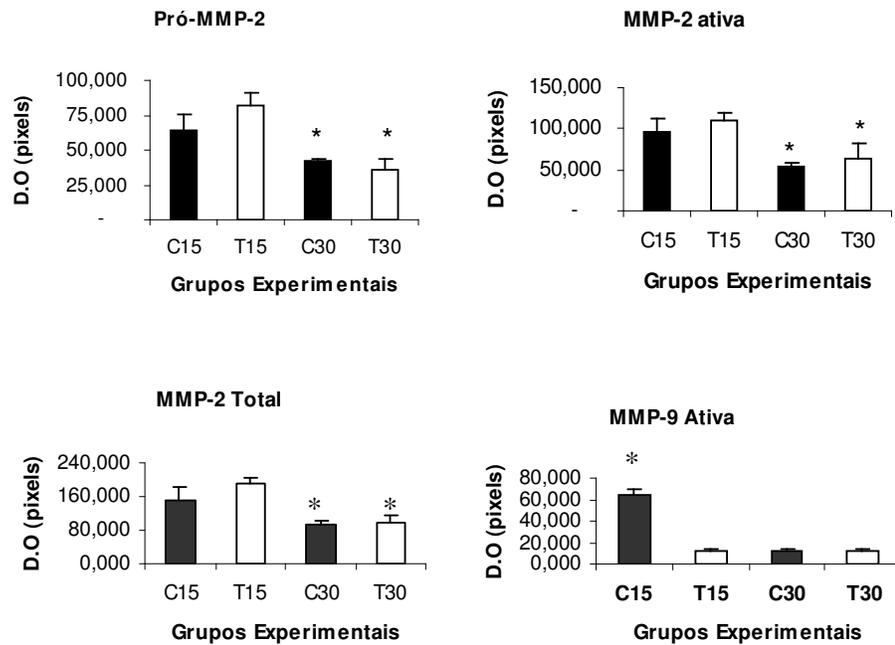


Figura 1K. Gráficos representativos das médias e \pm dp das densidades ópticas das bandas obtidas do gel de zimografia, de cada um dos grupos controle (**C**) e tratados com PTH (**T**), nos diferentes tempos experimentais (**15** e **30** dias). Notar que as formas pro e ativa da MMP-2, e também a soma das duas formas denota uma diminuição na atividade desta metaloproteinase no decorrer do tempo experimental, **15** para **30** dias, independente do tratamento com PTH (* $p < 0,05$). No gráfico da MMP-9, notar que o grupo **C15** apresentou maior atividade gelatinolítica em comparação com os demais grupos (* $p < 0,01$).

4.4 Imunoprecipitação

A análise do gel de zimografia feito com as amostras imunoprecipitadas, demonstrou que a gelatinase de peso ~66kDa se refere à forma ativa da MMP-2, e a de peso ~72kDa refere-se à forma pró dessa mesma metaloproteinase. A amostra imunoprecipitada com anticorpo anti-MMP-9, revelou que a atividade da gelatinase ~86kDa se refere à forma ativa da MMP-9, além de bandas das formas pró e ativa para MMP-2 no ensaio (figura 1L).

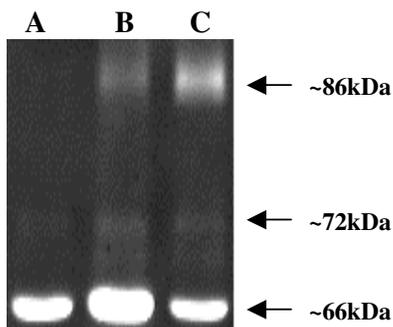


Figura 1L. Imagem de gel de zimografia feito após imunoprecipitação com anticorpo anti-MMP-2 (A) e anti-MMP-9 (C). Na canaleta B foi usada uma amostra como controle positivo, sem imunoprecipitação. Notar que apesar do anticorpo para MMP-9 (C) ter se ligado ao seu substrato específico, aparece também a protease MMP-2 na canaleta C. Além disso o anticorpo para MMP-2 ligou mais efetivamente à forma ativa dessa enzima (66kDa).

4.5 Fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP)

Após análise dos cortes que foram submetidos à histoquímica para marcação de TRAP, foi observado que todos os grupos apresentaram células marcadas positivamente para TRAP tanto na região superficial do osso alveolar, como em alguns vasos sanguíneos do ósseo alveolar da região dos primeiros molares analisados, figura 3L. Após análise comparativa por meio de teste estatístico, foi observado que o grupo **T30**, em média, tinha mais células TRAP-positivas na região de superfície óssea alveolar, em comparação com os outros grupos ($p < 0,05$), Fig 3M.

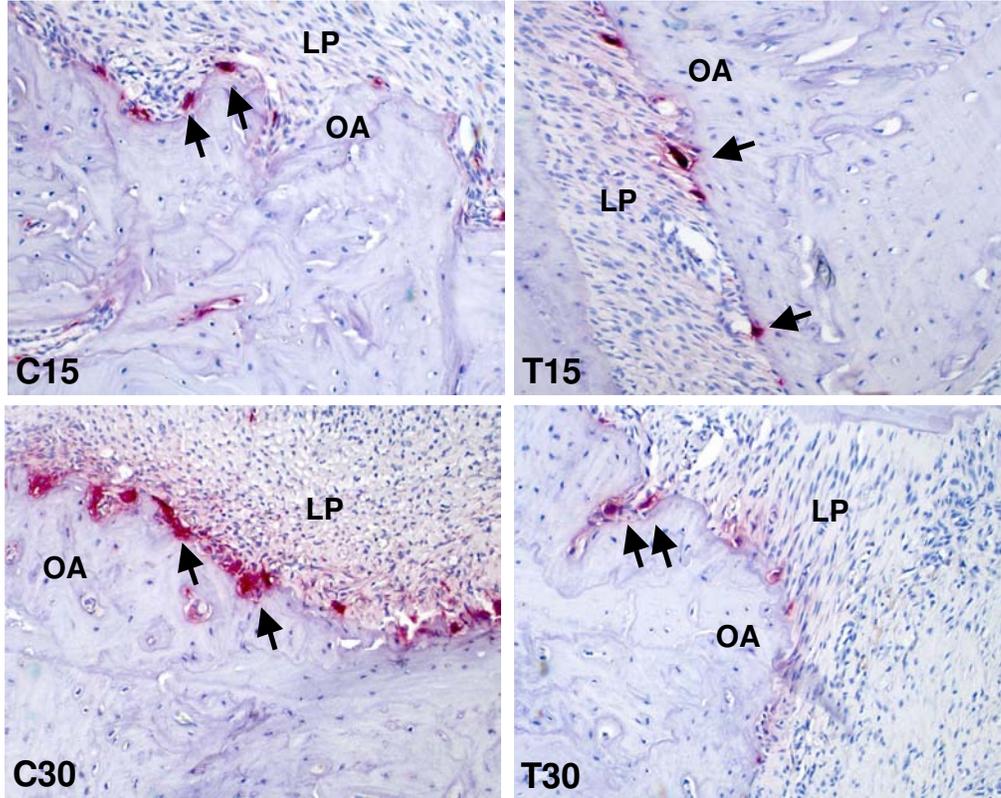


Figura 1M. Acima, fotomicrografias representativas de cada grupo experimental (C15, T15, C30, T30), evidenciando células TRAP-positivas (setas) na região de superfície alveolar óssea dos primeiros molares com periodontite induzida. LP: ligamento periodontal, AO: osso alveolar. Aumento original (200x).

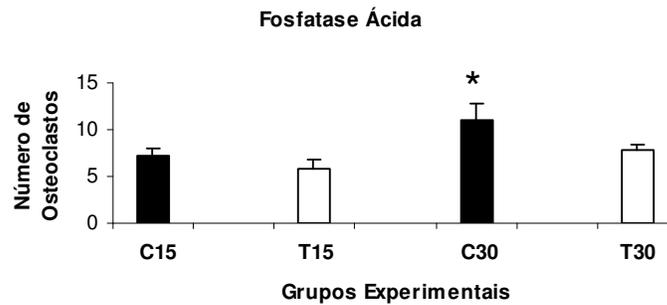


Figura 1N. Acima, gráfico representativo das médias e $\pm dp$, do número de células TRAP-positivas, localizadas na região de superfície alveolar óssea nos diferentes grupos experimentais. Notar maior número de células marcadas no grupo C30 (*) ($p < 0,05$).

4.6 Imunohistoquímica

A análise das cortes histológicos imunomarcados com anticorpo anti-MMP-2, demonstrou que essa proteinase foi muito expressa por todos os grupos experimentais. A sua localização se deu principalmente em células do tecido conjuntivo do periodonto de proteção (Prancha 1), mas sendo encontrada também, em menor quantidade, nas células do periósteo da crista alveolar.

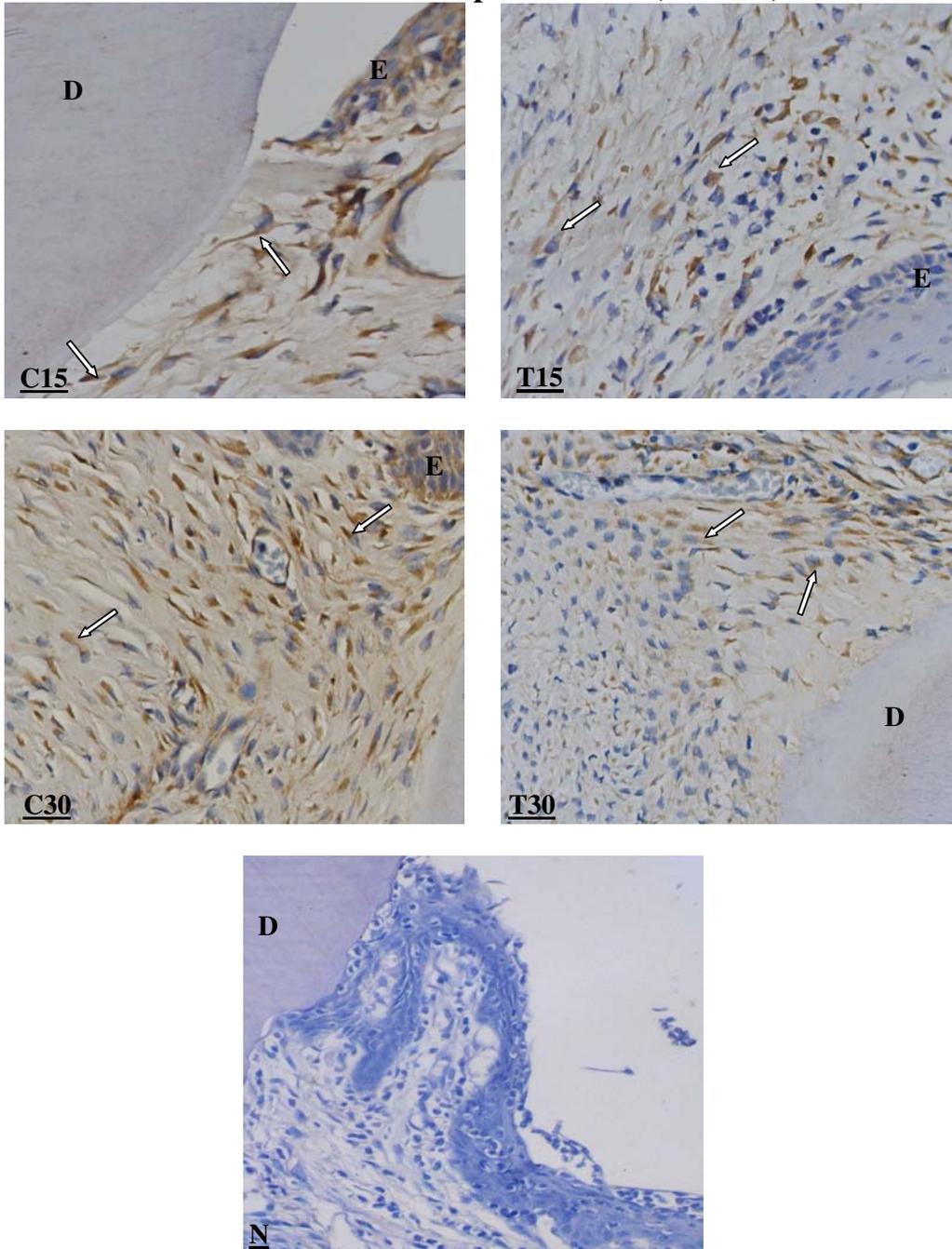
Após análise dos cortes histológicos imunomarcados com anticorpo anti-MMP-9, foi possível notar que em todos os grupos experimentais, algumas células, em sua maioria com morfologia semelhantes à PMNs, localizadas no tecido conjuntivo do periodonto de proteção, tiveram os seus citoplasmas marcados pelo anticorpo anti-MMP-9, prancha 2. .

A análise dos cortes histológicos imunomarcados com anticorpo anti-IL1-beta, demonstrou que essa citocina foi muito expressa por todos os grupos experimentais. A sua localização se deu principalmente nas células do tecido conjuntivo do periodonto de proteção, prancha 3.

A análise dos cortes histológicos, imunomarcados com anticorpo anti-IL-6, demonstrou que essa citocina foi expressa por todos os grupos experimentais. A sua localização se deu principalmente nas células do periósteo da crista alveolar, prancha 4. Sendo encontrada também, em menor quantidade, nas células do tecido conjuntivo do periodonto de proteção (prancha 4)

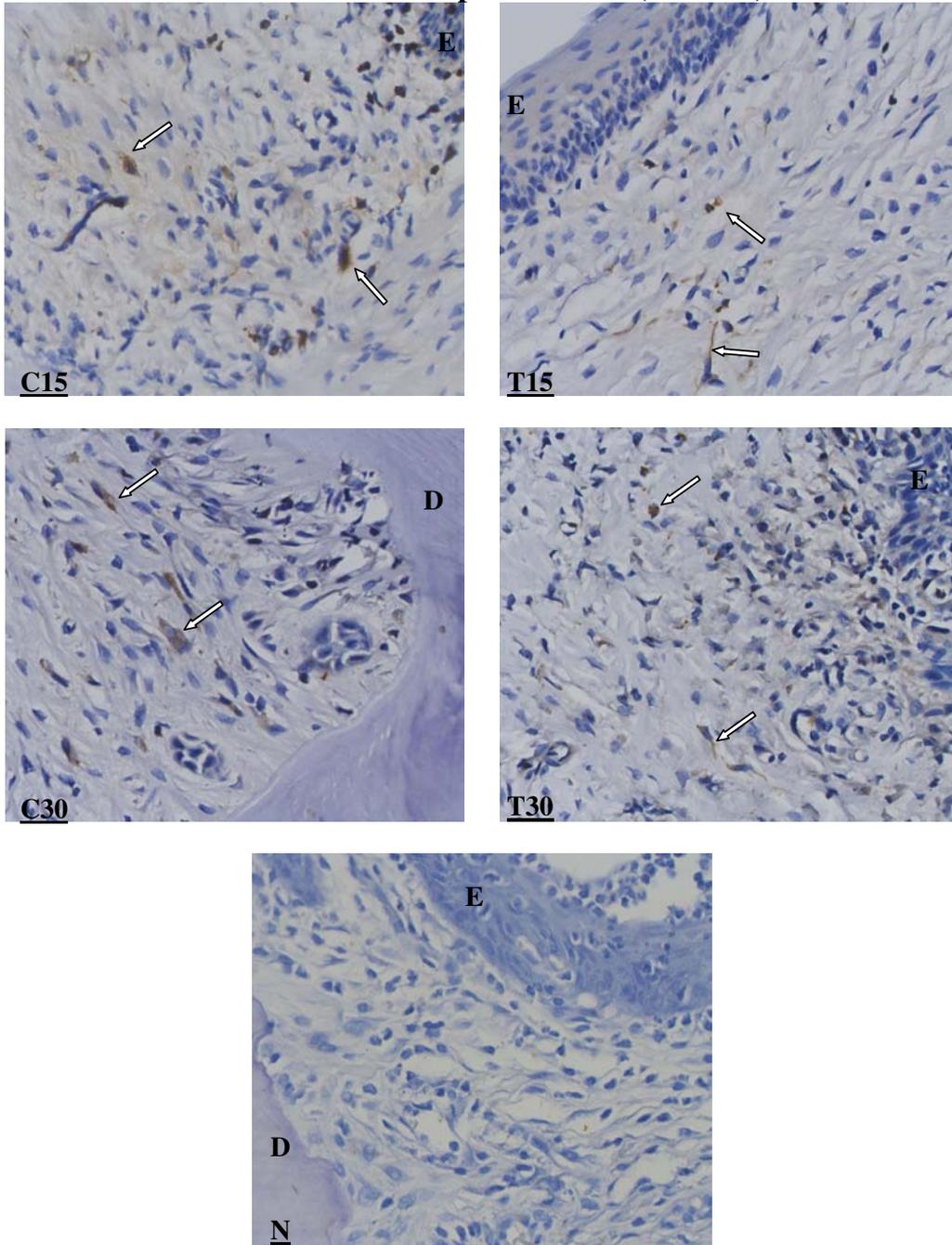
A análise dos cortes histológicos, imunomarcados com anticorpo anti-TNF-alfa, foi possível notar que algumas células localizadas no epitélio e conjuntivo do periodonto de proteção, tiveram os seus citoplasmas marcados. Essa marcação foi evidenciada em todos os grupos analisados (prancha 5)

Prancha 1: Metaloproteinase 2 (MMP-2)



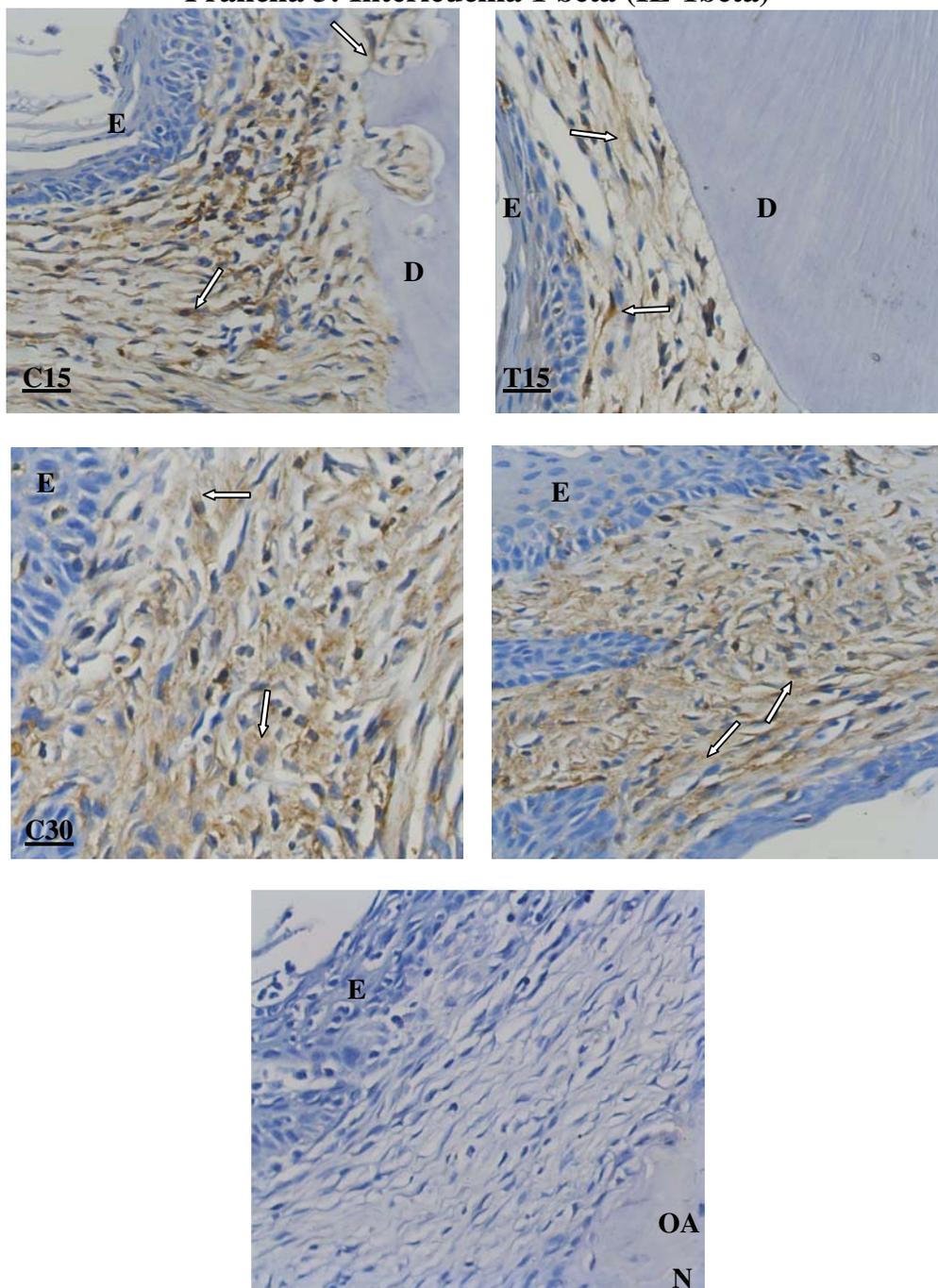
Prancha 1. Fotomicrografias, com aumento original de 200x, da região ao redor do primeiro molar com doença periodontal induzida, dos diferentes grupos experimentais, imunomarcada com anticorpo anti-MMP-2. Notar que em todos os grupos a MMP-2 foi detectada (setas) em grande quantidade. **15C** e **30C** - grupos controles com 15 e 30 dias respectivamente. **15T** e **30T**-grupos tratados com PTH por 15 e 30 dias respectivamente. **N**- controle negativo, reação feita com omissão do anticorpo primário, **D**- dentina, **E**- epitélio.

Prancha 2: Metaloproteinase 9 (MMP-9)



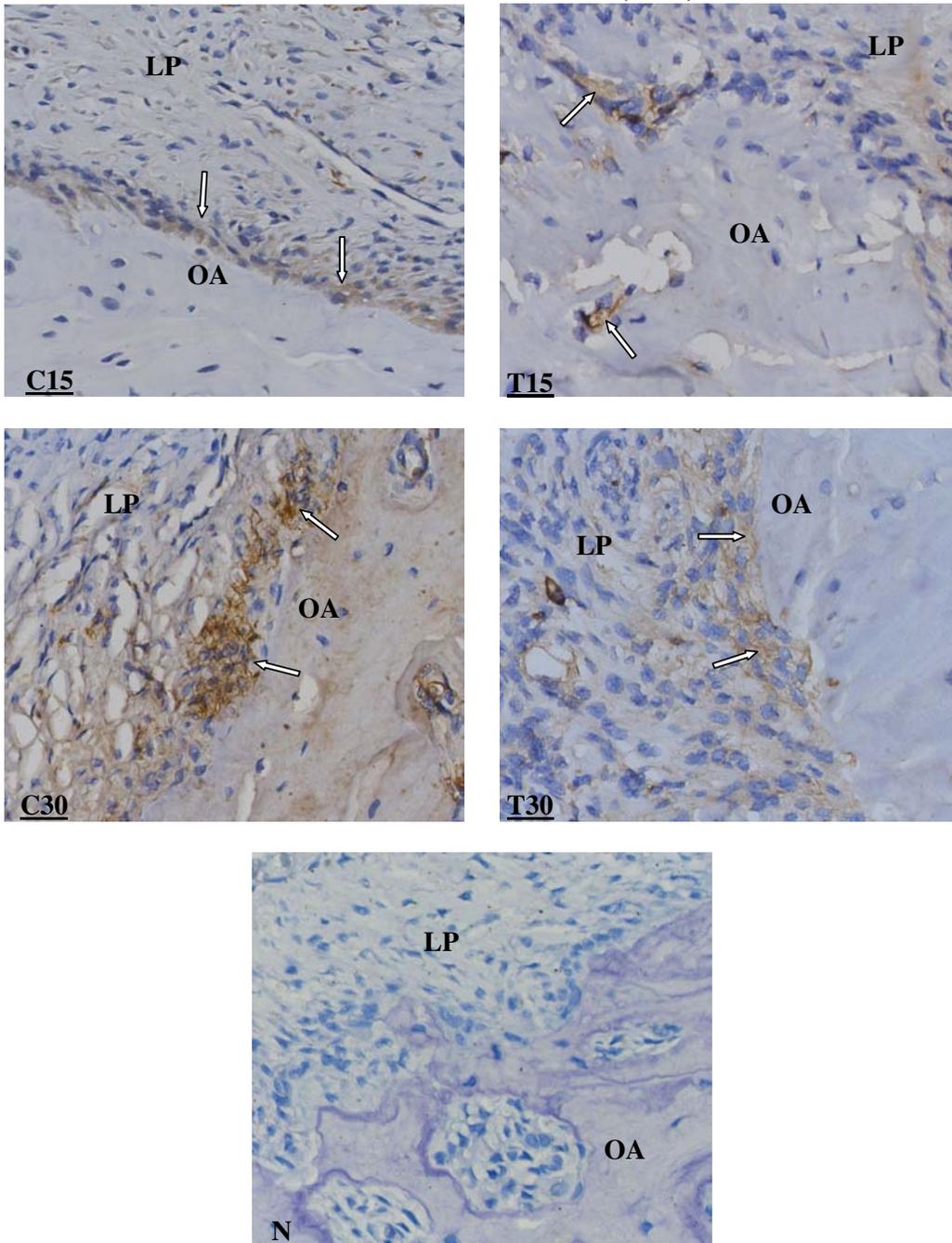
Prancha 2 Fotomicrografias, com aumento original de 200x, da região ao redor do primeiro molar com doença periodontal induzida, dos diferentes grupos experimentais, imunomarcada com anticorpo anti-MMP-9. Notar que em todos os grupos a MMP-9 foi detectada, mas poucas células (setas) apresentaram marcação. **15C** e **30C** - grupos controles com 15 e 30 dias respectivamente. **15T** e **30T**-grupos tratados com PTH por 15 e 30 dias respectivamente. **N**- controle negativo, reação feita com omissão do anticorpo primário. **D**- dentina, **E**- epitélio.

Prancha 3: Interleucina 1 beta (IL-1beta)



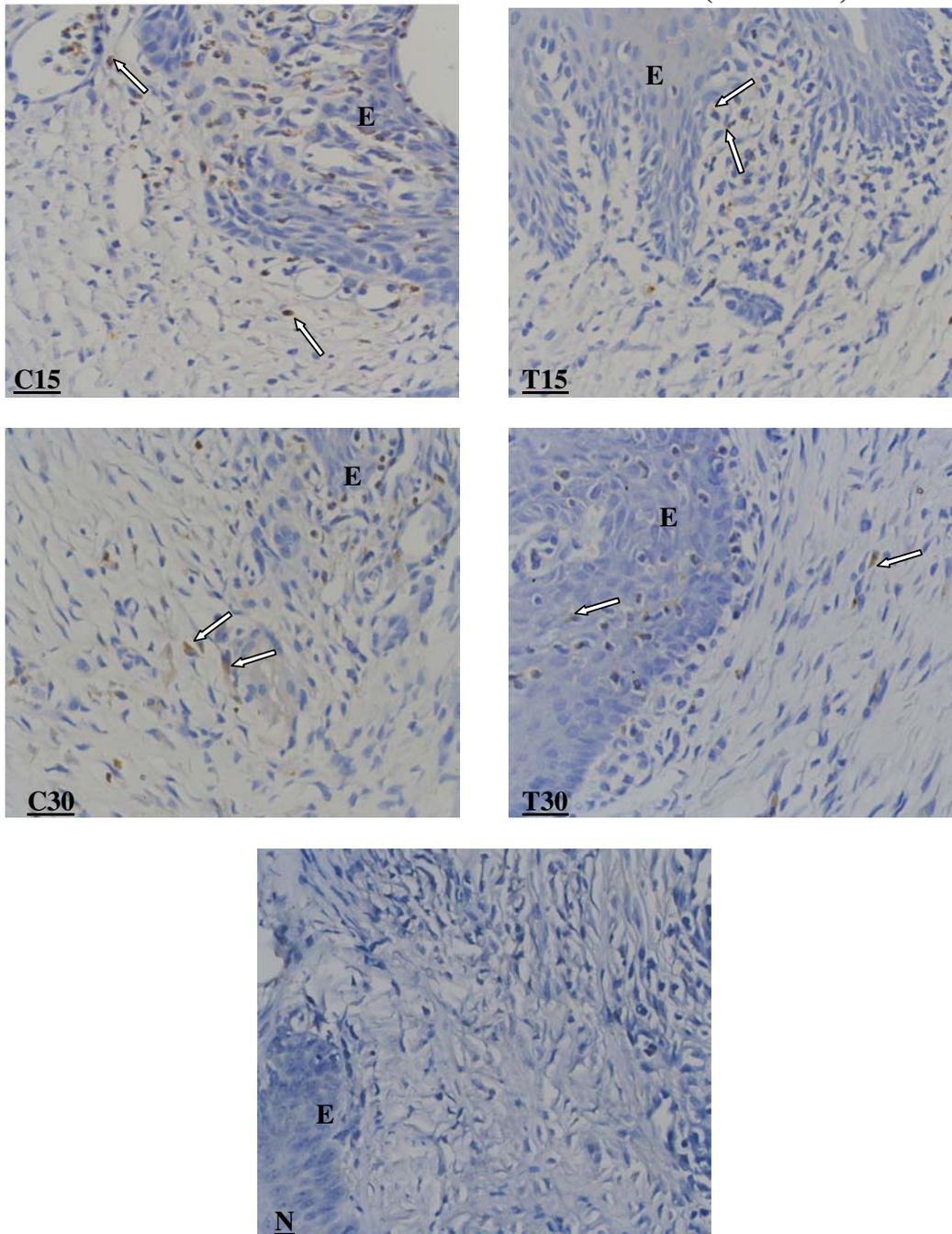
Prancha 3. Fotomicrografias, com aumento original de 200x, da região ao redor do primeiro molar com doença periodontal induzida, dos diferentes grupos experimentais, imunomarcada com anticorpo anti-IL-1beta. Notar que em todos os grupos a IL-1beta foi detectada, sendo localizada principalmente na região abaixo ao epitélío. **15C** e **30C** - grupos controles com 15 e 30 dias respectivamente. **15T** e **30T** grupos tratados com PTH por 15 e 30 dias respectivamente. **N**-controle negativo, reação feita com omissão do anticorpo primário. **D**- dentina, **E**- epitélío, **OA**-osso alveolar.

Prancha 4: Interleucina 6 (IL-6)



Prancha 4. Fotomicrografias, com aumento original de 200x, da região ao redor do primeiro molar com doença periodontal induzida, dos diferentes grupos experimentais, imunomarcada com anticorpo anti-IL-6. Notar que em todos os grupos a IL-6 foi detectada, sendo que sua principal localização foi nas células da superfície da crista óssea alveolar (setas). **15C** e **30C** - grupos controles com 15 e 30 dias respectivamente. **15T** e **30T** grupos tratados com PTH por 15 e 30 dias respectivamente. **N**-controle negativo, reação feita com omissão do anticorpo primário. **LP**- ligamento periodontal, **OA**- osso alveolar.

Prancha 5: Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-alfa)



Prancha 5. Fotomicrografias, com aumento original de 200x, da região ao redor do primeiro molar com doença periodontal induzida, dos diferentes grupos experimentais, imunomarcada com anticorpo anti-TNF- α . Notar que em todos os grupos o TNF- α foi detectada, mas poucas células (setas) apresentaram marcação sendo que essas células se localizavam tanto no epitélio, quanto no tecido conjuntivo subjacente a esse epitélio. **15C** e **30C** - grupos controles com 15 e 30 dias respectivamente. **15T** e **30T** grupos tratados com PTH por 15 e 30 dias respectivamente. **N**- controle negativo, reação feita com omissão do anticorpo primário. **E**- epitélio.

5.0 Discussão

O presente estudo demonstrou que o PTH foi capaz de modular a expressão de mRNA para IL-6 e MMP-2, além da atividade da MMP-9 no tecido gengival dos primeiros molares inferiores de ratos com periodontite induzida por ligadura. Adicionado a esses achados, a redução no número de células TRAP-positivas nos animais tratados com PTH, suporta os indicativos que este hormônio pode atenuar a destruição de tecidos periodontais observado em periodontite experimental (Barros *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2005).

A IL1beta é uma citocina que tem sido reportada como uma molécula importante na patogênese da doença periodontal, é um dos ativadores iniciais de citocinas quimiotáticas e de moléculas adesivas que facilitam a migração de leucócitos para os tecidos (Moreira *et al.*, 2005). Em doença periodontal tem sido relacionada à degradação tecidual, tendo relação direta com o aumento de reabsorção óssea (Baker 2000 e Lang *et al.*, 2000). Apesar da grande quantidade de IL1-beta detectada em todos os grupos experimentais, e sabendo-se que o PTH pode modular a expressão dessa citocina (Toribio *et al.*, 2003), não foi detectada nenhuma influência desse hormônio na expressão gênica da mesma, o que leva a sugerir que a via de atuação do PTH para atenuar a perda óssea na periodontite em ratos, possa ser independente de IL-1beta.

O delicado equilíbrio entre MMPs e inibidores teciduais de metaloproteinases da matriz (TIMPs) regulam a degradação de colágeno, elastina e outros componentes de matriz extracelular e membranas basais (Kähäri e Saarialho-Kere, 1999). MMPs podem processar citocinas, quimiocinas, receptores de superfície celular e fatores de crescimento, mostrando potencial para regular processos inflamatórios (Uitto *et al.*, 2003). A expressão basal de MMPs por células é usualmente baixa, mas pode ser rapidamente aumentada por vários sinais exógenos incluindo mediadores pós-inflamatórios (Kähäri e Saarialho-Kere, 1999). Os membros da família de MMP que têm sido implicados na destruição de tecido periodontal envolvem MMP-1, MMP-2, MMP-8 e MMP-9 (Pattamapun, *et al.*, 2003). Dentre essas, a MMP-2 tem demonstrado ter um papel importante na remodelação e degradação de diversos tecidos conjuntivos, além do periodonto (Creemers *et al.*, 1998). Essa proteinase é normalmente secretada na forma latente, e o processamento extracelular para a forma ativa da enzima é um importante passo para a regulação da atividade da MMP-2 (Nagase, 1997). Os

resultados obtidos nesse estudo indicaram altos níveis de expressão gênica e proteica no tecido gengival durante o desenvolvimento da doença periodontal em todos os grupos, sendo que ambas as expressões diminuíram de 15 para 30 dias da doença, independente do tratamento com PTH. Além disso, foi notado também que a administração intermitente de PTH diminuiu a expressão de mRNA para MMP-2, embora essa diminuição não tenha implicado na alteração da atividade dessa proteinase.

A MMP-9 é a collagenase predominante encontrada em fluidos orais e em tecidos gengivais inflamados (Westerlund *et al.*, 1996; Kylmaniem *et al.*, 1996; Makela *et al.*, 2004). A maior fonte de MMP-9 em gengiva inflamada aparece da degranulação de PMNs (Westerlund *et al.*, 1996; Makela *et al.*, 2004) e uma menor porção é proveniente de queratinócitos (Kylmaniem *et al.*, 1996; Makela *et al.*, 2004). Westerlund *et al.*, (1996) demonstraram que a intensidade de imunoreatividade para MMP-9 em gengivas inflamadas aumentou proporcionalmente com o aumento de PMNs no infiltrado inflamatório. Por meio de imunohistoquímica, PMNs positivas para MMP-9 foram encontradas no tecido gengival dos animais de todos os grupos analisados, embora a expressão gênica para MMP-9 nos períodos estudados não tenha sido detectada. Curiosamente após 15 de indução da doença, o grupo C15 expressou altos níveis dessa proteinase quando da análise da atividade dessa protease, como demonstrado na figura 1K. A razão pela qual o tratamento com PTH diminuiu a atividade de MMP-9 é desconhecida, mas talvez possa ter relação com os achados publicados por Barros *et al.*, (2003), onde o tratamento com PTH diminuiu o número de PMNs na gengiva de ratos com periodontite induzida, já que existem estudos demonstrando que o PTH pode afetar a expressão de MMP-9 (McClelland *et al.*, 1998; Selvamurugan *et al.*, 2000).

O TNF-alfa é uma citocina que pode ser secretada por macrófagos, monócitos, células T, neutrófilos e células NK (Isomäki e Punnonen, 1997). As ações do TNF-alfa são numerosas, afetam um amplo espectro de tipos celulares, e é uma das citocinas envolvidas na patogênese da doença periodontal. É encontrada em grande quantidade tanto em fluido crevicular como tecido periodontal de sítios com periodontite (Gemmell *et al.* 1997). Estudos em primatas demonstraram que o TNF-alfa tem um importante papel na reação inflamatória, na reabsorção óssea e na perda de tecido conjuntivo durante o desenvolvimento experimental de periodontite (Graves e Cochran, 2003). No

presente estudo, por meio de imunohistoquímica, foi verificado que todos os animais expressaram TNF-alfa, nos períodos de desenvolvimento da doença estudados (15 e 30 dias). A expressão se limitou a poucas células, principalmente junto ao epitélio oral, demonstrando que essa citocina pode ter um papel importante no desenvolvimento da doença no modelo experimental utilizado. É desconhecido o motivo da não detecção de expressão de mRNA nos animais avaliados, pois foram feitos testes com amostras não pertencentes aos grupos experimentos, e foi observado um sucesso para reações de RT-PCR para essas amostras

Uma variedade de tipos celulares pode expressar o gene IL-6 dentro do tecido periodontal, entre eles: células T, células B, células endoteliais, osteoblastos, macrófagos e fibroblastos. Investigações na expressão de mRNA para IL-6 demonstram resultados contraditórios. Yamazaki *et al.*, (1988), reportaram altos níveis de expressão gênica de IL-6 tanto em epitélio quanto em lâmina própria de tecido gengival saudável, embora, paradoxalmente, a expressão tenha sido diminuída em tecido de sítios com periodontite. Já Matsuki *et al.*, (1992), por meio de hibridização *in situ* reportou altos níveis de expressão de mRNA para IL-6 em gengiva inflamada de sítios periodontalmente doentes, notando expressões mínimas em gengiva saudável.

Embora não exista trabalho que avalie a resposta de expressão de IL-6 frente a administração intermitente de PTH em condições inflamatórias, tem sido demonstrado que a administração de hPTH (1-34) induz a um rápido e seletivo aumento da proteína IL-6 em células da medula óssea, predominantemente em osteoblastos, osteócitos e megacariócitos (Liang *et al.*, 1999).

A rápida expressão de IL-6 demonstra a sua importância como um dos mediadores iniciais da ação do PTH no osso, como tem sido sugerido por estudos prévios baseados na análise de expressão de mRNA (Onyia *et al.*, 1995, Pollock *et al.*, 1996). No presente estudo foi verificado um decréscimo na expressão gênica de IL-6 causado por PTH em tecido gengival inflamado, demonstrando que esse hormônio pode influenciar de maneira direta células presentes no micro ambiente de sítios periodontalmente doentes.

Apesar de existirem múltiplas vias de ativação osteoclástica, grande importância é reportada a duas vias: a OPG/RANKL/RANK e a IL-6/IL-6sR, as quais

operam independentes, e cuja contribuição de cada uma individualmente para a osteoclastogênese ainda não é completamente conhecida (Buxton *et al.*, 2004).

O PTH controla a formação e reabsorção óssea primariamente por meio da modulação do sistema OPG/RANKL/RANK. Em resposta ao PTH, células imaturas da linhagem osteoblástica aumentam a expressão de citocinas ligadas a membranas, incluindo IL-6, IL-6sR e fator estimulante de colônia de macrófagos (Buxton *et al.*, 2004). Nesse estudo, o tratamento intermitente com PTH demonstrou uma consistente correlação entre o decréscimo da expressão de IL-6 e diminuição da reabsorção óssea, vista por meio de TRAP. TRAP é um marcador bioquímico considerado relativamente específico para osteoclastos (Mikin, 1986). Nos animais desse estudo, células TRAP-positivas foram encontradas na região perivascular do osso alveolar e principalmente na superfície óssea alveolar, que, no caso do osso alveolar, coincide com regiões imunomarcadas com IL-6, sendo que essa molécula foi expressa principalmente por osteoblastos. A análise quantitativa das células marcadas com TRAP demonstrou um maior número dessas células no grupo C30, sendo assim, é possível que a diminuição da expressão de IL-6, ocasionada pela administração de PTH, possa estar diretamente relacionada ao menor número de osteoclastos, e também à diminuição de perda óssea causada por periodontite, já observada em outros estudos (Barros *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2005).

6.0 Conclusão

Dentro dos limites deste estudo, pôde-se concluir que, no período estudado, o PTH, quando administrado intermitentemente, interferiu em fatores (IL-6, MMP-2, MMP-9, número de células TRAP-positivas) que estão diretamente relacionados à degradação tecidual ocasionada pela periodontite.

7.0 Referências

Athanasou N, Sabokar A. Human osteoclast ontogeny and pathological bone resorption. *Histol Histopathol.* 1999; 14: 635-647.

Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microb Infect.* 2000; 2: 1181-1192.

Barros SP, Silva MAD, Somerman MJ, Nociti Jr FH. Parathyroid Hormone Protects Against Periodontitis-associated Bone Loss. *J Dent Res.* 2003; 82: 791-795.

Bertolini D, Nedwin G, Bringman T, Mundy G. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors. *Nature.* 1986; 319: 516-518.

Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol.* 1993; 64: 474-484.

Brown LJ, Loe H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontol 2000.* 1993; 2: 57-71.

Burger E, van der Meer J, Nijweide P. Osteoclast formation from mononuclear phagocytes: role of bone-forming cells. *J Cell Biol.* 1984; 99: 1901-1906.

Buxton EC, Yao Wei, Lane NE. Changes in serum receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, osteoprotegerin, and interleukin-6 levels in patients with glucocorticoid-induced osteoporosis treated with human parathyroid hormone(1-34). *The Journal of Clinical Endocr Metabol .* 2004; 89: 3332-3336.

Calvi LM, Sims NA, Hunzelman JL, Knight MC, Giovannetti A, Saxton JM, *et al.* Activated parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor in

osteoblastic cells differentially affects cortical and trabecular bone. *J Clin Invest.* 2001; 107: 277-86.

Canalis E, Centrella M, Bach W, McCarthy TL. Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of PTH on bone cell cultures. *J Clin Invest.* 1989; 63: 60-65.

Consensus Report for Periodontal Diseases (CRPD) pathogenesis and microbiol factors. *Ann Periodontol.* 1996; 1: 926-932.

Creemers LB, Jansen ID, Docherty AJ, Reynolds JJ, Beertsen W, Everts V. Gelatinase A (MMP-2) and cysteine proteinases are essential for the degradation of collagen in soft connective tissue. *Matrix Biol.* 1998; 17: 35-46.

Fujihashi K, Beagley KW, Kono Y. Gingival mononuclear cells from chronic inflammatory periodontal tissue produce interleukin (IL)-5 and IL-6, but not IL-2 and IL-4. *Am J Pathol.* 1993; 142: 1239-1250.

Fujihashi K, Yamamoto M, Hiori T, Bamberg TV, Mcghee JR, Kiyono H. Selected Th1 and Th2 cytokine mRNA expression by CD4⁺ cells isolated from inflamed human gingival tissues. *Clin Exp Immunol.* 1996; 103: 422-428.

Gangbar S, Overall CM, McCulloch CAG, Sodek J. Identification of polymorphonuclear leukocyte collagenase and gelatinase activities in mouthrinse: correlation with eriodontal disease activity and juvenile periodontitis. *J Periodont Res.* 1990; 25: 196-202.

Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 1997; 14: 112-143.

Genuth, SM. Endocrine regulation of calcium and phosphate metabolism. *In: R.M. Berne and M.N. Levy, Physiology, St. Louis: Mosby, .848-871, 1998.*

Golub LM, Evans RT, McNamara TF, Lee HM, Ramamurthy NS. A non-antimicrobial tetracycline inhibits gingival matrix metalloproteinases and bone loss in *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in rats. *Ann NY Acad Sci.* 1994; 732: 96-111.

Gowen M, Mundy GR. Actions of recombinant interleukin-1, interleukin-2 and interferon gamma on bone resorption *in vitro*. *Nature.* 1986; 306: 378-380.

Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003; 74: 391-401

Habener JF, Rosenblatt M, Potts Jr JT. Parathyroid Hormone: biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action, and metabolism. *Physiol. Rev.*, 1984; 64: 985-1053.

Harris W. The problem is osteolysis. *Clin Orthoped.* 1995; 311: 46-53.

Hausmann E, Raisz L, Miller WA. Endotoxin: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Science.* 1970; 168: 862-864.

Heath JK, Saklatvala J, Meikle MC, *et al.* Pig interleukin 1 (catabolin) is a potent stimulator of bone resorption *in vitro*. *Calcif Tissue Int.* 1985; 37: 95-97.

Hibbs MS, Hasty KA, Kang AH, Mainardi CL. Secretion collagenolytic enzymes by human polymorphonuclear leucocytes. *J Collagen Rel Res.* 1984; 4: 467-477.

Honig J, Rordorf-Adam, Siegmund C, *et al.* Increase interleukin-1 beta (IL-1 β) concentration in gingival tissue from periodontitis patients. *J Periodontal Res.* 1989; 24: 362-367.

Horwitz MJ, Tedesco MB, Gundberg C, Garcia-Ocana A, Stewart AF. Short-term, high-dose parathyroid hormone-related protein as a skeletal anabolic agent for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88: 569-575.

Howells GL. Cytokine networks in destructive periodontal disease. *Oral Dis.* 1995; 1: 266-270.

Isomäki P, Punnonen J. Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann Med.* 1997; 29: 499-507

Jiang Y, Metha CK, Hsu T, Alsulaimani FH. Bacteria induce osteoclastogenesis via an osteoblast-independent pathway. *Infect Immun.* 2002; 70: 3143-3148.

Kähäri VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med.* 1999; 31: 34-45.

Kalebic T, Garbisa S, Glaser B, Liota LA. Basement membrane collagen : degradation by migrating endothelial cells. *Science.* 1983; 221: 281-283.

Karatzas S, Robledo P, Mitchel P, Tohme Z, Trujillo A, Vandyke T. The effect of matrix metalloproteinases inhibitor on the progression of periodontal disease. *J Dent Res.* 2000; 79, abstract 1588.

Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood.* 1989; 74: 1-10

Kylmaniem M, Oikarinen A, Oikarinen K, Salo T. Effects of dexamethasone and cell proliferation on the expression of matrix metalloproteinases in human mucosal normal and malignant cells. *J Dent Res.* 1996; 75: 919-926.

Kodono H, Kido J, Kataoka M, Yamauchi N, Nagata T. Inhibition of osteoblastic cell differentiation by lipopolysaccharide extract from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 1999; 67: 2841-2846.

Kong Y, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, *et al.* Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature.* 1999; 402: 304-309.

Kurihara N, Bertolii D, Suda T, *et al.* IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol.* 1990; 144: 4226-4230.

Lang NP, Tonetti MS, Suter J, Sorrell J, Duff GW, Kornman KS. Effect of interleukin-1 polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *J Periodont Res* 2000; 35: 102–107.

Liang JD, Hock JM, Sandusky GE, Santerre RF, Onyia JE. Immunohistochemical localization of selected early response gene expressed in trabecular bone of young rat given hPTH 1-34. *Calcif Tissue Int* . 1999; 65: 369-373.

.Littlewood AJ, Russel J, Harvey GR, *et al.* The modulation of expression of IL-6 and its receptor in human osteoblasts *in vitro*. *Endocrinol.* 1991; 129: 1513-1520.

Llavaneras A, Golub LM, Rifkin BR, *et al.* CMT-8/clodronate combination therapy synergistically inhibits alveolar bone loss in LPS-induce periodontitis. *Ann NY Acad Sci.* 1999; 878: 671-674.

Lorenzo JA. The role of cytokines in the regulation of local resorption. *Crit Rev Immunol.* 1991; 11: 195-213.

Mainardi CL, Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM. Purification of a type V collagen degrading enzyme from rabbit alveolar macrophages. *J Collagen Rel Res.* 1984; 4: 479-492.

Mäkelä M, Salo T, Uitto A-J, Larjava H. Matrix Metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res.* 1994; 73: 1397-1406.

Marques MR, Silva MA, Manzi FR, Cesar-Neto JB, Nociti Jr FH, Barros SP. Effect of intermittent PTH administration in the periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. *Arch Oral Biol.* 2005; 50: 421-429.

Martín, KJ, Gonzalez, EA. The Evolution Of Assays For Parathyroid hormone. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2001; 10: 569-574.

Masada MP, Persson M, Kenney JS, *et al.* Measurement of interleukin 1 α and 1 β in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1990; 25: 156-163.

Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Detection of inflammation cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *Immunol.* 1992; 76: 42-47.

McClelland P, Onyia JE, Miles RR, Tu Y, Liang J, Harvey AK, *et al.*, Intermittent administration of parathyroid hormone (1-34) stimulates matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in rat long bone. *J Cell Biochem* 1998; 70: 391-40.

McGeehan GM, Becherer JD, Bast J. Regulation of tumor necrosis factor- α processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature.* 1994; 370: 558-561.

Meikle MC, Atkinson SJ, Ward RV, *et al.* Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and interleukin 1: Evidence that breakdown is mediated by metalloproteinases. *J Periodontal Res.* 1989; 24: 207-213.

Mikin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int.* 1982; 34: 285-290.

Mohan S, Mohan S, Kutilek S, Zhang C, Shen HG, Kodama Y, Srivastava AK, *et al.* Comparison of bone formation responses to parathyroid hormone(1-34), (1-31), and (2-34) in mice. *Bone.* 2000; 27: 471-478.

Moreira PR, de Sá AR, Xavier GM, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO. A functional interleukin-1 beta gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontal Res.* 2005; 40: 306-11

Moriyama H, Huang C, Abramson M, Kato M. Bone resorption factors in chronic otitis media. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1984; 92: 322-328.

Morley P, Whitfield JF, Willick GE. Parathyroid Hormone: An anabolic treatment for osteoporosis. *Curr Pharm Des.* 2001; 8: 671-687.

Murata T, Ansai T, Taehara T, Kobayashi Shaneji T. Extracts of *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* inhibit alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro. *Oral Dis.* 1997; 3: 106-112.

Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases (1997). *Biol Chem.* 1997; 378: 151-160.

Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, *et al.* Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Méd.* 2001; 344: 1434-1441.

Onyia JE, Bidwell J, Herring J, Hulman J, Hock JM. *In vivo*, human parathyroid hormone fragment (hPTH 1-34) transiently stimulates immediate early response gene expression but not proliferation, in trabecular bone cells of young rats. *Bone.* 1995; 17: 479-484.

Pattamapun K, Tiranathanagul S, Yongchaitrakul T, Kuwatanasuchat J, Pavasant P. Activation of MMP-2 by *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal ligament cells. *J Periodont Res.* 2003; 38: 115-121.

Pollock JH, Blaha MJ, Lavish SA, Stevenson S, Greenfield EM. *In vivo* demonstration that parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein stimulate expression by osteoblasts of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor. *J Bone Miner Res.* 1996; 1: 754-759.

Puzas J, Hicks D, Reynolds S, O'Keefe R. Regulation of osteoclastic activity in infection. *Meth Enzymol.* 1994; 236: 47-58.

Raiz LG, Nuki K, Alander CB, Craig RG. Interactions between bacterial endotoxins and other stimulators of bone resorption in organ culture. *J Periodontal Res.* 1981; 16: 1-7.

Ramamurthy NS, Xu J-W, Bird J, Baxter A, Bhogal R, Wills R, *et al.* Inhibition of alveolar bone loss by matrix metalloproteinase inhibitors in experimental periodontal disease. *J Periodont Res.* 2002; 37: 1-7.

Rifas L, Halstead RL, Peck WA, Aviolo LV, Welgus HG. Human osteoblasts *in vitro* secrete tissue inhibitor of metalloproteinases and gelatinase but not interstitial collagenase as major products. *J Clin Invest.* 1989; 84: 686-694.

Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science.* 2000; 289: 1508-1514.

Salo T, Turpeenniemi-Hujanen T, Tryggvason K. Tumor-promoting phorbol esters and cell proliferation stimulate secretion of basement-membrane (type IV) collagen degrading metalloproteinase by human fibroblasts. *J Biol Chem.* 1985; 260: 8526-8531.

Sato T, Ito A, Mori Y. Interleukin 6 enhances the production of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) but not that of matrix metalloproteinases by human fibroblasts. *Biochem J Biophys Res Commun.* 1990; 170: 824-829.

Selvamurugan N, Pulumati MR, Tyson DR, Partridge NC. Parathyroid hormone regulation of the rat collagenase-3 promoter by protein kinase A dependent transactivation of core binding factor alpha1. *J Biol Chem.* 2000; 275: 5037-5042.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang M-S, Luthy R, *et al.* Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997; 89: 309-319.

Sismey-Durrant HJ, Hopps RM. The effect of lipopolysaccharide from *Bacteroides gingivalis* and muramyl dipeptide on osteoblast collagenase release. *Calcif Tiss Int.* 1989; 4: 361-363.

Sokransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: Current concepts. *J Periodontol.* 1992; 63: 322-331.

Spiegel, AM, Marx, SJ. Parathyroid Hormone And Vitamin D Receptors. *Clin Endocrinol Metab.* 1983; 12: 221-241.

Strewler, GJ. Parathyroid Hormone like Protein From Human Renal carcinoma cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone. *J Clin Invest.* 1987; 80: 1803-1807.

Swarthout JT, D'Alonzo RC, Selvamurugan N, Partridge NC. Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene.* 2002; 282: 1-17.

Takahashi K, Takashiba S, Nagai A, Takigawa M, Myoukai F, Kurihara H, *et al.* Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol.* 1994; 65: 147-153.

Thomson B, Mundy G, Chambers T. Tumor necrosis factor alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J Immunol.* 1987; 138: 775-779.

Thomson B, Saklatvala J, Chambers T. Osteoblasts mediate interleukin-1 stimulation of bone resorption by rat osteoclasts. *J Exp Med.* 1986; 164: 104-112.

Tokoro Y, Yamamoto T, Hara K. IL-1 β mRNA as the predominant inflammatory cytokine: transcript: correlation with inflammatory cell infiltration into human gingival. *J Oral Pathol Med.* 1996; 25: 225-231.

Toribio RE, Kohn CW, Capen CC, Rosol TJ. Parathyroid hormone (PTH) secretion, PTH mRNA and calcium-sensing receptor mRNA expression in equine parathyroid cells, and effects of interleukin (IL)-1, IL-6, and tumor necrosis factor-alpha on equine parathyroid cell function. *J Mol Endocrinol.* 2003; 31: 609-620.

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

van Snik J. Interleukin-6: An overview. *Ann Rev Immunol*. 1990; 8: 253-278.

Yamamoto S, Mogi M, Kipara K, Ishihara Y, Ueda N, Amano K, *et al*. Anti-proliferative capsular-like polysaccharide antigen from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* induces apoptotic cell death in mouse osteoblastic MC3T-E1 cells. *J Dent Res*. 1999; 78: 1230-1273.

Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, *et al*. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science*. 1988; 241: 825-828.

Wahl LM, Wahl SM, Mergenhagen SE, Martin GR. Collagenase production by endotoxin activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1974; 71: 4955-4958.

Westerlund U, Ingman T, Lukinmaa PL, Salo T, Kjeldsen L, Borregaard, *et al*. Human neutrophil gelatinase and associated lipocalin in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res*. 1996; 75: 1553-1563.

Whitfield JF, Morley P, Willick GE. Parathyroid Hormone, Its Fragments and Their Analogs for the Treatment of Osteoporosis, *Treatments in Endocrinology*. 2000; 1: 175-190.

Wiebe S, Hafezi M, Sandhu H, Sims Dixon S. Osteoclast activation in inflammatory periodontal disease. *Oral Dis*. 1996; 2: 167-180.

Woessner Jr JF. The matrix metalloproteinase family. In: Parks WC, Mechan RP, editors. *Matrix Metalloproteinase*. 1998; 300-356.

Woodley DT, Kalebic T, Banes RJ, Link W, Pruniers M, Liotta L. Adult human keratinocytes migrating over nonviable dermal collagen produce collagenolytic

enzymes that degrade type I and Type IV collagen. *J Invest Dermatol.* 1987; 86: 418-423.

Zubery Y, Dunstan CR, Story BM, Kesavalu L, Ebersole JL, Holt SC, *et al.* Bone resorption caused by three periodontal pathogens in vivo in mice is mediated in part by prostaglandins. *Infect Immun.* 1998; 66: 4158-4162.

8.0 Anexo