

**UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ**  
**Daher Antonio Queiroz**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ARGINASE NA SALIVA DE  
INDIVÍDUOS SUBMETIDOS A IMPLANTES DENTÁRIOS**

**Taubaté - SP**  
**2008**

**UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ**  
**Daher Antonio Queiroz**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ARGINASE NA SALIVA DE  
INDIVÍDUOS SUBMETIDOS A IMPLANTES DENTÁRIOS**

Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre, pelo Programa de Pós-graduação do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté.

Área de concentração: Prótese dentária

Orientador: Prof. Dr. Wilson Abrão Saad

Co-Orientador: Prof. Dr. José Roberto Cortelli

**Taubaté - SP**

2008

**DAHER ANTONIO QUEIROZ**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ARGINASE NA SALIVA DE INDIVÍDUOS  
SUBMETIDOS A IMPLANTES DENTÁRIOS**

Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre pelo Programa de Pós-graduação do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté.

Área de concentração: Prótese Dentária

Data: \_\_\_\_\_

Resultado: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Universidade de Taubaté

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

***Ao meu pai João Luiz e à minha mãe Mathildes***

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade de Taubaté pela disponibilidade de seus laboratórios para realização deste trabalho.

Aos Prof. Dr. Wilson Abrão Saad e Prof. Dr José Roberto Cortelli, pela orientação, dedicação e desprendimento durante todo o trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica da Unitau, em especial ao Prof. Dr. Edson Rodrigues, pelo extraordinário apoio pessoal.

À Profa. Dra. Ana Christina Claro Neves, pela coordenação e confiança passada durante todo o curso.

À Profa. Dra. Marinella Houlzhauzen, pela ajuda, companheirismo e por todo o conhecimento que me foi passado.

Aos amigos da XIV Turma do Mestrado pelo companheirismo, alegria e pelos momentos inesquecíveis vividos em Taubaté.

Ao professor Rodrigo Ribeiro Rodrigues, do Núcleo de Doenças Infecciosas da UFES, que cedeu o Laboratório para a realização da centrifugação salivar.

Aos colegas Sandro Daroz, Flávio Daroz, Eduardo Perez, Eduardo Battitucci e Fernando Valbão pela ajuda na seleção dos indivíduos da pesquisa.

Aos pacientes que participaram e permitiram a realização desta pesquisa.

## RESUMO

A saliva humana possui diversas enzimas que apresentam atividades específicas e algumas delas podem estar envolvidas no processo inflamatório que acometem os implantes dentários. A arginase é uma enzima hidrolítica que utiliza a L-arginina como substrato para formação da L-ornitina e uréia. Acredita-se que um aumento na produção de arginase possa levar à uma redução na produção de óxido nítrico, consequentemente aumentando a suscetibilidade à infecção bacteriana. Considerando a hipótese de que o número de implantes nos indivíduos e o fumo possam alterar a produção de arginase e que o mesmo é considerado um fator de risco para o sucesso da terapia com implantes, o presente estudo objetivou avaliar o efeito de ambas as variáveis sobre a atividade da arginase salivar (AS) em pacientes portadores de implantes dentários. Amostras de saliva de 102 indivíduos foram coletadas: 26 não-fumantes e sem implantes dentais (A), 28 pacientes com até 4 implantes dentais e não-fumantes (B), 29 pacientes com cinco ou mais implantes dentais e não-fumantes (C), dez fumantes com implantes (D) e nove fumantes sem implantes (E). Os níveis de AS foram expressos em U/mg proteína e determinados por espectrofotometria através da mensuração da L-ornitina e da proteína salivar. Houve um aumento significativo dos níveis de AS no grupo D (64.26) em relação aos grupos A (10.72,  $p=0$ ), B (10.66,  $p=0$ ), C (11.21,  $p=0$ ) e E (13.66,  $p=0$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos A, B, C e E ( $p>0,05$ ). Dentro dos limites do presente estudo, pode-se concluir que a atividade da arginase salivar encontra-se elevada em indivíduos fumantes portadores de implante dentário, sugerindo um possível mecanismo pelo qual o fumo pode levar ao insucesso desta terapia reabilitadora.

**Palavras-chave:** Arginase. Óxido nítrico. Saliva. Implantes dentários. Fumo.

## ABSTRACT

Human saliva possesses many enzymes with activity and some of them might be involved in the inflammatory process of dental implants. Arginase is a hydrolytic enzyme that catalyses L- arginine into ornithine and urea. Its known that a high production of arginase can decreased the production of nitric oxide, consequently leading to bacterial infection susceptibility. To regard the hypothesis of number of implants and smoking might change the production of arginase and considering that smoking is a risk factor of implant therapy, the aim of this study was to evaluate the effect of both on the activity of arginase in saliva of subjects with dental implants. Saliva of 102 subjects were collected: 26 non-smoking and without dental implants (A), 28 with 4 dental implants or less and non-smoking (B), 29 with five dental implants or more and non-smoking (C), ten smokers with implants (D) and nine smokers and without dental implants (E). The arginase levels were expressed in U/mg and analyzed by spectrophotometry and it was determined by measuring the L-ornithine formation from L-arginine. The result showed that the mean values of arginase in group D (64.26) were statistically different among groups A (10.72,  $p=0$ ), B (10.66,  $p=0$ ), C (11.21,  $p=0$ ) e D (13.66,  $p=0$ ). There was no statistically difference among groups A, B, C and E ( $p>0,05$ ). By the limits of the present study, it can be concluded that arginase activity shown higher in subjects smokers with dental implants, suggesting a possible mechanism that smoke may lead to unsuccess of this rehabilitation therapy.

**Key words:** Arginase. Nitric oxide. Saliva. Dental implants. Smoke.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>8</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>12</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO</b>	<b>23</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>24</b>
4.1 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	24
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	25
4.3 COLETA DA SALIVA	26
4.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA	26
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>29</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>31</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>39</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A ausência de dentes é um problema que afeta grande parte da população, fazendo com que a mesma necessite de tratamento reabilitador protético. Dentre os meios existentes para devolver dentes aos indivíduos, o tratamento com o uso de implantes dentários é a forma mais natural, ou seja, que melhor mimetiza a situação real do dentes e mais previsível que podemos oferecer aos pacientes. Contudo, a colocação de implantes é um procedimento delicado e que exige técnica cuidadosa para sua execução. Necessita de bom diagnóstico, plano de tratamento e terapia prévia à sua colocação, prevenindo os riscos de futura falha ou perda deles (STEENBERGHE; QUIRYNEN, 1993).

E um desses fatores para a prevenção de uma futura perda dos implantes está relacionada ao tabagismo. Muitos indivíduos fumantes também necessitam de tratamento reabilitador protético com implantes dentários. O hábito de fumar tem sido mencionado em diversos trabalhos científicos como fator de risco primário para a saúde em geral (Strietzel et al., 2007). Ele tem um efeito imunossupressor e pode interferir significativamente no equilíbrio entre a microbiota indígena nos implantes e dentes naturais, assim como na resposta imunológica causando menor produção de anticorpos, favorecendo a adesão bacteriana e ao crescimento de uma flora anaeróbica no sulco dentário e periimplantar. Além do hábito de fumar, Lindquist, Carlsson e Jemt (1997) mencionam que os fatores mais importantes para o prognóstico deste tipo de tratamento são as placas bacterianas indutoras de inflamação e as cargas oclusais submetidas as próteses sobre implantes.

Diversos parâmetros clínicos e radiográficos têm sido utilizados no intuito de se fazer um diagnóstico precoce de doença periodontal e periimplantar. Dentre algumas condições em comum, podemos comparar dentes com implantes em relação à longevidade, dor, mobilidade, perda de crista óssea, tecido queratinizado, profundidade de sondagem e índice de sangramento gengival. Porém, esses parâmetros são limitados, pois não indicam atividade da doença naquele determinado momento e ainda, não são indicativos de uma futura progressão da doença naquele local. (HAFFAJE; SOCRANSKY; GOODSON, 1983)

Grande relevância tem sido dada para análise microbiológica, análise do fluido gengival e análise da saliva com o objetivo de entender melhor o processo de instalação e progressão de doenças. A saliva contém produtos derivados tanto do hospedeiro como dos microrganismos. Alguns estudos vêm sendo realizados para avaliar se a atividade de algumas enzimas presentes na saliva, pode funcionar como marcadores que revelem a extensão da doença periodontal e que sirva como preditores de futura progressão da doença. Portanto o estudo destas atividades enzimáticas, pode ser importante também, na observação de tratamentos com implantes dentários. Já que vários indicadores de saúde dentária foram adaptados para os implantes dentários.

Algumas enzimas presentes na saliva ajudam no diagnóstico, e podem de alguma forma, contribuir no processo de destruição tecidual, assim como ter um papel protetor ao hospedeiro. A análise de tais enzimas pode servir como subsídio para um diagnóstico precoce e para compreender melhor todo o processo após a instalação de implantes dentários.

A arginase é uma enzima hidrolítica do ciclo da uréia, responsável por converter L-arginina em uréia e ornitina (KOSSEL; DAKIN, 1904). A arginase vem

sendo estudada como marcador bioquímico em glândulas salivares de ratos desde 1959 (SHAFER; CLARK; MUHLER, 1959). O ciclo da uréia é uma via metabólica essencial para eliminação de íons de amônia que são altamente tóxicos ao organismo humano (GUOYAO; MORRIS, 1998). Segundo Jenkison, Grody e Cederbaum (1996), o ciclo da uréia tem uma função de suporte de vida por remover produtos tóxicos do organismo.

A arginase é uma das cinco enzimas chave do ciclo da uréia e a única capaz de completar tal ciclo. É encontrada principalmente no fígado humano, mas também pode ser encontrada em outros tecidos não hepáticos como em glândulas salivares. As funções metabólicas da arginase na saliva ainda não estão bem definidas (HRABAK et al., 1996).

O óxido nítrico é um radical livre, também produzido pela L-arginina sob a ação de uma isoenzima denominada óxido nítrico sintetase (NOS). Três diferentes formas de NOS são conhecidas: NOS endotelial, NOS neuronal e NOS induzida. A NOS induzida é a de maior importância, é ativada pelo sistema imunológico em resposta a estímulos inflamatórios incluindo citocinas como gama interferon e lipopolissacarídeo bacteriano (NATHAN, 1997). Foi identificada em macrófagos e neutrófilos (KENDALL; MARSHAL; BARTOLD, 2001).

Diversas funções fisiológicas e patológicas são atribuídas ao óxido nítrico incluindo vasodilatação, controle da pressão arterial, modulação da neurotransmissão, inibição do crescimento de células microbianas e tumorais, regulação da migração leucocitária e inibição da produção de superóxido (MICHEL; FERON, 1997).

O óxido nítrico produzido localmente pode agir como molécula citotóxica contra células infectadas por fungos, protozoários e bactérias, assim como células

tumorais e células próximas ao seu local de produção, possivelmente resultando em destruição tecidual. (KRONCKE; FEHSEL; KOLB-BACHOFEN, 1997). Segundo Akopov e Kankanian (1996), o óxido nítrico é produzido em resposta a patógenos periodontais e em resposta a alterações inflamatórias locais. Por ter uma atividade antimicrobiana, é considerada uma importante molécula na defesa contra algumas infecções.

Tendo em vista que a L-arginina é utilizada como substrato pela arginase e pela enzima óxido nítrico sintetase, a arginase pode reduzir a produção de óxido nítrico pela utilização de um substrato comum, a L-arginina. Logo, o objetivo deste estudo será avaliar a atividade da arginase na saliva de indivíduos submetidos a tratamento reabilitador protético com implantes dentários, tentando verificar a possível existência de um marcador bioquímico. Dessa forma, foi observado duas variáveis neste estudo, tais como, o número de implantes e o fator fumo.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Shafer, Clark e Muhler (1959) analisaram o efeito de enzimas salivares sob a influência de disfunções endócrinas em ratos, relatando que a atividade da arginase não é influenciada sob estímulo da pilorcapina, substância capaz de aumentar o volume salivar. Os autores sugeriram que a arginase é proveniente de células acinares.

Gopalakrishna e Nagarajan (1978) analisaram bioquimicamente a atividade da arginase na saliva e sugeriram que esta enzima possui alguma função fisiológica. Segundo os autores a atividade dessa enzima na saliva humana é de quatro a seis vezes maior que no sangue.

Agarwal, Agarwal e Agarwal (1984) analisaram a concentração de proteínas e a atividade da arginase em 94 crianças, das quais 52 sofriam de mal-nutrição protéica e 42 eram saudáveis. Diante dos resultados obtidos, observaram que ocorreu queda progressiva na atividade arginólítica e nos níveis de proteínas salivares com o aumento da gravidade da mal-nutrição protéica.

Konarska et al. (1985) avaliaram a presença da arginase em pacientes saudáveis e em crianças com argininaemia. Não houve diferença significativa na atividade da arginase em adultos e crianças. Os autores relataram que ela é uma enzima magnésio dependente e possui as mesmas propriedades da arginase hepática e plasma sanguíneo.

Para Smith e Camp (1993), dos componentes orgânicos, os mais importantes são as proteínas que existem na concentração de 200mg por 100ml do fluido, o que

corresponde a cerca de 3% da concentração encontrada no plasma. Incluem enzimas, imunoglobulinas, glicoproteínas, albumina e outros oligo e polipeptídeos. O fluido crevicular gengival tem um grande número de componentes protéicos, cujas funções aí no sulco gengival não estão ainda bem elucidadas.

Enwonwu, Ilupeju e Warren (1994) analisaram os efeitos de uma dieta deficiente em proteína na atividade arginínolítica em glândulas submandibulares de ratos, e também a concentração de aminoácidos, particularmente a arginina. Diante dos resultados, observaram que deficiência protéica produz reduções significantes nos níveis de muitos aminoácidos, com exceção da arginina, onde houve um crescimento substancial.

Jenkinson, Grody e Cederbaum (1996), em revisão de literatura, analisaram as propriedades da arginase. Os autores mostraram a importância da arginase no ciclo da uréia, que é uma via metabólica essencial para eliminação de íons de amônia do corpo. A arginase é encontrada principalmente no fígado, mas também é encontrada em outros tecidos extra-hepáticos. A função desta enzima na saliva ainda não está estabelecida.

Hrabak et al. (1996) analisaram o efeito do nitrito, um produto estável da formação do óxido nítrico na atividade da arginase. Para isso, os autores utilizaram macrófagos que receberam nitrito de sódio. Os macrófagos foram isolados de ratos. A atividade da arginase foi medida pela produção de uréia. Os autores concluíram que o nitrito inibe a atividade da arginase embora o mecanismo desta inibição não seja bem compreendido.

Boutros et al. (1996), em estudo longitudinal, compararam o nível de enzimas no fluido crevicular gengival entre dentes naturais e implantes osseointegrados e implantes com fracassos. Através do uso de filtros de papéis absorventes mediram

os níveis de protease neutra, elastase, do neutrófilo, mieloperoxidase e  $\beta$ -glucuronidase. Todas as enzimas tiveram o seu nível aumentado em doença periodontal e nos implantes fracassados, comparados com os implantes osseointegrados. Apesar de constatado aumento dessas enzimas nos implantes fracassados, futuros estudos longitudinais deverão ser feitos para confirmar a utilidade da dosagem dessas enzimas na previsão de fracassos dos implantes.

Fang (1997) revisou as evidências da ação antimicrobiana do óxido nítrico e seus possíveis mecanismos de ação. A produção de óxido nítrico aumenta tanto em modelos animais como em humanos com infecção. A inibição ou inativação da enzima óxido nítrico sintetase potencializa a proliferação microbiana em macrófagos infectados em animais experimentais, *in vitro*. Doadores de óxido nítrico possuem atividade antimicrobiana. O óxido nítrico parece ter um papel importante na defesa do organismo contra patógenos, podendo agir causando dano ao DNA, proteínas e lipídeos microbianos. O óxido nítrico age sobre diversos microrganismos incluindo vírus, bactérias e fungos.

Wheeler et al. (1997) avaliaram se a infecção bacteriana induziria a atividade da enzima óxido nítrico sintetase em neutrófilos humanos. A atividade da iNOS foi avaliada em neutrófilos de indivíduos com infecção no trato urinário e comparados com neutrófilos de um grupo controle sem infecção. Os resultados mostraram aumento na atividade da iNOS em neutrófilos de indivíduos com infecção do trato urinário.

Segundo Aboyoussef et al. (1998), comparando o fluido crevicular nos pacientes com implantes osseointegrados bem sucedidos com o fluido crevicular gengival de dentes naturais, não existem diferenças significativas na composição dos dois fluidos. Eles ainda detectaram a presença de prostaglandinas E2 e

metaloproteinases no fluido crevicular de implantes que exibiam periimplantite com perda óssea ao redor dos implantes.

Em uma revisão de literatura, analisando as funções fisiológicas do óxido nítrico, Queiroz e Batista (1999), mostraram o óxido nítrico como um neurotransmissor, porém, a função exata do óxido nítrico na fisiologia do cérebro é controversa. Os autores sugeriram que embora este gás desempenhe uma função na memória e no aprendizado, este papel ainda está sob investigação. Os autores mostraram também o óxido nítrico como regulador da pressão arterial, sendo este controle realizado a partir da produção de óxido nítrico nas células endoteliais. O óxido nítrico faz vasodilatação. E, por último, os autores mostraram o óxido nítrico como molécula citotóxica e concluíram que grande número de doenças podem estar relacionadas a um alto ou baixo nível de óxido nítrico no organismo.

Ozmeriç, Elgun e Uraz (2000) avaliaram a atividade da arginase salivar em pacientes com periodontite do adulto e esclareceram os mecanismos da possível contribuição para o processo da doença. Para isso, 35 indivíduos com idade média de 46,1 anos, sendo vinte com periodontite do adulto e 15 saudáveis foram selecionados. A doença periodontal foi avaliada através de índice de placa, índice gengival, profundidade de bolsa e nível clínico de inserção. Saliva destes indivíduos foi coletada e a atividade da arginase salivar foi medida assim como a quantidade total de proteínas. A atividade da arginase encontrou-se aumentada no grupo com periodontite do adulto quando comparado ao grupo controle. Não foi observada correlação entre a quantidade de arginase e o total de proteínas. Os autores concluíram, então, que o processo arginina - NO está envolvido no processo da doença periodontal.



Fiorellini et al. (2000) estudaram a correlação da saúde periimplantar e os níveis de aspartato aminotransferase e concluíram que o aumento de aspartato aminotransferase estava relacionado com o aumento do sangramento gengival e da profundidade à sondagem, semelhante ao que acontece da doença periodontal.

Hultin et al. (2000) observaram em estudo longitudinal de cinco anos, o sucesso de tratamentos com implantes dentários em 143 pacientes, levando-se em conta a perda da prótese fixa e a perda óssea ao redor dos implantes. As próteses encontravam-se com cinco anos em função e a perda óssea foi comparada a dentição natural através de radiografias. Concluíram que nenhuma correlação foi encontrada entre dentes e implantes em relação a perda óssea. E sete das nove próteses fixas perdidas, foram de pacientes fumantes.

Aurer et al. (2001) avaliaram a atividade da enzima óxido nítrico sintetase em indivíduos com doença periodontal. Para isso, os autores analisaram a concentração de nitrito, que é um metabólito estável do óxido nítrico, em 25 indivíduos com periodontite agressiva, 25 com periodontite crônica, e 25 indivíduos saudáveis. As concentrações de nitrito foram determinadas pela reação de Griess. A doença periodontal foi medida através da perda de inserção. Os indivíduos com periodontite apresentaram menor concentração de nitrito que os indivíduos saudáveis. Indivíduos com periodontite agressiva apresentaram menor concentração de nitrito que os indivíduos com periodontite crônica. Então, indivíduos com periodontite apresentaram diminuição na produção local de óxido nítrico e esse efeito foi mais pronunciado nos indivíduos com os tipos mais graves de doença.

Schubert et al. (2001) analisaram amostras de fluido periimplantar e de fluido crevicular gengival para comparar os níveis de  $\beta$  glucoronidase de ambos os sítios e

concluíram que não havia diferença significativa nos níveis de  $\beta$  glucuronidase encontrada nos implantes e nos dentes naturais.

Shibata et al. (2001) avaliaram a atividade da enzima óxido nítrico sintetase em neutrófilos de indivíduos com periodontite agressiva e a atividade desta enzima na quimiotaxia de neutrófilos. Os resultados obtidos sugerem que NOS está presente em neutrófilos humanos e pode estar envolvido na quimiotaxia de neutrófilos. A atividade da enzima NOS foi mais acentuada em indivíduos com periodontite agressiva quando comparados a indivíduos saudáveis.

Kendall, Marshall e Bartold (2001) realizaram uma revisão de literatura para avaliar o envolvimento do óxido nítrico na destruição tecidual, com ênfase na doença periodontal. Os autores concluíram que na doença periodontal há aumento na produção de óxido nítrico com duração prolongada, principalmente em macrófagos, linfócitos e neutrófilos. Há também aumento na expressão de L-arginina que serve como substrato para produção de óxido nítrico.

Hirose et al. (2001) avaliaram a expressão de citocinas e da enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) em tecido gengival inflamado. A expressão de RNA mensageiro das citocinas e da iNOS em tecidos sadios e inflamados foi determinado pelo uso do método de reação em cadeia da polimerase (PCR). As amostras de tecido gengival e placa subgengival foram obtidas de 22 indivíduos com periodontite crônica e de oito indivíduos com periodonto saudável. Os resultados mostraram maior expressão de IL-6 e iNOS em lesões periodontais quando comparados a tecidos saudáveis. Nos sítios com sangramento a sondagem apurou-se uma maior expressão de IL-6 e iNOS. A expressão de IL-1 e IL-8 aumentaram, mas a expressão de IL-10 diminuiu nos sítios onde *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foi detectado. Não houve correlação da expressão de

citocinas e iNOS e infecção por *Porphyromonas gingivalis*. Os autores concluíram que a expressão de IL-6 pode refletir inflamação do tecido gengival e que iNOS pode estar envolvido no processo inflamatório da periodontite.

Batista et al. (2002) avaliaram a atividade da iNOS em indivíduos com doença periodontal. No intuito de caracterizar a presença de óxido nítrico na doença periodontal os autores quantificaram as células positivas para a enzima óxido nítrico sintetase em amostras de gengiva clinicamente saudável, com gengivite induzida por placa e com periodontite crônica localizada utilizando método imunohistoquímico. As amostras incluíam 19 casos diagnosticados como periodontite crônica localizada, 19 casos de gengivite induzida por placa sem perda de inserção obtida de pacientes submetidos à cirurgia periodontal, e 13 casos de gengiva clinicamente saudável obtidos de extração de pré-molares para ortodontia ou de terceiros molares inclusos. Um aumento significativo no número de células positivas para óxido nítrico sintetase foi encontrado nos grupos com gengivite e com periodontite comparados com o grupo controle. Em todos os grupos a maior parte das células polimorfonucleares apresentou uma intensa imuno-reação para óxido nítrico sintetase independente do estágio da doença.

Uitto (2003) relatou que os componentes humorais e celulares do sangue podem chegar às superfícies dental e epitelial na boca através do fluxo de fluido que atravessam o epitélio juncional da gengiva. Esse fluido que transuda através do epitélio gengival e é lançado no sulco gengival ou crevicular recebe o nome fluido gengival ou fluido crevicular gengival.

Gyurko et al. (2003) avaliaram a contribuição do óxido nítrico na defesa do hospedeiro contra infecções causadas por *Porphyromonas gingivalis*. Para isso, os autores fizeram inoculação subcutânea de *Porphyromonas gingivalis* em ratos e

analisaram as alterações nos níveis de óxido nítrico sintetase induzida. No grupo de ratos que receberam *Porphyromonas. gingivalis* houve aumento na atividade da enzima óxido nítrico sintetase. Em outro grupo de ratos além da inoculação de *Porphyromonas gingivalis* a enzima óxido nítrico sintetase foi inibida. Estes ratos apresentaram lesões cutâneas. Os autores concluíram que o óxido nítrico é um elemento importante na defesa contra *Porphyromonas gingivalis*

Ozmeriç (2004) realizou uma revisão de literatura sobre marcadores da doença periodontal utilizando o fluido crevicular gengival e a saliva, e sugeriu que ambos podem ser utilizados no diagnóstico e prognóstico. Diante dos achados, existem evidências que o caminho do óxido nítrico está relacionado com a doença periodontal, e sugere que estudos sejam realizados para avaliação desses marcadores na doença periodontal.

Moinard, Cynober e Bandt (2005) estudaram o metabolismo e implicações da poliaminas nas doenças humanas. Observaram que as poliaminas estão envolvidas na diferenciação de células de defesa e na regulação da reação inflamatória. No curso da inflamação local, a ativação de óxido nítrico sintetase (NOS) diante uma injúria pode favorecer a acumulação local de células fagocitárias. A ativação e subsequente morte de macrófagos podem ser responsáveis pela liberação de arginase induzindo localmente a quebra de arginina extracelular em ornitina. Uma acumulação secundária do aminoácido ornitina é disponibilizada para linfócitos e fibroblastos, possibilitando proliferação celular via síntese de poliaminas e síntese de colágeno via síntese de prolinas.

Herman e Moncada (2005) demonstraram em seu estudo que hipercolesteromia, hipertensão, diabetes e o tabagismo são fatores de risco para aterosclerose. Essas condições estão associadas a reduções nos níveis de óxido

nítrico. Diante disso, realizaram uma revisão de literatura sobre os benefícios terapêuticos de drogas doadoras de óxido nítrico ou que aumentem a disponibilidade do óxido nítrico endógeno, tais como estatinas e L-arginina. Sabendo-se que sob condições normais, baixas concentrações de óxido nítrico estão envolvidas nas funções fisiológicas, o que inclui regulação da pressão e circulação sanguínea, e na agregação plaquetária. E que sob condições patológicas, todavia, altas concentrações irão gerar potencial antibacteriano, antiparasita, tumoricida e antiviral, observaram que tratamentos com L-arginina diminuem o crescimento de lesões ateroscleróticas.

Gullu et al. (2005) avaliaram a efetividade de raspagem e alisamento radicular em relação ao procedimento cirúrgico periodontal denominado Retalho de Widman Modificado na atividade da arginase e da enzima óxido nítrico sintetase em indivíduos com periodontite crônica. O estudo incluiu 13 indivíduos com periodontite crônica. Defeitos ósseos 7mm ou mais de perda de inserção foram tratados com raspagem e alisamento radicular ou Retalho de Widman Modificado. Biópsia foi feita em ambos os casos. A avaliação da enzima óxido nítrico sintetase foi feita por método imunohistoquímico e a arginase foi analisada por espectrofotometria. O tecido periodontal inflamado demonstrou alta expressão da iNOS antes do tratamento e diminuiu após tratamento. A expressão da iNOS foi maior no grupo que recebeu raspagem e alisamento radicular quando comparado ao grupo que recebeu Retalho de Widman Modificado. A atividade da arginase aumentou em ambos os grupos após terapia periodontal.

Hrabak, Bajor e Csuk (2006) avaliaram o efeito de diferentes estímulos inflamatórios na atividade da arginase e do óxido nítrico sintetase. Para isso, macrófagos foram isolados de ratos. Os agentes antiinflamatórios utilizados foram

caseína, tioglicolato, vacina BCG e vacina NDV (Newcastle Disease Vírus). A atividade da arginase foi medida pela formação de uréia. Os resultados mostraram que diferentes estímulos inflamatórios aumentam a atividade da arginase e da enzima óxido nítrico sintetase. A caseína induziu ambas as enzimas, a vacina NDV induziu principalmente a óxido nítrico sintetase, enquanto o tioglicolato induziu principalmente a arginase. Os autores concluíram que a atividade das enzimas está relacionada ao tipo de estímulo inflamatório.

Huynh e Dusting (2006), em uma revisão de literatura, mostraram a ação da arginase e do óxido nítrico na saúde vascular. O óxido nítrico age contra doenças vasculares promovendo uma potente vasodilatação, além de ter propriedades antiinflamatórias, antitrombolíticas e inibe a adesão plaquetária ao endotélio assim como diminui a adesão e migração leucocitária. A arginase já foi identificada em células endoteliais. Em vários modelos de hipertensão a atividade da arginase encontrou-se aumentada com diminuição na produção de óxido nítrico.

Ugar-Çankal e Ozmeriç (2006) estudaram através de revisão de literatura os benefícios e a destruição proporcionada pelos efeitos do óxido nítrico nas doenças periodontais, nos dentes e nas áreas maxilo-faciais. Os autores relataram que quantidades excessivas de óxido nítrico contribuem para destruição tecidual e que o crescimento da atividade argininolítica em periodontite acontece devido ao decréscimo de síntese de óxido nítrico, que leva a diminuição das propriedades antibacterianas na saliva. Ambos, arginase e óxido nítrico sintetase, estão envolvidos no processo de doença, pois utilizam um substrato comum.

Sunitha e Shanmugam (2006) avaliaram os níveis de óxido nítrico em pacientes com doenças na mucosa oral, e para isso dividiram os pacientes em grupo controle com pacientes saudáveis e outro grupo com pacientes que possuíam líquen

plano e um terceiro grupo com pacientes portadores de úlcera aftosa. E observou que, diante dos resultados, o grupo controle foi significativamente diferente em relação aos outros dois grupos. Enquanto que os resultados do grupo três foi significativamente menor que o grupo dois. Portanto o estudo sugere que o excesso de óxido nítrico salivar está relacionado na fisiopatologia dessas lesões.

Bergeron et al. (2007) investigaram a expressão da arginase I, ornitina descarboxilase e óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) nas vias aéreas de asmáticos fumantes e não fumantes e após estimulação de nicotina *in vitro*. Demonstrou que houve um aumento na atividade da arginase nos fumantes asmáticos em relação aos não fumantes. E não houve diferenças significativas para iNOS entre os grupos.

Strietzel et al. (2007) realizaram uma revisão de literatura para investigar se o tabagismo interfere no prognóstico de implantes dentais. O estudo revelou significantes riscos de falhas de implantes e complicações biológicas entre os fumantes, concluindo-se que fumar é um fator de risco significativo para terapia com implantes dentais.

Gheren et al. (2008) avaliaram a saliva de 18 indivíduos com periodontite crônica e 18 com periodonto saudável. Os autores observaram que a atividade da enzima arginase encontrou-se aumentada em indivíduos com doença periodontal e esta atividade parece estar relacionada à gravidade da doença. E trinta dias após tratamento periodontal a atividade da arginase foi reduzida.

### **3 PROPOSIÇÃO**

O objetivo geral deste estudo foi avaliar bioquimicamente a atividade da arginase na saliva de indivíduos portadores de próteses sobre implantes osseointegrados. Em adição, foram inseridas duas variáveis a proposta geral, avaliou-se a interferência do número de implantes existentes na cavidade bucal e o fator tabagismo na atividade desta enzima.



## 4 MATERIAL E MÉTODO

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Taubaté e aprovada sob o protocolo número 0289/07. Todos os indivíduos que participaram desta pesquisa foram informados dos procedimentos, objetivos da mesma, e preencheram termo de consentimento livre e esclarecido.

Para estabelecimento do número de indivíduos inseridos no presente estudo, foi aplicado um teste para cálculo de amostra com auxílio do software Bio Estat 2.0. Para tanto, foi realizado um estudo piloto, constituído de cinco indivíduos sem implantes, que tiveram a concentração de arginase quantificada. O teste t para amostras independentes foi aplicado nos resultados obtidos, indicando o número de indivíduos que deveria compor o estudo. Os participantes do estudo foram alocados de um total de quatrocentos indivíduos elegíveis, provenientes da clínica de Implantodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de Taubaté.

Dessa forma, amostras de saliva de 102 indivíduos foram coletadas assim distribuídos: 26 indivíduos dentados nunca-fumantes **(A)**, 28 indivíduos com até quatro implantes dentários em função e nunca-fumantes **(B)**, 29 indivíduos com cinco ou mais implantes dentários em função e nunca-fumantes **(C)**, dez indivíduos com implantes dentários e fumantes ativos **(D)** e finalmente nove indivíduos dentados e fumantes ativos **(E)**.

### 4.1 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos os indivíduos que haviam utilizado via oral antiinflamatório, antibiótico, imunossupressores e contraceptivos sistêmicos nos seis meses antecedentes ao início do estudo (OZMERIÇ; ELGUN; URAZ, 2000). E indivíduos com sangramento à sondagem, e com profundidade a sondagem maior que 4mm tanto para análise dental quanto implantar.

#### 4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Nos grupos **B**, **C** e **D**, os indivíduos deveriam ser portadores de próteses sobre implantes instaladas a pelo menos um ano. Já nos grupos **A** e **E**, os indivíduos deveriam não ser usuários de implantes dentários.

Todos os indivíduos possuíam boas condições de saúde bucal, ou seja, ausência de doenças, tais como, mucosites, úlcera aftosa, líquen plano, doenças periodontais e periimplantares. Assim como, sem história pregressa de alguma condição patológica crônica.

Para estabelecer o diagnóstico periodontal, utilizou-se o protocolo estabelecido por Ainamo e Bay (1975), onde um único examinador treinado e calibrado avaliou o nível de inserção clínica e profundidade de sulco de todos os dentes com auxílio de sonda periodontal da marca comercial Hu Friedy. Todos os indivíduos com ausência de sítios com profundidade de bolsa maior que 4mm foram incluídos no presente estudo, assim como ausência de sangramento gengival a sondagem.

Para a avaliação da condição clínica dos implantes dentários, foram incluídos apenas indivíduos que exibiram profundidade do sulco de 4mm ou menos, sem sangramento a sondagem e sem supuração (MOMBELLI; LANG, 1994).

Para os indivíduos fumantes foi definido como fumante ativo o uso de mais que dez cigarros por dia e com história pregressa de ser fumante por no mínimo dez anos. Para os não fumantes, o critério é que os indivíduos não tivessem feito uso do fumo.

#### 4.3 COLETA DE SALIVA

Os participantes do presente estudo foram orientados a lavar a cavidade bucal com água destilada no momento que antecedeu a coleta (OZMERIÇ; ELGUN; URAZ, 2000). Saliva foi coletada sob estímulo de mastigação com tabletes de parafina e posteriormente filtrada em gaze para obtenção de volume final aproximado de 2mL. As amostras de saliva obtidas nesta etapa foram mantidas em isopor de gelo até o término de todas as coletas e então centrifugadas, congeladas e armazenadas para posterior análise bioquímica. A coleta de saliva de todos os grupos foram em um único momento.

#### 4.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA

As amostras de saliva foram centrifugadas a 10.000xg, sob refrigeração a 4°C, durante dez minutos e os sobrenadantes separados e utilizados para determinação das atividades arginínolíticas. A atividade da arginase salivar foi determinada pela quantidade de L-ornitina formada como descrito por Chinard (1952). Alíquotas de saliva, previamente diluídas 1:5 em solução fisiológica, foram incubadas a 37°C em sistema de reação contendo tampão carbonato 240mM, L-arginina 100mM e MnCl<sub>2</sub> 5mM, em pH 9,8. O volume final do meio de reação foi de 0,5mL e a reação foi interrompida, após quarenta minutos, pela adição de 1,5mL de ácido acético glacial. A L-ornitina formada foi quantificada pela adição de 0,5mL de reativo de cor contendo: 0,2mL de ácido fosfórico 6M, 0,3mL de ácido acético glacial e 12,5mg de ninhydrina, mantidos em banho Maria fervente (100°C) durante 1h, arrefecidos em água corrente e levados para leitura espectrofotométrica em 515nm, como descrito por Chinard (1952). A atividade arginínolítica foi expressa em Unidade Internacional por miligrama de proteína salivar (mUI/mg proteína). Uma Unidade Internacional foi definida como a quantidade de arginase que catalisa a hidrólise de 1mol de L-arginina em L-ornitina no tempo de um minuto, a 37°C. A proteína salivar foi determinada pelo método de Bradford (1976).

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças das variáveis, número de implantes, hábito de fumar e níveis salivares de arginase encontradas entre os indivíduos dos grupos **A**, **B**, **C**, **D** e **E** foram estatisticamente tratados com auxílio de softwares específicos e com

significância de 95% ( $p < 0,05$ ). Para tanto, realizou-se uma análise de variância para comparação entre os grupos, e diante de diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) entre grupos, utilizou-se o *Teste Student t*.

## 5 RESULTADOS

Diante de uma população de 102 indivíduos, sendo 34 do sexo masculino e 68 do sexo feminino e com idade média de 44 anos (Figura 1), foram realizadas as análises estatísticas da arginase salivar entre os grupos em relação as variáveis já citadas. Para tanto, realizou-se uma análise de variância para comparação entre os grupos, e diante de diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) entre grupos, utilizou-se o *Teste Student t*.

Em relação a variável número de implantes, não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os grupos **A** (não-fumantes e sem implantes dentários) em relação aos grupos **B** (indivíduos com até quatro implantes dentários e não-fumantes) e **C** (indivíduos com cinco ou mais implantes dentários e não-fumantes). (Figura 2)

Em relação ao hábito de fumar, houve uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) da atividade arginínolítica quando os grupos **A**, **B**, **C** e **E** foram comparados ao grupo **D**. A atividade da arginase apresentou-se aumentada no grupo **D** comparada aos grupos restantes. (Figura 2)

**Distribuição da população estudada de acordo com gênero, idade e hábito de fumar**

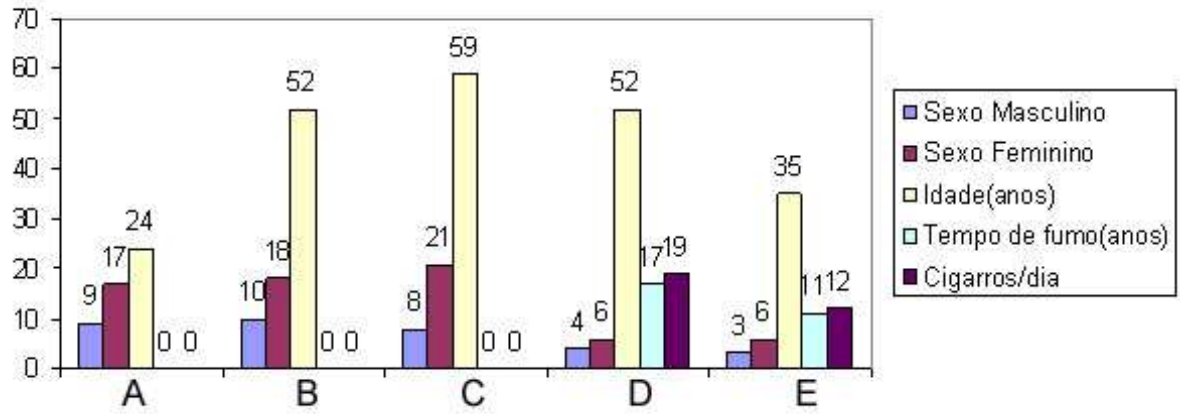
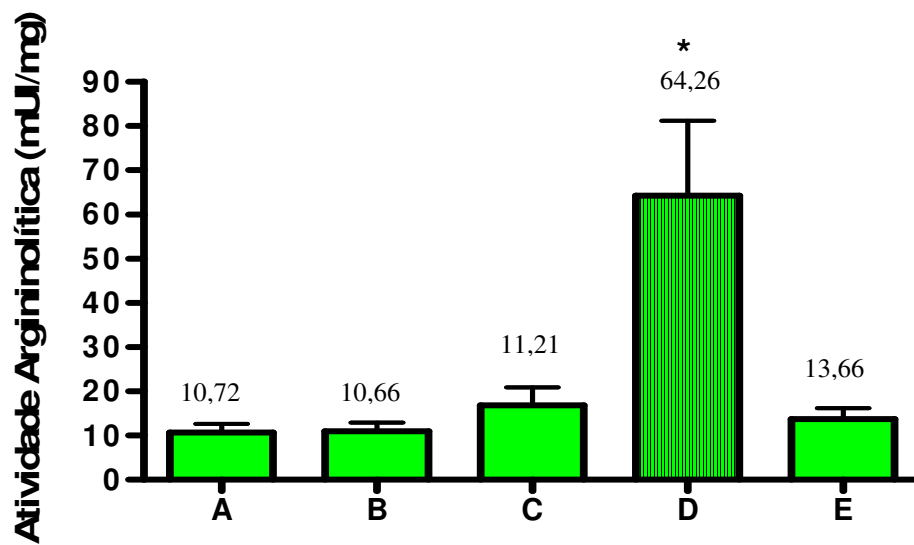


Figura 1 – Características dos sujeitos de pesquisa



\* - Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) em relação aos demais grupos.

Figura 2 – Médias da atividade arginolítica (mUI/mg)

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou comparar a atividade da arginase em indivíduos portadores de prótese sobre implantes dentários e tentar observar a possibilidade de existência de um marcador bioquímico como meio diagnóstico de inflamação nestas condições. O estudo observou duas variáveis nesses indivíduos, o fumo e o número de implantes nos sujeitos de pesquisa.

Segundo Tanke (2007), descobertas de novos testes diagnósticos não invasivos e terapêuticos para doenças cardiovasculares, diabetes, doenças neurodegenerativas (Alzheimer e Parkinson) e cânceres estão tendo grandes avanços. Para Smith e Camp (1993), as proteínas que existem no fluido salivar, correspondem à cerca de 3% da concentração encontrada no plasma. Tendo em vista os avanços tecnológicos na pesquisa apontados por Tanke (2007), o presente estudo começa a traçar formas para testes diagnósticos na área odontológica, com a determinação de um marcador bioquímico da inflamação, a arginase salivar.

Estudos semelhantes ao aqui proposto, como os dos autores Aboyoussef et al. (1998), Boutros et al. (1996), Fiorellini et al. (2000) e Schubert et al. (2001), estudaram diferentes marcadores bioquímicos na saliva de pacientes com implantes dentários comparando com dentes naturais, com o intuito de verificar um meio diagnóstico. Como pode ser observado, são escassas as informações sobre a saliva como meio diagnóstico em pacientes com implantes dentários e, tendo em vista uns estresses físicos e psíquicos, que poderiam influenciar a secreção de algumas enzimas, dentre elas a arginase, fez-se interessante investigar a quantidade dessa enzima na saliva de pacientes que possuem implantes dentários. Apesar de poucas



informações sobre marcadores bioquímicos da inflamação de tecidos periimplantares, é importante ressaltar que eles são de grande relevância no monitoramento durante a fase da terapia com este tratamento.

A arginase utiliza a L-arginina como substrato para formação de uréia e ornitina. A enzima óxido nítrico sintetase também utiliza a L-arginina como substrato para produção de óxido nítrico (NO). As enzimas arginase e óxido nítrico sintetase competem, portanto, por um substrato comum, a L-arginina. A arginase existe em duas isoformas: o tipo I, que é uma proteína citoplasmática, expressa principalmente no fígado, e o tipo II, que é mitocondrial e expressa em vários tecidos extra-hepáticos, principalmente o rim e a próstata. A arginase pode ser expressa em vários tecidos e tipos de células devido à exposição a citocinas. (HUYNH, DUSTING; 2006). Dessa forma, diante de uma possível inflamação dos tecidos periodontais e periimplantares, a arginase foi utilizada como um marcador bioquímico da inflamação na saliva.

O aumento da atividade da arginase apresentado no resultado deste estudo quanto aos pacientes fumantes, poderia resultar em uma menor produção de NO já que a arginase utiliza a L-arginina como substrato. A menor quantidade de NO na saliva diminui as propriedades antimicrobianas desta e torna os tecidos periodontais e perimplantares mais suscetíveis aos patógenos existentes. (GULLU et al., 2005). Logo, pacientes portadores de implantes dentários e adeptos ao tabagismo, fator de risco primário para a saúde em geral, são mais suscetíveis a uma patologia bucal.

O óxido nítrico apresenta diversas funções fisiológicas no organismo tais como vasodilatação, modulação da neurotransmissão, inibição microbiana e do crescimento de células tumorais, regula a migração leucocitária e inibe a produção de superóxido. (GYURKO et al., 2003). Este papel antagônico entre arginase e óxido

nítrico pode ser fundamental para o equilíbrio do organismo, já que o óxido nítrico, um radical livre, apesar de suas funções protetoras, pode ter em doses excessivas um papel deletério aos tecidos periodontais e perimplantares. Segundo Queiroz e Batista (1999) doenças podem estar relacionadas a um alto ou baixo nível de óxido nítrico no organismo.

Segundo Bergeron et al. (2007) a arginase converte arginina em ornitina, que é precursor de prolina e poliaminas. Alta atividade da arginase pode contribuir para remodelação por aumento de depósito de colágeno e proliferação celular. Excesso de óxido nítrico produzidos por óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) possuem efeitos adversos incluindo permeabilidade vascular, hipersecreção de muco e destruição de células epiteliais. Em outra pesquisa, Moinard, Cynober e Bandt (2005) informam que as poliaminas estão envolvidas na diferenciação de células de defesa e na regulação da reação inflamatória. No curso da inflamação local, a ativação de óxido nítrico sintetase (NOS) diante uma injúria pode favorecer a acumulação local de células fagocitárias, possibilitando proliferação celular via síntese de poliaminas, e síntese de colágeno via síntese de prolinas. Dessa forma, sabendo que a ornitina é precursora de poliaminas, e estas são importantes nutritivos para algumas bactérias, podemos dizer que grandes quantidades de arginase podem contribuir para um aumento bacteriano, podendo levar a um processo infeccioso. O aumento da atividade de arginase pelo hospedeiro é acompanhada pelo aumento do consumo de L-arginina, substrato comum para NOS resultando em menos produção de NO. De acordo com o presente estudo estão Ugar-Çankal e Ozmeriç (2006), os quais relataram que quantidades excessivas de arginase salivar contribuem para destruição tecidual e que o crescimento da atividade argininolítica em periodontite acontece devido ao decréscimo de síntese de

óxido nítrico, que leva a diminuição das propriedades antibacterianas na saliva, proporcionando tecidos periodontais mais susceptíveis a existência de patógenos. Também de acordo com o nosso estudo, estão Aurer et al. (2001) que mostrou que indivíduos com doença periodontal possuem menor concentração significativa de nitrito salivar em relação ao periodonto de indivíduos saudáveis.

Outro fator importante abordado no presente estudo é o fato que fumar resulta em uma larga quantidade de elementos tóxicos que tem a capacidade de alterar a função celular e ativar as células inflamatórias (BERGERON et al., 2007). O fumo muda significativamente as condições bucais, propiciando aumento do acúmulo de placa bacteriana, maior incidência de gengivite e periodontite, reabsorção alveolar aumentada e maior perda dentária. Dessa forma aumenta o risco de complicações na cicatrização, o risco de periimplantite e as complicações biológicas são maiores. Diante disso, de acordo com Strietzel et al. (2007) poderíamos ressaltar que o tabagismo interfere no prognóstico de implantes dentários, sendo necessários maiores cuidados clínicos e informativos com tais pacientes.

Fumar também está relacionado à sobrevida e sucesso das terapias que utilizam implantes dentários. Num estudo longitudinal de Hultin et al. (2000), foi observado que sete de nove pacientes que perderam suas próteses sobre implantes, eram fumantes. Tabagismo aumenta a incidência de perimplantite e afeta o sucesso em longo prazo com o uso dessas terapias. Poderíamos dizer que, pelo fato do tabagismo ser imunossupressor e favorecer a uma menor produção de anticorpos, a adesão bacteriana é favorecida ao redor dos implantes.

Segundo Hibbs et al. (1988) o óxido nítrico na saliva pode ser parte de um mecanismo de defesa contra microrganismos da cavidade oral, pois o óxido nítrico é capaz de ativar macrófagos. Como já mencionado, doenças podem estar

relacionadas a um alto ou baixo nível de óxido nítrico no organismo. Hirose et al. (2001) mostrou maior atividade da enzima óxido nítrico sintetase em resposta a dois importantes patógenos periodontais, *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Estes dados enfatizam a importância do óxido nítrico na patogênese da doença periodontal e na doença perimplantar. Associado a anormalidades imunológicas do hospedeiro, e sabendo que o fumo proporciona uma resposta imunológica baixa, assim como altas quantidades da atividade arginínolítica leva ao decréscimo de NO biodisponível, acreditamos que nosso achado sobre atividade da arginase salivar em pacientes fumantes pode contribuir para um melhor entendimento da fisiopatologia dos efeitos adversos do tabagismo em terapias com implantes dentários.

Herman e Moncada (2005) demonstraram que o tabagismo é fator de risco para aterosclerose. Podemos afirmar o mesmo sobre o tabagismo em relação ao tratamento reabilitador com implantes dentários, pois de acordo com os achados, o presente estudo fornece a primeira demonstração que atividade arginínolítica é substancialmente maior em fumantes comparados a não fumantes com implantes dentários. A atividade da arginase foi aproximadamente seis vezes maior em fumantes implantados comparados aos outros grupos. Os mesmos autores sugerem que uma ação terapêutica com o uso de L-arginina resultaria em um aumento na síntese de NO, o que pode ser benéfico em algumas condições, incluindo hipercolesterolemia, hipertensão, doenças da artéria coronária e diabetes. Desta maneira, poderíamos sugerir novos estudos para observar a resposta imune do hospedeiro e análises teciduais do sítio periimplantar em relação a terapias com associação de L-arginina. A suplementação com L-arginina pode ser avaliada na prevenção de falhas de implantes de indivíduos fumantes.

A periodontite crônica e o fumo estão associados a um aumento da atividade arginínolítica, assim como poderá estar nas doenças que envolvem implantes dentários. Alguns estudos, como os de Ozmeriç, Elgun e Uraz (2000) e Gheren et al. (2008), demonstraram que a atividade da arginase avaliada na saliva, meio extra-celular, de indivíduos com periodontite crônica e comparada com indivíduos saudáveis ficou aumentada no grupo com a doença periodontal. Da mesma forma, observou-se no estudo de Bergeron et al. (2007), onde houve um aumento na atividade da arginase nos indivíduos fumantes em relação aos não fumantes.

Em estudos semelhantes, Shibata et al. (2001) e Batista et al. (2002) mostraram um aumento na atividade da enzima óxido nítrico sintetase intra-celular em indivíduos com doença periodontal. Assim como, Gullu et al. (2005), que observaram grandes quantidades de óxido nítrico sintetase intra-celular encontrados em tecidos inflamados e que, após a terapia periodontal essa quantidade diminuiu. Enquanto que, após terapia periodontal quantidades de atividades específicas da arginase mostraram-se aumentadas. Da mesma forma, Hirose et al. (2001) demonstraram maior quantidade significativa de óxido nítrico sintetase em pacientes com periodontite do que em pacientes saudáveis.

Diante dos resultados obtidos, a atividade da arginase parece estar diretamente relacionada com a gravidade da questão tabagismo. Não houve diferença estatística em relação ao número de implantes entre os grupos. Foi verificada pequena atividade da arginase na saliva dos indivíduos não fumantes. Este resultado leva-nos a crer que a condição inflamatória é baixa e o provável envolvimento de microrganismos anaeróbicos tanto nos tecidos perimplantares como nos tecidos periodontais de pacientes saudáveis, independentemente do número de implantes, é reduzido. Dessa forma podemos dizer que tecidos

inflamados apresentam maior expressão de arginase e como em nosso estudo a condição inflamatória encontra-se reduzida, menos substrato torna-se disponível para a atividade da arginase. O fato dos dois grupos fumantes (grupos IF e CF) ter apresentado diferenças estatisticamente significantes pode ser devido a alguns fatores, tais como, o tempo de fumo entre os indivíduos, o número de cigarros fumados por dia e, também, a associação implante/fumo (grupo IF) pode estar relacionado à alta atividade da arginase.

Diante do apresentado, o nosso estudo demonstrou alterações na atividade da arginase na saliva de indivíduos com implantes dentários e fumantes, o que vem alertar para mais um efeito maléfico do tabagismo neste tipo de terapia reabilitadora, primeiro achado na literatura. Assim como, outros estudos são necessários sobre o fumo em relação aos implantes dentários diante da atividade da arginase e do óxido nítrico, e se outras situações clínicas, também, são capazes de alterar a atividade destes marcadores bioquímicos.

## 7 CONCLUSÃO

Dentro das limitações e análises dos resultados deste estudo, podemos concluir que:

- O número de implantes na cavidade bucal exerce pouco efeito estimulador sobre a atividade da arginase em pacientes portadores de prótese sobre implantes.
- O fumo exerce uma grande estimulação sobre a atividade da arginase em pacientes portadores de prótese sobre implantes.

## REFERÊNCIAS

ABOYOUSSEF, H. et al. Detection of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinases in implant crevicular fluid. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Carol Stream, v.13, n.5, p. 689-696, 1998.

AGARWAL, P. K.; AGARWAL, K. N.; AGARWAL, D. K. Biochemical changes in saliva of malnourished children. **Am J Clin Nutr**, v.39, n.2, p. 181-184, 1984.

AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int Dent J**, v.25, p.229-235, 1975.

AKOPOV, S. E.; KANKANIAN, A. P. Nitric oxide (NO) inactivation by polymorphonuclear leukocytes as mechanism for the development of periodontal disease. **Stomatologia**, Mosk, v. 75, n. 1, p. 12-14, May 1996.

AURER, A. et al. Nitric oxide is decreased in periodontites. **J. Clin. Periodontol.**, Zagreb, v. 28, n. 5, p. 565-568, July 2001.

BATISTA, A. C. et al. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. **Oral diseases**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 254-260, May 2002.

BERGERON, C. et al. Influence of cigarette smoke on the arginine pathway in asthmatic airways: Increased expression of arginase I. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.119, n.2, p.391-397, Feb. 2007.

BOUTROS, S. M. et al. Crevicular fluid enzymes from endosseous dental implants and natural teeth. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Carol Stream, v.11, n.3, p. 322-330, 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248-254, 1976.

CHINARD, F. P. Photometric estimation of proline and ornithine . **J. Biol. Chem.** Baltimore, v. 199, n. 1, p. 91-95, June 1952.



ENWONWU, C. O.; ILUPEJU, F.; WARREN, R. C. Arginine metabolism in the salivary glands of protein-deficient rats and its potential association with the oral microflora. **Caries Res**, v.28, p. 99-105, 1994.

FANG, F. C. Mechanisms of nitric oxide- related antimicrobial activity. **J. Clin. Invest.**, Colorado, v. 99, n. 12, p. 2818-2825, June 1997.

FIORELLINI, J. P. et al. Correlation of peri-implant health and aspartate aminotransferase levels : a cross-sectional clinical study. **Int. J. Oral Maxillofac Implants**, Carol Stream, v.15, n.4, p. 500-504, 2000.

GHEREN, L. W. et al. Periodontal therapy reduces arginase activity in saliva of patients with chronic periodontitis. **Clin Oral Invest.**, v. 12, n. 1, p. 67-72, March 2008.

GOPALAKRISHNA, R.; NAGARAJAN, B. Arginase in saliva. **Indian J. Biochem. Biophys.**, Madras, v. 15, n. 4, p. 488-490, Sept. 1978.

GULLU, C. et al. Effectiveness of scaling and root planning versus modified Widman flap on nitric oxide synthase and arginase activity in patients with chronic periodontitis. **J. Periodontal Res.**, Gazi, v. 40, n. 2, p. 168-175, Dec. 2005.

GUOYAO, W. U; MORRIS, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **J. Biochem.**, Texas, v. 336, n. 1, p. 1-17, May 1998.

GYURKO, R. et al. Mice lacking inducible nitric oxide synthase demonstrate impaired killing of *Porphyromonas gingivalis*. **Infect. Immun.**, Boston, v. 71, n. 9, p. 4917-4924, Sept. 2003.

HAFFAJE, A. D; SOCRANSKY, S. S; GOODSON, J. M. Clinical parameters as predictors of destructive periodontal disease activity. **J. Clin. Periodontol.**, Boston, v. 10, n. 3, p. 257-265, May 1983.

HERMAN, A.; MONCADA, S. Therapeutic potential of nitric oxide donors in the prevention and treatment of atherosclerosis. **European Heart Journal**, v.26, p. 1945-1955, 2005.

HIBBS, J. B. et al. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Utha, v. 157, n. 1, p. 87-94, Nov. 1988.

HIROSE, M. et al. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. **J. Periodontol.**, Tokio, v. 72, n. 5, p. 590-597, Nov. 2001.

HRABAK, A.; BAJOR, T.; CSUK, I. The effect of various inflammatory agents on the alternative metabolic pathways of arginine in mouse and rat macrophages. **Inflamm. Res.**, Basel, v. 55, n. 1, p. 23-31, Feb. 2006.

HRABAK, A. et al. The inhibitory effect of nitrite, a stable product of nitric oxide formation of arginase. **FEBS Lett.**, Budapest, v. 39, n. 2, p. 203-206, June 1996.

HULTIN, M. et al. Factors affecting late fixture loss and marginal bone loss around teeth and dental implants. **Clin Implant Dent Relat Res.**, v. 2, n.4, p.203-208, 2000.

HUYNH, N. N.; DUSTING, J. C. Amino acids, arginase and nitric oxide in vascular health. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Melbourne, v. 33, n. 1, p. 1-8, Dec. 2006.

JENKINSON, C. P.; GRODY, W. W.; CEDERBAUM, S. D. Comparative properties of arginases. **Comp. Biochem. Physiol.**, Los Angeles, v. 114B, n. 1, p. 107-132, Dec. 1996.

KENDALL, H. K.; MARSHALL, R. I.; BARTOLD, P. M. Nitric Oxide and tissue destruction. **Oral Dis.**, Brisbane, v. 7, n. 1, p. 2-10, May 2001.

KONARSKA, L. et al. Human salivary arginase and its deficiency in Argininaemia. **J. Clin.Chem. Clin. Biochem.**, v.23, n.6, p. 337-342, 1985.

KOSSEL, A.; DAKIN, H. D. Uber die arginase. **Z. Physiol. Chemie.**, Tubigain, v. 41, n. 6, p. 321-331, Mar. 1904.

KRONCKE, K.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus citoprotection – how, when and where? **Nitric Oxide: Biol. Chem.**, Dusseldorf, v. 1, n.1, p. 107-120, Jan. 1997.

LINDQUIST, L. W.; CARLSSON, G. E.; JEMT, T. Association between marginal bone loss around osseointegrated mandibular implants and smoking habits: A 10-year follow-up study. **J Dent Res**, v.76, n.10, p.1667-1674, Oct. 1997.

MICHEL, T.; FERON, O. Nitric oxide synthases: which, how, and why? **J. Clin. Invest.**, Boston, v. 100, n. 9, p. 2146-2152, Nov. 1997.

MOINARD, C.; CYNOBER, L.; BANDT, J.P. Polyamines : Metabolism and implications in human diseases. **Clinical Nutrition**, v. 24, p. 184-197, 2005.

MOMBELLI, A.; LANG, N. P. Clinical parameters for the evaluation of dental implants. **Periodontology 2000**, 4, p.81-86, Feb. 1994.

NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? **J. Clin. Invest.**, New York, v. 100, n. 10, p. 2417-2423, Nov. 1997.

OZMERIÇ, N. Advances in periodontal disease markers. **Clinica. Chimica. Acta.**, v.343, p.1-16, 2004

OZMERIÇ, N.; ELGUN, S.; URAZ, A. Salivary arginase in patients with adult periodontitis. **Clin. Oral Invest.**, Gaza, v. 4, n. 2, p. 21-24, Dec. 2000.

QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 22, n. 24, p. 3-18, jul./ago. 1999.

SCHUBERT, U. et al. Crosslaps and  $\beta$ -glucuronidase in peri-implant and gingival crevicular fluid. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Carol Stream, v.16, n.2, p. 252-258, 2001.

SHAFER, W.; CLARK, P.; MUHLER, J. Salivary gland functions in the rat: III. Protease and arginase activity of submaxillary glands and whole saliva. **J. Dent. Res.**, v.38, p. 121-28, 1959.

SHIBATA, K. et al. Nitric oxide synthase activity in neutrophils from patients with localized aggressive periodontitis. **J. Periodontol.**, Tokio, v. 72, n. 8, p. 1052-1058, Aug. 2001.

SMITH, Q. T.; CAMP, S. J. Salivary amylase in crevicular fluid. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.20, n.6, p. 418-424, 1993.

STEENBERGHE, D. V.; QUIRYNEN, M. Reproducibility and detection threshold of peri-implant diagnostics. **Adv. Dent. Res.**, v. 7, n. 2, p. 191-195, Aug. 1993.

STRIETZEL et al. Smoking interferes with the prognosis of dental implant treatment: a systematic review and meta-analysis. **J. Clin Periodontol.** v. 34, p.523-544, 2007.

SUNITHA, M.; SHANMUGAM, S. Evaluation of salivary nitric oxide levels in oral mucosal diseases : A controlled clinical trial. **Indian J Dent Res.**, v.17, p. 117-20, 2006.

TANKE, H. J. Genomics and proteomics. The potential role of oral diagnostics. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v.1098, p. 330-334, 2007.

UGAR-ÇANKAL, D.; OZMERİÇ, N. A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. **Clinica. Chimica. Acta.**, v.366, p.90-100, 2006.

UITTO, V. Gingival crevice fluid – an introduction. **Periodontol 2000**, Copenhagen, v.31, p. 9-11, 2003.

WHEELER, M. A. et al. Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 99, n. 1, p. 110-116, Jan. 1997.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial desta obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Daher Antonio Queiroz

Taubaté, agosto de 2008.