

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Leonardo Weinschutz Gheren

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ARGINASE
NA SALIVA DE INDIVÍDUOS COM DOENÇA
PERIODONTAL**

Taubaté-SP
2006

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Leonardo Weinschutz Gheren

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ARGINASE
NA SALIVA DE INDIVÍDUOS COM DOENÇA
PERIODONTAL**

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

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Wilson Abrão Saad

Co-orientador: Prof. Dr. José Roberto Cortelli

Taubaté-SP
2006

Gheren, Leonardo Weinschutz

Avaliação da atividade da arginase na saliva de indivíduos com doença periodontal/ Leonardo Weinschutz Gheren- 2006

Dissertação (Mestrado)- Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia, 2006

Orientação: Prof. Dr. Wilson Abrão Saad

LEONARDO WEINSCHUTZ GHEREN

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ARGINASE NA SALIVA DE INDIVÍDUOS COM
DOENÇA PERIODONTAL**

Dissertação apresentada para obtenção
do Título de Mestre pelo Programa de
Pós- Graduação do Departamento de
Odontologia da Universidade de
Taubaté.
Área de concentração: Periodontia

Data: _____

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Universidade _____
Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Universidade _____
Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Universidade _____
Assinatura _____

Aos meus pais, por estarem sempre ao meu lado. Obrigado por tudo que fizeram e fazem por mim.

AGRADECIMENTOS

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

À equipe de professores de Periodontia, por todo o conhecimento que me foi passado.

À sócia Dra. Bianca Barata, por compreender minhas ausências.

Aos amigos de Mestrado, em especial ao Marcello, Leandro, Arnoud, Orlando, Priscila, Paula e Mariana, pelos momentos inesquecíveis vividos em Taubaté.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wilson Abrão Saad.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. José Roberto Cortelli.

À Bruna, minha grande paixão.

RESUMO

A saliva humana possui diversas enzimas que apresentam atividade e algumas delas podem estar envolvidas na patogênese da doença periodontal. A arginase é uma enzima hidrolítica que utiliza a L-arginina como substrato para formação de ornitina e uréia. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade da arginase na saliva de indivíduos com doença periodontal e qual efeito do tratamento periodontal na atividade desta enzima. Para isso foram analisadas, por espectrofotometria a saliva de 18 indivíduos com periodontite crônica e 18 com periodonto saudável. Os resultados mostram que houve um aumento na atividade da arginase no grupo com periodontite crônica e trinta dias após terapia periodontal básica esta atividade diminuiu.

Palavras-chave: Doença periodontal. Arginase. Óxido nítrico. Saliva.

ABSTRACT

Human saliva possesses many enzymes with activity and some of them might be involved in the pathogenesis of periodontal disease. Arginase is a hydrolytic enzyme that catalyses L-arginine into ornithine and urea. The aim of this study was to evaluate the activity of arginase in saliva of subjects with periodontal disease. Saliva of 18 subjects with chronic periodontitis and 18 subjects with healthy periodontium was analyzed by spectrophotometry. Saliva was also collected thirty days after basic periodontal treatment in the test group. The results show an increase in arginase activity in subjects with chronic periodontitis and this activity decreased after treatment.

Key- words: Arginase. Periodontal disease. Nitric oxide. Saliva.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
3 PROPOSIÇÃO	20
4 MATERIAL E MÉTODO	21
4.1 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	21
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	21
4.2.1 <i>Grupo teste</i>	21
4.2.2 <i>Grupo controle</i>	22
4.3 COLETA DE SALIVA	22
4.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA	22
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
5 RESULTADOS	24
6 DISCUSSÃO	27
7 CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS	32
APÊNDICE A -TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupo controle X grupo teste	24
Tabela 2- Grupo teste X grupo T30	25
Tabela 3- Grupo controle X grupo T30	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Atividade da arginase

25

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é provavelmente a doença crônica mais comum em adultos. Estima-se que 5% a 20% da população apresentam a doença periodontal em sua forma avançada, porém, a maioria dos adultos apresentam formas leves e moderadas da doença. A doença periodontal é uma doença infecciosa causada por bactérias específicas presentes na bolsa periodontal. Sua evolução se dá por períodos de surto seguidos por períodos de quiescência. O objetivo do diagnóstico, plano de tratamento e terapia da doença periodontal é prevenir a sua ocorrência e diminuir os riscos de uma futura progressão da doença.

Diversos parâmetros clínicos e radiográficos têm sido utilizados no intuito de se fazer um diagnóstico precoce da doença periodontal. Porém, esses parâmetros são muito limitados, pois nos mostram a história pregressa da doença e não indicam atividade da doença naquele determinado momento e ainda, não são indicativos de uma futura progressão da doença. (HAFFAJE ; SOCRANSKY; GOODSON, 1983)

Grande relevância tem sido dada para análise microbiológica, análise do fluido gengival e análise da saliva com o objetivo de se entender melhor o processo de instalação e progressão da doença periodontal. A saliva contém produtos derivados tanto do hospedeiro como dos microrganismos. Diversos estudos vêm sendo feitos para avaliar se a atividade de algumas enzimas presentes na saliva, podem funcionar como marcadores que revelam a extensão da destruição periodontal e que servem como preditores de uma futura progressão da doença.

Algumas enzimas presentes na saliva podem, de alguma forma, contribuir no processo de destruição tecidual assim como podem 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 de patogênese da doença periodontal.

A arginase é uma enzima hidrolítica do ciclo da uréia responsável por converter L-arginina em uréia e ornitina (KOSSEL; DAKIN, 1904). 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 (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, porém, apenas essa é 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 sobre 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 e em resposta a estímulos inflamatórios incluindo citocinas como gama interferon e lipopolissacarídeo bacteriano (NATHAN, 1997), e 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 uma 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. Hibbs et al. (1998) mostrou que o óxido nítrico é capaz de ativar macrófagos.

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. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade da arginase na saliva de indivíduos com periodontite crônica e o efeito da terapia periodontal sobre a atividade de tal enzima.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Gopalakrishna e Nagarajan (1978) analisaram bioquimicamente a atividade da arginase na saliva e sugeriram que esta enzima possui alguma função fisiológica.

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.

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 um aumento na atividade da iNOS em neutrófilos de indivíduos com infecção do trato urinário.

Em uma revisão de literatura, analisando as funções fisiológicas do óxido nítrico, Queiroz e Batista (1999), mostram o óxido nítrico como um neurotransmissor, porém, a função exata do óxido nítrico na fisiologia do cérebro é controversa. Os autores sugerem que este gás desempenha uma função na memória e no aprendizado. Este papel ainda está sob investigação. Os autores mostram também o óxido nítrico como regulador da pressão arterial e este controle é feito 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. Os autores concluíram que um 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. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade da arginase salivar em pacientes com periodontite do adulto e esclarecer 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 houve uma 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.

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 de

progressão rápida (PPR), 25 com periodontite do adulto (PA), e 25 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-se com menor concentração de nitrito que os indivíduos saudáveis. Indivíduos com PPR apresentaram menor concentração de nitrito que os indivíduos com PA. Então, indivíduos com periodontite apresentaram diminuição na produção local de óxido nítrico e esse efeito foi mais pronunciado nos indivíduos com os tipos mais severos de doença.

Shibata et al. (2001) avaliaram a atividade da enzima óxido nítrico sintetase em neutrófilos de indivíduos com periodontite agressiva e avaliaram também a atividade desta enzima na quimiotaxia de neutrófilos. Os resultados obtidos sugerem que NOS esta 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 um aumento na produção de óxido nítrico com duração prolongada principalmente em células com macrófagos, linfócitos e neutrófilos. Há também um 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 PCR. As amostras de tecido gengival e placa subgengival foram obtidas de 22 indivíduos com periodontite do adulto 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 *Actinobacillus 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 imunoreação para óxido nítrico sintetase independente do estágio da doença.

Gyrko 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 *P. gingivalis* em ratos e analisaram as alterações nos níveis de óxido nítrico sintetase induzida. No grupo de ratos que receberam *P. gingivalis* houve aumento na atividade da enzima óxido nítrico sintetase. Em outro grupo de ratos além da inoculação de *P. 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 *P. gingivalis*

Gollu et al. (2005) avaliaram a efetividade de raspagem e alisamento radicular e 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 7 mm 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 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 da óxido nítrico sintetase. Para isso, macrófagos foram isolados de ratos. Os agentes antiinflamatórios utilizados foram caseína, tioglicolato, vacina BBC e vacina NDV. 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,

antitrombóticas 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.

3 PROPOSIÇÃO

Tendo em vista a possibilidade de se encontrar um marcador bioquímico para a doença periodontal, a proposta deste trabalho foi avaliar bioquimicamente a atividade da arginase na saliva de indivíduos com periodontite crônica e comparar com a atividade na saliva de indivíduos sem doença periodontal, bem como analisar o efeito da terapia periodontal básica na atividade desta enzima.

4 MATERIAL E MÉTODO

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Taubaté. Todos os indivíduos que participaram desta pesquisa foram informados dos procedimentos e objetivos da mesma, e preencheram um termo de consentimento livre e esclarecido apresentado em anexo.

Trinta e seis indivíduos foram divididos em dois grupos: grupo teste com 18 indivíduos com periodontite crônica e grupo controle com 18 indivíduos sem doença periodontal

4.1 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos indivíduos que tenham feito uso de antiinflamatório, antibiótico ou imuno-supressores nos últimos seis meses. Indivíduos cardiopatas, diabéticos, imunossuprimidos e fumantes também foram excluídos assim como indivíduos que tenham recebido tratamento periodontal prévio.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

4.2.1 Grupo teste

Indivíduos com pelo menos quatro sítios com profundidade de bolsa maior ou igual do que 5 mm e perda clínica de inserção maior do que 5 mm.

4.2.2 Grupo controle

Indivíduos não podem apresentar bolsa maior do que 5 mm em sítio algum.

Para estabelecer o diagnóstico, um único examinador calibrado avaliou o nível de inserção clínica, profundidade de bolsa, índice de sangramento gengival, índice de sangramento a sondagem e índice de placa. Os exames foram feitos com sonda periodontal da marca comercial Hi Freudy.

4.3 COLETA DE SALIVA

A coleta de saliva foi feita de forma estimulada com tablete de parafina e foram coletados 2 mL de saliva. No grupo controle a saliva foi coletada em um único momento. No grupo teste a saliva foi coletada assim que estabelecido o diagnóstico e trinta dias após o fim da terapia periodontal básica, ou seja, instrução de higiene oral, raspagem supra e subgengival e alisamento radicular. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em isopor com gelo e levadas imediatamente para análise bioquímica.

4.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA

A L-arginina sobre ação da arginase tem como produto final uréia e ornitina. A atividade da arginase em nosso trabalho foi medida pela produção de ornitina. A análise da atividade da arginase foi mensurada de acordo com método de Chinard (1952).

Solução reagente- cada mL da solução continha 0,4 ml de ácido fosfórico (H_3PO_4) a 6 M, 0,6 mL de ácido acético glacial e 25 mg de ninidrina. Após a adição de ninidrina a

solução permaneceu em banho maria a 70° até que a ninidrina se dissolvesse completamente. Esta solução permanece estável por 24 horas.

Meio de reação-contém 40 µl de L-arginina a 250 mM, 25 µl de cloreto de manganês a 20 mM e 100 µl de carbonato com pH 9,8 e 345 µl de água destilada. O meio de reação foi colocado em banho maria a 37°C para aquecimento.

Um mL da saliva coletada foi diluída três vezes em solução fisiológica e então 50 µl foram adicionados ao meio de reação que permaneceu em banho maria a 37°C por 15 minutos. A reação foi então interrompida com 1,5 ml de ácido acético glacial. Foram adicionados 50 µl da solução reagente de cor previamente preparada e foi para banho fervente por uma hora. Em seguida a solução foi resfriada com água destilada e levada para leitura no espectrofotômetro. Cada amostra foi analisada duas vezes para confirmação de resultado.

A atividade da arginase na saliva foi expressa em IU/litro, onde IU foi definido como quantidade de produção de 1 µmol de ornitina/min.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram analisados com o programa prisma utilizando-se o teste *T*.

5 RESULTADOS

Os índices de placa, sangramento gengival, nível de inserção, profundidade de bolsa e sangramento a sondagem entre o grupo teste e o grupo controle, apresentaram diferença estatística. Trinta dias após terapia periodontal básica realizada no grupo teste (grupo T30), os valores de índice de placa e índice de sangramento gengival apresentaram-se estatisticamente maiores, quando comparados ao grupo controle e estatisticamente menores que o grupo teste. Houve uma redução estatisticamente significativa na profundidade de bolsa, sangramento a sondagem e sangramento marginal quando comparados ao grupo teste.

A atividade da arginase apresentou-se aumentada no grupo teste quando comparada ao grupo controle (Tabela 1). A média da atividade da arginase no grupo com doença periodontal foi de 119,04 mUI com desvio padrão 23,57 enquanto a média no grupo controle foi de 46,95 mUI com desvio padrão 17,72.

Tabela 1- Grupo teste X Grupo controle mUI

	Atividade arginase (média)	Mediana	Desvio Padrão
Teste	119,04	121,35	23,57
Controle	46,95	46,15	17,72
Valor de p	< 0,0001		

Na análise da saliva trinta dias após a terapia periodontal básica realizada no grupo teste, a atividade da arginase reduziu de forma estatisticamente significativa, com média da atividade 76,83 mUI e desvio padrão 16,26 (Tabela 2).

Tabela 2- Controle x T30 mUI

	Atividade arginase (média)	Mediana	Desvio Padrão
Teste	119,04	121,35	23,57
T30	76,83	79,65	16,24
Valor de p	< 0,0002		

Quando comparada a atividade da arginase nos grupos controle e T30, a atividade enzimática no grupo T30 foi estatisticamente maior do que no grupo controle. (Tabela 3).

Tabela 3- Controle X T30 mUI

	Atividade arginase(média)	Mediana	Desvio Padrão
Controle	46,95	46,15	17,72
T30	76,83	79,65	16,24
Valor de p	<0,001		

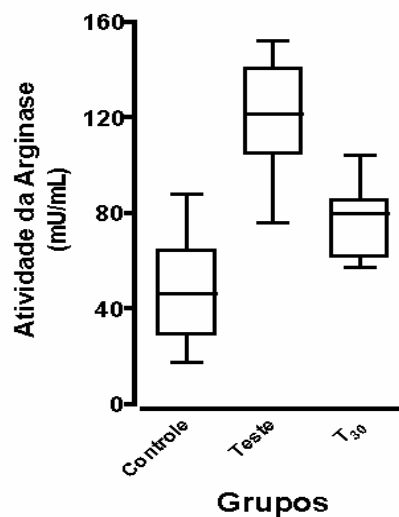


Figura 1- Atividade da arginase

A Figura 1 mostra a atividade da arginase nos três grupos expressa em mUI/min. No grupo controle o valor máximo foi 88,12; o mínimo 17,77; a mediana 46,15; discrepância em

95% de 37,14 a 56,76. No grupo teste o valor máximo foi 151,98; o mínimo 75,84; a mediana 121,35 e a discrepância em 95% de 107,3 a 130,8 e no grupo T30 o máximo foi 104,3; o mínimo 57,21; a mediana 79,65 e a discrepância em 95% de 63,23 a 90,43.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou comparar a atividade da arginase em indivíduos com doença periodontal com indivíduos sem doença e analisar qual o efeito da terapia periodontal básica sobre a ação de tal enzima.

Os resultados mostraram um aumento da atividade da arginase no grupo de indivíduos com periodontite crônica em relação ao grupo controle. De acordo com esse resultado, está o estudo de Ozmeriç, Elgun e Uraz (2000), em que a atividade da arginase foi avaliada na saliva de indivíduos com periodontite crônica e esta atividade enzimática mostrou-se aumentada no grupo teste.

A arginase na saliva pode ter como origem bactérias orais ou células do hospedeiro (GOPALAKRISHNA; NAGARAJAN, 1978). A infiltração de macrófagos é característica conhecida de inflamações crônicas como a doença periodontal e segundo Currie et al. (1979) macrófagos ativados são capazes de produzir arginase.

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. As enzimas arginase e óxido nítrico sintetase competem, portanto, por um substrato comum, a L-arginina.

Bodis e Haregewoin (1993) mostraram que o óxido nítrico na saliva pode ser derivado de células endoteliais, neurônios e macrófagos.

Segundo Hibbs et al. (1988) o óxido nítrico na saliva pode ser parte de um mecanismo de defesa contra microrganismos da cavidade oral. Gyurko et al. (2003) mostrou que o óxido nítrico pode ser efetivo no combate a *P.gingivalis*, bactéria periodontopatogênica. Hirose et al. (2001) mostrou maior atividade da enzima óxido nítrico sintetase em resposta a dois

importantes patógenos periodontais, *P. gingivalis* e *A.actinomycescomitans*. Estes dados enfatizam a importância do óxido nítrico na patogênese da doença periodontal

O óxido nítrico, além de antimicrobiano, tem função na modulação da resposta inflamatória.

O aumento da atividade da arginase apresentado no resultado deste estudo deveria resultar em uma menor produção de óxido nítrico já que a arginase utiliza a L-arginina como substrato. A menor quantidade de óxido nítrico na saliva diminui as propriedades antimicrobianas desta e torna os tecidos periodontais mais suscetíveis aos patógenos existentes. (GULLU et al., 2005)

Shibata et al. (2001) e Batista et al. (2002) mostraram um aumento na atividade da enzima óxido nítrico sintetase em indivíduos com doença periodontal.

Apesar de terem, as enzimas óxido nítrico sintetase e arginase ação antagônica, o aumento da atividade de tais enzimas em indivíduos com doença periodontal pode ser explicado por Matejka et al. (1998), que demonstrou *in vivo* que áreas inflamadas têm uma maior expressão de L-arginina que serve como substrato para arginase e para óxido nítrico sintetase.

Este papel antagônico entre arginase e óxido nítrico pode ser fundamental para o equilíbrio do organismo, já que o óxido nítrico, apesar de suas funções protetoras, tem em doses excessivas um papel deletério aos tecidos periodontais.

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)

Outro resultado apresentado em nosso trabalho mostra uma redução da atividade da arginase na saliva dos indivíduos com periodontite crônica trinta dias após terapia periodontal

básica. Este resultado deve-se à redução da condição inflamatória apresentada após a terapia e à provável redução dos microrganismos envolvidos na doença periodontal.

Tecidos inflamados apresentam maior expressão da l-arginina e com a redução da condição inflamatória, menos substrato torna-se disponível para a atividade da arginase. Tendo em vista o aumento da atividade da arginase reportada tanto em nosso trabalho como por Ozmeriç et al. (2000), a redução da atividade da arginase após terapia periodontal era esperada.

Porém, quando comparamos o grupo T30 com o grupo controle, a atividade da arginase foi maior no grupo T30. Apesar da terapia periodontal básica, alguma terapia adicional parecia ser necessária no grupo T30, pois parâmetros como profundidade de bolsa e sangramento gengival, embora estatisticamente menores no grupo T30 do que no grupo teste, permaneceu maior do que no grupo controle. Estes resultados mostram que a atividade da arginase parece estar diretamente relacionada com a gravidade da doença periodontal.

Gullu et al. (2005) comparou raspagem e alisamento radicular com retalho de widman na atividade das enzimas óxido nítrico sintetase e arginase. O retalho de Widman mostrou-se mais eficiente na redução da atividade da arginase.

O óxido nítrico e a arginase estão envolvidos em diversos processos patológicos e fisiológicos do organismo. A arginase é uma via metabólica essencial para remover íons de amônia do organismo. É uma enzima chave no ciclo da uréia que tem função essencial em remover produtos tóxicos do organismo (JENKINSON; GRODY; CEDERBAUM, 1996).

O óxido nítrico regula a pressão sanguínea, age como neurotransmissor, tem atividade antimicrobiana (QUEIROZ; BATISTA, 1999), inibe o crescimento de células tumorais (COSTA et al., 2003). Diversas patologias estão relacionadas ao aumento ou a diminuição da produção de óxido nítrico.

Nosso estudo relatou alterações na atividade da arginase na saliva de indivíduos com periodontite crônica. Futuros estudos são necessários para verificar até que ponto a doença periodontal pode alterar a atividade da arginase e produção de óxido nítrico em outros tecidos do organismo, podendo estar a doença periodontal diretamente envolvida na patogênese de outras doenças.

7 CONCLUSÕES

1-A atividade da enzima arginase encontrou-se aumentada em indivíduos com doença periodontal e esta atividade parece estar relacionada a gravidade da doença.

2-O tratamento periodontal reduziu a atividade da arginase.

REFERÊNCIAS

- 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.
- BODIS, S.; HAREGEWOIN, A. Evidence for the release and possible neural regulation of nitric oxide in human saliva. **Biochem. biophys. Res. Commun.** Boston, v. 194, n. 3, p. 347-350, July 1993.
- CHINARD, F. P. Photometric estimation of proline and ornithine. **J. Biol. Chem.** Baltimore, v. 199, n. 1, p. 91-95, June 1952.
- COSTA, M. T. et al. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. **Ciência Rural**, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 3-12, set/out. 2003.
- CURRIE, G. A. Activated macrophages kill tumor cells by realizing arginase. **Nature**, Brescia, v. 273, n. 5, p. 758-759, Dec. 1979.
- FANG, F. C. Mechanisms of nitric oxide- related antimicrobial activity. **J. Clin. Invest.**, Colorado, v. 99, n. 12, p. 2818-2825, June 1997.
- 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 cronic 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.
- 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. 1998.
- HIROSE, M. et al. Expression os 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.**, Basil, 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.

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.

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.

MATEJKA, M. et al. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. **Journal of Periodontal Research**, Viena, v. 33, n. 5, p. 517-518, May 1998.

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

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.; 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.

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.

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.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, RG, _____, abaixo qualificado, declaro, para fins de participação, na condição de sujeito da pesquisa/ representante legal do sujeito da pesquisa, que fui devidamente esclarecido da Pesquisa intitulada: Avaliação da atividade da arginase na saliva de indivíduos com doença periodonal desenvolvido por Leonardo Weinschutz Gheren, aluno do Curso de Mestrado em Odontologia da Universidade de Taubate, quanto os seguintes aspectos:

Para melhor compreendermos como se desenvolvem as doenças periodontais, este trabalho tem por objetivo avaliar uma enzima presente na saliva. Para isso, uma pequena quantidade de saliva será recolhida em um pote plástico para depois ser analisada em laboratório. Haverá sigilo quanto a participação dos voluntários e estes não terão nenhum custo.

Declaro após esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto voluntariamente em participar da pesquisa.

Termo de consentimento livre e esclarecido

Sujeito da pesquisa: (nome) _____

RG: _____ Date de nascimento __/__/__ Sexo M() F ()

Endereço:

Bairro: _____ Cidade: _____ Cep: _____

Tel: _____

Assinatura do declarante

Declaração do pesquisador

Declaro para fins de realização de pesquisa, ter elaborado este Termo de consentimento livre e esclarecido, cumprindo todas as exigências contidas nas alíneas acima elencadas e que obtuve, de forma apropriada e voluntária, o consentimento do declarante acima qualificado.

Taubate, _____ de _____ de 200__

Assinatura do pesquisador

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Leonardo Weinschutz Gheren

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ARGINASE
NA SALIVA DE INDIVÍDUOS COM DOENÇA
PERIODONTAL**

Taubaté-SP
2006