

RODOLFO ASSIS LISBOA

**ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES
EM FIBROBLASTOS HUMANOS EM
CULTURA EXPOSTOS A FORÇA
ORTODÔNTICA SIMULADA**

**BELO HORIZONTE
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

RODOLFO ASSIS LISBOA

**ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES
EM FIBROBLASTOS HUMANOS EM
CULTURA EXPOSTOS A FORÇA
ORTODÔNTICA SIMULADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Geral.

Orientador: Prof. Dr. José Renan da Cunha Melo
Co-orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Melo Andrade

**BELO HORIZONTE
2006**

Lisboa, Rodolfo Assis

L769a Atividade de metaloproteinases em fibroblastos humanos em cultura expostos a força ortodôntica simulada/Rodolfo Assis Lisboa. Belo Horizonte, 2006.

87f.

Dissertação.(mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Medicina.

Área de concentração: Patologia Geral

Orientador: José Renan da Cunha Melo

Co-orientador: Marcus Vinícius Melo Andrade

1.Metaloproteases/secreção 2.Fibroblastos 3.Células cultivadas

4.Ligamento periodontal 5.Centrifugação 6.Estresse mecânico

7.Ortodontia/métodos I.Título

NLM: WU 400
CDU: 616.314

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Professor Ronaldo Tadêu Pena

Vice Reitor: Professora Heloisa Maria Murgel Starling

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Professor Jaime Arturo Ramirez

Diretor da Faculdade de Medicina: Professor Francisco José Penna

Vice Diretor da Faculdade de Medicina: Professor Tarcizo Afonso Nunes

Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Patologia:

Coordenadora: Professora Ana Margarida Miguel Ferreira Nogueira

Sub-Coordenador: Professor Geovanni Dantas Cassali

Professor Anilton César Vasconcelos

Professora Helenice Gobbi

Professora Silvana Maria Elói Santos

Professor Wagner Luiz Tafuri

Rafael Malagoli Rocha (Rep. Discente no colegiado)

Dedicatória

Ao meu pai, **José Fernando Lisboa**, que sempre foi o exemplo de comprometimento e seriedade profissional.

Agradecimientos

Ao **Professor José Renan da Cunha Melo** pela oportunidade de fazer pesquisa, pela orientação e por ensinar que a dedicação, a perseverança e o comprometimento são fundamentais para a qualidade de todo trabalho.

Ao **Professor Marcus Vinícius Melo de Andrade** pelos ensinamentos e orientações no laboratório.

Ao meu irmão, **Felipe Assis Lisboa**, que sempre me ajudou desde o início em todos os momentos, que me incentivou e deu força para a realização desse trabalho.

À minha mãe, **Arlete Assis Lisboa**, e ao meu irmão, **Thiago Assis Lisboa**, que me deram incentivo e apoio para a realização do trabalho.

Aos meus avôs, **Paulo e Benedito**, aos meus tios, **primos, e padrinhos** que sempre me apoiaram.

À **Dra Iramaya Rodrigues Caldas** pelo incentivo e direcionamento.

Aos amigos do Laboratório: **Adriana Kakehasi, André Portugal, Cristiano, Fabiana Alves, Fabiana Rodrigues, Gnana Kheith, Guilherme Castro, Gustavo Jacob, Gustavo Miranda, Helen Dias, Isabella Pontes, João Batista, Júlia Mara, Junio Rios, Klaus Morales, Laís Maroni, Paulo Roberto, Roberta Prado, Thaís Ferreira e Vinícius Couto** que de diversas maneiras me ajudaram e colaboraram para realização desse trabalho.

Ao **CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**, à **CAPES – Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior**, à **FAPEMIG – Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Minas Gerais** e ao **NIH – National Institutes of Health (EUA)**, pelo apoio financeiro.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Patologia**, à **professora Ana Margarida e professora Helenice Gobbi** pela oportunidade de fazer o curso de mestrado e compreensão dos imprevistos.

Aos Professores do Departamento Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas da Faculdade de Odontologia da UFMG: **Carlos Eduardo Assis Dutra, Carlos de Oliveira Gomes, Cláudio Rômulo Comunian, Evandro Guimarães de Aguiar, Evandro Neves Abdo, Luiz César Fonseca Alves, Luiz Cláudio Norman Ferreira, Marcelo Drummond Naves**, por me permitirem realizar a coleta de material necessário para a pesquisa.

Aos Cirurgiões-dentistas do Curso de Aperfeiçoamento em Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial da Faculdade de Odontologia da UFMG: **Adriano, Aécio, Anderson, André Luiz, Angélica, Alice, Bruno, Camila, Celso, Cristiano, Clarissa, Daniel, Danielle, Dea, Diogo, Eduardo Batista, Eduardo Oliveira, Fabrícia, Fernanda Barbosa, Fernanda Miranda, Francisco Carlos, Giovana, Gasiele, Guilherme, Igor, Janaína Gandra, Janaína Pedra, Júnia, Karina, Leandro, Lílian, Lucas, Luciane, Luis Henrique, Luis Flávio, Luiz Geraldo, Magda, Marcus Vinícius, Marcela, Maria Luíza, Rodrigo Garcelan, Rodrigo**

Guimarães, Rogger, Ricardo, Simone, Tatiana, Thiago Leal, Thiago Lisboa, Vanessa, Victor, Walter, Wilson e à funcionária **Cristina** do Bloco Cirúrgico da Faculdade de Odontologia da UFMG, que durante todo esse período de convivência colaboraram com a pesquisa.

Aos **Pacientes** atendidos no Curso de Aperfeiçoamento em Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Sua contribuição foi essencial para a realização desse trabalho.

À **Dra Agdemir Waléria Aleixo**, à **Sílvia Correa Cleto** do DIP que permitiram o uso do laboratório do DIP – Doença Infecto Parasitária da Faculdade de Medicina da UFMG

Aos meus amigos **Aline, Ana Luísa, Bruce, Francisco, Ludmilla, Mônica, Patrícia, Roberto** pelo apoio e por fazer os dias mais alegres.

“Nunca considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para conhecer a influência libertadora do reino do espírito para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade a qual seu futuro trabalho pertencer”.

Albert Einstein

Resumo

RESUMO

Introdução: A aplicação de força ortodôntica usada na movimentação dentária promove a compressão do ligamento periodontal estimulando a produção de mediadores inflamatórios e a remodelação tecidual, processo para o qual é necessária a síntese de metaloproteinases.

Objetivo: Estudar a atividade de metaloproteinases (MMPs) 2, 3, 7, 9 e 10 em culturas de fibroblastos humanos derivados do ligamento periodontal submetidos à simulação de força ortodôntica.

Método: Os fibroblastos foram submetidas à centrifugação (141g) e analisadas quanto à viabilidade celular, síntese e secreção de proteínas e atividade de MMPs por zimografia em gel de caseína e gelatina após 24, 48 e 72 horas.

Resultado: Observou-se queda na concentração de proteínas totais no lisado celular a partir de 48 horas ($p < 0,01$) e na atividade de pró-MMP 2 no meio de cultura em 24 ($p < 0,0001$) e 48 horas ($p < 0,05$) em relação aos grupos controle e estimulados.

Conclusão: O modelo de simulação de força ortodôntica através da centrifugação de culturas de fibroblastos do ligamento periodontal humano promove queda na excreção de proteínas e na atividade da pró-MMP 2.

Abstract

ABSTRACT

Introduction: The orthodontic force compresses the periodontal ligament promoting pro-inflammatory mediators as well as matrix metalloproteinases activity responsible for tissue rearrangement and tooth movement.

Objectives: To study the activity of matrix metalloproteinases (MMPs) 2, 3, 7, 9 e 10 in human fibroblasts derived from the periodontal ligament submitted to simulated orthodontic force.

Method: Human fibroblasts were submitted to a force of 141g during centrifugation, followed by analysis of cell viability, total protein quantification in lysate and medium and activity of matrix metalloproteinases either by gelatin or casein zimography after 24, 48 and 72 hours.

Results: A decrease on the total protein on cell lysate was observed at 48 and 72 hours after the stimulation ($p < 0,05$) with a decrease in pro-MMP 2 activity at 24 ($p < 0,0001$) and 48 hour ($p < 0,05$) in culture media.

Conclusion: The use of centrifugation as a model of simulated orthodontic force promotes decrease in the secretion of protein and on pro-MMP 2 activity in cultured human fibroblasts derived from the periodontal ligament.

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Imobilização do dente com porta-agulhas para extração do ligamento periodontal com lâmina de bisturi nº 12 24
- Figura 2:** Desenho esquemático de um dente erupcionado, mostrando a porção do ligamento periodontal utilizada para fazer as culturas celulares 25
- Figura 3:** Fragmentação do ligamento periodontal extraído (seta) para cultivo celular 25
- Figura 4:** Posicionamento dos explantes de forma ordenada no frasco de cultura com uma pipeta Pasteur estéril. Os explantes devem permanecer aderidos para que as células possam proliferar ocupando a superfície no fundo do frasco de cultura 26
- Figura 5:** Cultura confluyente de fibroblastos. As células ocupam toda a superfície do fundo do frasco de cultura 28
- Figura 6: A** - Esquema da estimulação das culturas. Todas as culturas eram lavadas com solução de NaCl a 0,9% e meio de cultura, sem soro fetal bovino, era adicionado. Uma placa de cultura era utilizada como controle e as demais centrifugadas a 141g durante 30, 60, 90 e 120 minutos. **B** - Esquema do horário de coleta das amostras. A cada intervalo (24, 48 e 72 horas) eram coletados o meio de cultura e o lisado celular 30
- Figura 7:** Placa de 96 poços com coloração decorrente da dosagem de proteínas no meio de cultura e no lisado celular realizada segundo a técnica de Bradford 33
- Figura 8:** Amostras (seta) diluídas em tampão não-redutor migrando no gel sob refrigeração a 4°C na cuba de eletroforese 35
- Figura 9:** Géis sendo descorados em solução de etanol e ác. acético após a revelação com Azul de Coomassie. As bandas de metaloproteinases aparecem como bandas claras em um fundo azul (setas pretas) 36
- Figura 10:** Ligamento periodontal obtido por raspagem da raiz do dente. Os fragmentos medem aproximadamente 10 x 5 mm 40
- Figura 11:** Viabilidade celular de fibroblastos em cultura submetidos a centrifugação por 141g por 30, 60, 90 e 120 minutos. Não há diferença da viabilidade em relação ao tempo de estimulação (*Kruskal-Wallis*, $p>0,05$) 41
- Figura 12:** Viabilidade celular nos intervalos de 24 horas (CTA, 30A, 60A, 90A e 120A), 48 horas (CTB, 30B, 60B, 90B e 120B) e 72 horas (CTC, 30C, 60C, 90C e 120C). Não são observadas diferenças entre os grupos 42
- Figura 13:** Concentração de proteínas totais presentes no lisado celular. É observada queda significativa nos grupos estimulados, em relação aos controles, nos períodos de 48 e 72 horas 43

Figura 14: Concentração de proteínas presentes no meio de cultura (<i>ANOVA</i> , $p>0,05$)	45
Figura 15: Densitometria da atividade da forma latente da metaloproteinase 2 presente na solução do lisado celular nos intervalos de 24 e 48 horas (<i>ANOVA</i> , $p>0,05$) e 72 horas (<i>Kruskal-Wallis</i> , $p>0,05$). Não há diferença entre os grupos	47
Figura 16: Densitometria da atividade da forma ativa da metaloproteinase 2 presente na solução do lisado celular (<i>Kruskal-Wallis</i> , $p>0,05$)	48
Figura 17: Gel de SDS-Poliacrilamida com gelatina mostrando a atividade da pró-MMP 2 (72kDa) e da MMP-2 (62kDa) presentes meio de cultura. A expressão da pró-MMP 2 nos grupos estimulados é inferior à dos grupos controle nos intervalos de 24 (<i>ANOVA</i> , $p<0,0001$) e 48 horas (<i>Kruskal-Wallis</i> , $p<0,05$) e aumenta significativamente com tempo de coleta em cada um dos grupos controle (<i>Kruskal-Wallis</i> , $p<0,01$) e de 90 (<i>Kruskal-Wallis</i> , $p<0,05$) e de 120 minutos de estimulação (<i>Kruskal-Wallis</i> , $p<0,05$). A forma ativa da MMP-2 aparece como uma banda muito fraca abaixo da Pró-MMP 2 (<i>Mann-Witney</i> , $p<0,001$)	49
Figura 18: Densitometria da atividade da forma latente da metaloproteinase 2 presente no meio de cultura. Observar queda significativa dos grupos estimulados comparados com os controles nos intervalos de 24 (<i>ANOVA</i> , $p<0,0001$) e 48 horas (<i>Kruskal-Wallis</i> , $p<0,05$)	50
Figura 19: Densitometria da forma ativa da metaloproteinase 2 presente no meio de cultura. Observar aumento da atividade entre os grupos controle (<i>Kruskal-Wallis</i> , $p<0,05$)	52

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagem de aproveitamento da extração do ligamento periodontal a partir da coleta de dentes	39
Tabela 2: Viabilidade celular média testada logo após a estimulação	41
Tabela 3: Viabilidade celular média testada 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas após a estimulação	42
Tabela 4: Concentrações médias (%) de proteínas totais presentes no lisado celular dos grupos testados em relação aos controles 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas após estimulação	44
Tabela 5: Concentrações médias (%) de proteínas totais presentes no meio de cultura dos grupos testados em relação aos controles 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas após estimulação	45
Tabela 6: Atividades médias (%) de pró-MMP 2 no lisado celular dos grupos testados em relação aos controles 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas após estimulação	47
Tabela 7: Atividades médias (%) de MMP-2 no lisado celular dos grupos testados em relação aos controles 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas após estimulação	48
Tabela 8: Atividades médias (%) de pró-MMP 2 presentes no meio de cultura dos grupos testados em relação aos controles 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas após estimulação	51
Tabela 9: Atividades médias (%) de MMP-2 presentes no meio de cultura dos grupos testados em relação aos controles 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas após estimulação	52

Lista de abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

Ala	Aminoácido alanina
Arg	Aminoácido arginina
Asp	Aminoácido ácido aspártico
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CBD	Domínio de ligação ao colágeno das metaloproteinases
CGF	Fluido crevicular gengival
CO ₂	Gás carbônico
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Cys	Aminoácido cisteína
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle Medium
Estromelisina 1	Metaloproteinase 3
Gelatinase A	Metaloproteinase 2
Gelatinase B	Metaloproteinase 9
Glu	Aminoácido ácido glutâmico
Gly	Aminoácido glicina
His	Aminoácido histidina
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
Matrilisina	Metaloproteinase 7
MMP	Metaloproteinase
MT-MMP	Metaloproteinase de membrana
NaCl	Cloreto de sódio
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PMA	<i>phorbol myristate acetate</i>
Pro	Aminoácido prolina
Pró-MMP	Forma latente da metaloproteinase
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
ST3	Estromelisina 3 – Metaloproteinase 11
TEMED	Tetra-metiletilenodiamina
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TNF- α	Fator de necrose tumoral - Alpha
Tris	Hidroximetil aminometano
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
CTA	Amostras do grupo controle coletado após 24 horas
30A	Amostras das culturas estimuladas por 30 minutos e coletadas após 24 horas
60A	Amostras das culturas estimuladas por 60 minutos e coletadas após 24 horas

90A	Amostras das culturas estimuladas por 90 minutos e coletadas após 24 horas
120A	Amostras das culturas estimuladas por 120 minutos e coletadas após 24 horas
CTB	Amostras do grupo controle coletado após 48 horas
30B	Amostras das culturas estimuladas por 30 minutos e coletadas após 48 horas
60B	Amostras das culturas estimuladas por 60 minutos e coletadas após 48 horas
90B	Amostras das culturas estimuladas por 90 minutos e coletadas após 48 horas
120B	Amostras das culturas estimuladas por 120 minutos e coletadas após 48 horas
CTC	Amostras do grupo controle coletado após 72 horas
30C	Amostras das culturas estimuladas por 30 minutos e coletadas após 72 horas
60C	Amostras das culturas estimuladas por 60 minutos e coletadas após 72 horas
90C	Amostras das culturas estimuladas por 90 minutos e coletadas após 72 horas
120C	Amostras das culturas estimuladas por 120 minutos e coletadas após 72 horas

Sumário

SUMÁRIO

RESUMO.

ABSTRACT.

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Generalidades do processo inflamatório	02
1.2 Os fibroblastos e o ligamento periodontal	03
1.3 Movimentação dentária e a força ortodôntica	05
1.4 As Metaloproteinases	08
1.5 Estimulação mecânica	15
1.6 Justificativa e relevância	16
2. OBJETIVOS	17
3. MÉTODO	19
3.1 Materiais	20
3.2 Coleta e processamento dos dentes	23
3.3 Explantes e preparo das culturas de fibroblastos	26
3.4 Simulação da força ortodôntica nas culturas	28
3.5 Teste de viabilidade celular	31
3.6 Dosagem de proteínas totais	32
3.7 Eletroforese de proteínas	33
3.8 Análise estatística	36
4. RESULTADOS	38
4.1 Coleta do ligamento periodontal e culturas de fibroblastos	39
4.2 Ligamento periodontal	39
4.3 Viabilidade celular logo após a estimulação	40
4.4 Intervalo de 24 horas após troca de meio do grupo controle e estimulação dos grupos teste	41
4.4.1 Viabilidade celular	41
4.4.2 Síntese e armazenamento de proteínas nas células	42
4.4.3 Presença de proteínas no meio de cultura	44
4.4.4 Comparação entre o teor de proteínas nas células e no meio de cultura	45
4.4.5 Atividade das metaloproteinases	46
4.4.5.1 Pró-MMP 2 no Lisado Celular	46
4.4.5.2 MMP 2 no Lisado Celular	47
4.4.5.3 Pró-MMP 2 no Meio de cultura	48
4.4.5.4 MMP 2 no Meio de cultura	51
4.4.6 Atividade da pró-MMP 2 comparada com a MMP-2 no lisado celular e no meio de cultura	53
4.5 Intervalo de 48 horas após troca de meio do grupo controle e estimulação dos grupos teste	53
4.5.1 Viabilidade celular	53
4.5.2 Síntese e armazenamento de proteínas nas células	53
4.5.3 Presença de proteínas no meio de cultura	54
4.5.4 Comparação entre o teor de proteínas nas células e no meio de cultura	54
4.5.5 Atividade de pró-MMP 2 no lisado celular	55
4.5.6 Atividade de MMP-2 no lisado celular	55
4.5.7 Atividade de pró-MMP 2 no meio de cultura	55

4.5.8	Atividade de MMP-2 no meio de cultura	56
4.5.9	Atividade da pró-MMP 2 comparada com a MMP-2 no lisado celular e no meio de cultura	56
4.6	Intervalo de 72 horas após troca de meio do grupo controle e estimulação dos grupos testados	57
4.6.1	Viabilidade celular	57
4.6.2	Síntese e armazenamento de proteínas nas células	57
4.6.3	Presença de proteínas no meio de cultura	58
4.6.4	Comparação entre o teor de proteínas nas células e no meio de cultura	58
4.6.5	Atividade de pró-MMP 2 no lisado celular	58
4.6.6	Atividade de MMP-2 no lisado celular	58
4.6.7	Atividade de pró-MMP 2 no meio de cultura	59
4.6.8	Atividade de MMP-2 no meio de cultura	59
4.6.9	Atividade da pró-MMP 2 comparada com a MMP-2 no lisado celular e no meio de cultura	59
5.	DISCUSSÃO	61
5.1	Método	63
5.2	Estimulação das culturas	65
5.3	Viabilidade celular	66
5.4	Coleta do material	68
5.5	O zimograma	68
5.6	A ação da força mecânica	71
5.7	Perspectivas futuras	75
6.	CONCLUSÃO	76
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
	ANEXOS	84

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Generalidades sobre o Processo Inflamatório

A inflamação é um processo reacional muito freqüente, podendo ser causada por agentes, químicos, físicos ou biológicos. Tais agentes, atuando sobre o tecido, induzem a liberação de mediadores, que produzem alterações hemodinâmicas com exudação de plasma e células sanguíneas para o interstício. Os mediadores inflamatórios de ação imediata têm a função de promover o início dos fenômenos vasculares e exsudação; já os de ação tardia agem na manutenção dos fenômenos inflamatórios e nos processos reparativos, podendo levar à inflamação crônica ou à resolução do processo inflamatório⁽¹⁾.

O tecido inflamado pode sofrer modificações progressivas pela ocorrência de angiogênese e de neoformação conjuntiva para reparação da lesão inflamatória. Tanto o transudato de proteínas plasmáticas como o exsudato de células inflamatórias são eventos iniciais nesse processo. As cininas e as proteínas plasmáticas são responsáveis pelo aumento do edema e da pressão oncótica intersticiais. Certas enzimas atuam sobre a substância fundamental amorfa provocando a quebra de moléculas de proteoglicanos e, juntamente com células inflamatórias, responsáveis pela fagocitose e processamento dos remanescentes da resposta inflamatória, contribuem para a remodelação do tecido. A reparação prossegue com atuação de fibroblastos na síntese e reorganização de colágeno e de outras proteínas estruturais. Dentre as enzimas de ação local responsáveis pela degradação e remodelamento do colágeno e de outras

proteínas estruturais do tecido conjuntivo destacam-se as do grupo das metaloproteinases ⁽¹⁾.

1.2 Os Fibroblastos e o Ligamento Periodontal

Os fibroblastos constituem uma população celular altamente diversa com fenótipos diferentes em um mesmo tecido, derivadas dos tecidos mesenquimais sendo responsáveis pela síntese e degradação fibrosa e não-fibrosa de proteínas da matriz extracelular e de vários fatores solúveis. Eles são capazes de sintetizar fibras colágenas, do tipo I e III, reticulares, elásticas, proteoglicanos e glicoproteínas da matriz extracelular para formar a estrutura da matriz extracelular ⁽²⁾.

O fibroblasto é capaz de síntese simultânea de mais de um tipo de proteína de matriz e sua morfologia sugere a presença de múltiplos perfis de retículos endoplasmáticos rugosos e mais de um aparelho de Golgi em atividade. À microscopia eletrônica surgem diferentes densidades de foco ao longo da membrana plasmática que são identificadas como pontos de comunicação do citoesqueleto; proteínas integrais de membrana como os receptores de integrinas e uma variedade de proteínas da matriz incluindo a laminina, fibronectina, vitronectina, trombosodina e o colágeno ⁽²⁾.

Há um grande interesse no esclarecimento dos meios de estimulação dos fibroblastos, devido à sua capacidade proliferativa e de síntese, na cicatrização de feridas ⁽²⁾.

Culturas primárias de fibroblastos do ligamento periodontal revelam a expressão de vimentina, proteína presente nos filamentos intermediários, assim como síntese e deposição de colágeno tipo I e fibronectina ⁽³⁾. Quando estimulados com TNF- α ou IL-1 β produzem PGE₂ por um processo mediado pelas ciclooxigenases. A aplicação local de PGE₂ no periodonto de roedores, primatas e seres humanos com dentes submetidos à força ortodôntica aumentou as taxas de movimentação dentária ⁽⁴⁾.

O reconhecimento de que fibroblastos são células mecano-sensíveis com papel importante em processos patológicos, estimula o desenvolvimento de modelos *in vitro* para estudar a resposta dos fibroblastos a estímulos mecânicos ⁽⁵⁾.

O ligamento periodontal é o tecido conjuntivo situado entre a raiz dos dentes e o osso alveolar e atenua as forças mecânicas como a oclusal e a ortodôntica ^(6,7).

O ligamento é composto por componentes celulares e intercelulares. Dentre os componentes intercelulares, a matriz extracelular, por exemplo, é composta basicamente por elementos fibrosos e substância fundamental. O principal elemento fibroso é o colágeno (tipos I e III), que atua na resistência às forças, mantendo o dente em contato com o osso alveolar. Os principais componentes da substância fundamental do ligamento periodontal são proteoglicanos e glicoproteínas ⁽⁶⁾.

O ligamento periodontal funciona como fonte de células pluripotentes e de mediadores que controlam funções celulares nos tecidos vizinhos. É composto de elementos acelulares, de células endoteliais, fibroblastos e macrófagos residentes. As

células endoteliais são encontradas em monocamadas sobre uma membrana basal de colágeno, contribuindo para a formação de capilares periodontais. Elas produzem metaloproteinases e sintetizam colágeno extracelular. Contribuem para a degradação e reconstrução vascular do periodonto e para o remodelamento da matriz extracelular durante o movimento dentário ^(4, 8).

1.3 Movimentação Dentária e a Força Ortodôntica

O crescimento craniofacial é acompanhado por constantes migrações dentárias, com o preenchimento dos espaços formados na base da maxila e da mandíbula ⁽⁹⁾.

Processos específicos responsáveis pela mudança na posição dos dentes e pela erupção dos mesmos ocorrem no ligamento periodontal e no osso alveolar ⁽⁹⁾.

No deslocamento do dente, há diferenciação celular no lado de pressão com ativação de osteoclastos cuja função é a de reabsorver a parede do osso alveolar. Após a reabsorção, os osteoblastos se encarregam de depositar nova matriz óssea nas lacunas de reabsorção (*Lacunae de Howship*) onde novas fibras do ligamento periodontal serão conectadas. Esse processo de restauração das fibras periodontais ocorre tanto na parede óssea quanto na superfície radicular, com o rompimento dos ligamentos fibrosos ^(6, 10, 11).

No lado de tensão, predomina a deposição óssea concomitante ao rearranjo dos ligamentos periodontais. Existem fibras remanescentes ao processo de reabsorção que

serão religadas e novas fibras dento-alveolares (*Fibras de Sharpey*) que serão formadas pelos fibroblastos migrados do tecido ósseo adjacente. O espaço periodontal tende a permanecer com sua extensão original apesar das mudanças ocorridas com o posicionamento do dente ^(6, 9, 10).

A pressão no ligamento periodontal durante a aplicação de força ortodôntica leva à compressão vascular e alteração do fluxo sanguíneo durante o movimento ortodôntico. Essas mudanças provocam ativação celular com a liberação de moléculas pró-inflamatórias no ligamento periodontal, como citocinas e prostaglandinas ⁽⁴⁾.

O equilíbrio molecular entre a síntese de colágeno e a sua degradação no periodonto, pode ser alterado pela aplicação de força. Entretanto esse mecanismo ainda não é bem esclarecido ^(12, 13).

No eixo principal de deslocamento do dente, as zonas de pressão e de tensão são bem definidas, após a aplicação da força ortodôntica, nas margens do deslocamento ocorre uma combinação entre tensão e pressão, com estiramento das fibras colágenas ⁽⁹⁾.

A extensão do espaço periodontal pode variar de 0,2 a 0,25 mm em consequência da atividade celular. Quando existem forças maiores atuando sobre os dentes, como no caso da movimentação ortodôntica, os espaços periodontais serão maiores, o que determinará um aumento na atividade celular ⁽⁹⁾.

O movimento ortodôntico é baseado na aplicação de pressão de forma prolongada nos dentes resultando em remodelamento das estruturas periodontais, o que inclui o osso alveolar e o ligamento periodontal. A força aplicada na terapia ortodôntica deve ser capaz de promover a máxima resposta tecidual mantendo a vitalidade dos tecidos periodontais, sem, contudo, causar reabsorção radicular e dor. Ela pode ser empregada de forma contínua, interrompida-contínua e intermitente ^(4, 9).

O processo de reabsorção pode ser observado após 12 horas de aplicação da força ortodôntica com sensível aumento de células periodontais após 30 a 40 horas ⁽⁹⁾.

A aplicação de forças no estudo da resposta dos tecidos, com relação às alterações celulares com reconstrução de fibras colágenas já foi utilizada em ensaios para elucidar e entender melhor o mecanismo de remodelamento do tecido conjuntivo ⁽⁹⁾.

As mudanças morfológicas e histoquímicas nas células do ligamento periodontal tem sido, também, investigadas. Menor atenção foi dedicada ao estudo da presença das metaloproteinases no periodonto em resposta a forças mecânicas. Sabe-se, porém, que a atividade total de collagenase no fluido crevicular gengival (GCF) de pacientes em tratamento ortodôntico com aparelhos fixos apresenta um aumento significativo durante o período de 1 mês de tratamento ⁽¹²⁾.

O aumento na produção de MMP-1, MMP-2, TIMP1 e TIMP2 foi comprovado em fibroblastos humanos gengivais e periodontais submetidos à pressão contínua *in vitro*, sem aumento da expressão de MMP-9 nessas células ^(3, 12).

A expressão de RNAm de MMP-8 e MMP-13 em ratos aumenta durante o movimento dentário. Este, pode ser inibido pelo uso de supressores de metaloproteinases nesses animais ^(14, 15).

1.4 As Metaloproteinases

As metaloproteinases (MMPs), produzidas por vários tipos celulares, como fibroblastos e células endoteliais, são endopeptidases dependentes de zinco com um domínio estrutural de forma latente (Pró-MMP) e ativadas por remoção proteolítica da terminação pró-peptídica amino-terminal. Elas têm ampla participação nos processos de desenvolvimento embrionário, cicatrização, remodelamento tecidual, angiogênese e nas reações inflamatórias de natureza infecciosa, neoplásica, traumática ou auto-imune. Exercem importante papel na quebra e reorganização de componentes da matriz extracelular incluindo o colágeno, a fibronectina e a laminina. ^(4, 16, 17, 18, 19).

Já foram identificados mais de 20 membros diferentes de MMPs, incluindo colagenases (MMP-1, -8 e -13), gelatinases (MMP-2 e -9), estromelisinases (MMP-3, -11 e -10), matrilisina (MMP-7), e metaloproteinases de membrana ou MT-MMPs (MMP-14, -15, -16 e -17), cada uma com substratos específicos, o que pode ser explicado pela presença de domínios estruturais específicos ^(20, 21, 22).

A colagenase intersticial (MMP-1), é produzida, principalmente por fibroblastos, a colagenase neutrofílica (MMP-8), por neutrófilos e a colagenase 3 (MMP-13) é produzida, principalmente, por osteoblastos ^(23, 24, 25).

As gelatinases são uma subfamília das metaloproteinases que degradam as membranas basais de colágeno tipo IV e V, vitronectina e elastina. Elas são secretadas nos compartimentos intercelulares como formas latentes que requerem um processo proteolítico da região N-terminal, com perda de um peptídeo de aproximadamente 10 KDa para se tornarem ativas. Apresentam capacidade de degradar colágeno nativo tipo I, IV, V, VII, VIII, XI e gelatina e possuem alta especificidade para o colágeno desnaturado^(22, 26, 27, 28).

A estrutura básica da maioria das metaloproteinases é caracterizada pela presença de domínios protéicos: um pró-domínio, um domínio ativo, um domínio de ligação com Zn^{2+} , todas as metaloproteinases, com exceção das MMP-7 e MMP-26 contêm um domínio de hemopexina carboxi-terminal adicional. As metaloproteinases de membrana (MT-MMPs) fazem conexão com a membrana através de uma âncora hidrofóbica terminal carboxílica. As gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9) apresentam ainda um domínio de fibronectina de ligação à gelatina. A MMP-9 tem um domínio de colágeno tipo V rico em Ser/Thr/Pro. Comparada com as outras MMPs, a gelatinase B é a que apresenta a estrutura mais complexa^(23, 29).

As duas metaloproteinases, MMP-2 e MMP-9 contêm três módulos de fibronectinas tipo II, que formam o domínio de ligação ao colágeno (CBD). Investigações anteriores demonstraram que virtualmente todas as propriedades de ligação ao colágeno das MMP-2 e MMP-9 residem nestes domínios. CBD-recombinantes (rCBD) isolados de MMP-2 se ligam especificamente não somente ao colágeno tipo I, mas também a uma série de tipos de colágeno e elastina nativos e desnaturados, que são substratos para a MMP-2 e heparina^(19, 29).

A MMP-2 é expressa constitutivamente por vários tipos celulares, especialmente em fibroblastos, e a MMP-9 por células epiteliais, neutrófilos e eosinófilos. As metaloproteinases são independentemente reguladas por diferentes citocinas e fatores de crescimento. Alterações da matriz extracelular geram profundos efeitos no comportamento de células endoteliais^(22, 28, 30, 31).

As Estromelinas (MMP-3, MMP-10, MMP-11 e MMP-12) e a matrilisina (MMP-7) degradam a maioria dos tipos de colágeno, fibronectina, lamininas, elastinas, gelatinas e o núcleo protéico dos proteoglicanos^(21, 30, 32).

A estromelina 3 (MMP-11) é secretada durante os processos de reparo tecidual, implantação do trofoblasto, e involução de glândulas mamárias e contribui para intensa remodelação tecidual⁽²³⁾.

Mutações nos CBDs impedindo sua expressão resultaram em reduzida atividade gelatinolítica e ausência de propriedades elastinolítica na MMP-2 bem como em alterações na degradação de colágeno tipo XI e da gelatina na MMP-9⁽¹⁹⁾.

O domínio de ligação ao Zn^{2+} contém uma seqüência conservada dos aminoácidos ala-his-glu-x-gly-his-x-x-gly-x-x-his (onde x significa qualquer aminoácido), e as três histidinas são responsáveis pela ligação ao íon Zn^{2+} . O domínio de ligação ao Zn^{2+} forma um sitio ativo que, com o domínio ativo são essenciais para a atividade enzimática⁽²³⁾.

Na pró-enzima, o quarto ligante do Zn^{2+} é a cisteína da seqüência pro-arg-cys-

gly-x-pro-asp do pró-domínio. Este ligante pode ser removido por vários tipos de proteólises ou modificado pela ligação do substrato para permitir a atividade enzimática ⁽²³⁾.

A função do domínio de hemopexina não é muito clara. Uma das hipóteses sugere que a hemopexina contribui para a especificidade dos substratos nas colagenases. Porém, para a gelatinase B, é mais evidente que ela seja importante para a ligação de inibidores das metaloproteinases teciduais (TIMPs). As repetições das unidades de fibronectina tipo II na MMP-9 são as responsáveis pela ligação à gelatina, laminina e colágeno tipo I e IV, em contraste com as colagenases, onde a capacidade de ligação ao colágeno é conferida pelo domínio de hemopexina. O estado de ativação da gelatinase B também é importante, pois a pró-MMP 9 se liga, com maior afinidade, ao colágeno tipo I e à gelatina e, com menor afinidade, ao colágeno tipo IV, quando comparada com a forma ativa ⁽²³⁾.

O domínio de hemopexina C da MMP-2 não se liga ao colágeno tipo I nativo ou desnaturado apesar dessa função ser realizada pelos módulos de fibronectina tipo II dentro do sítio catalítico da MMP-2. Esse sítio é organizado de forma a criar um domínio compacto de ligação ao colágeno (CBD) ⁽¹⁹⁾.

A estromelisina-1 (MMP-3) e a matrilisina (MMP-7) têm um domínio estrutural similar com relação às gelatinases e exibem uma larga especificidade de substratos. Elas degradam proteoglicanos, gelatinas, elastina e glicoproteínas como a fibronectina e a laminina ⁽²¹⁾.

A largura da fenda do sítio ativo (diâmetro de 5Å) das MMPs não consegue acomodar todas as três cadeias α (diâmetro de 15Å) de colágeno. A tripla hélice de colágeno deve ser desenrolada previamente à clivagem em um processo dependente da atividade tripla de helicases. O domínio catalítico das MMPs isolado não consegue clivar a tripla hélice do colágeno e necessita de outros sítios de ligação fora da fenda do sítio ativo para a clivagem do colágeno nativo⁽²⁷⁾.

As metaloproteinases humanas e murinas apresentam seqüências gênicas e a distribuição de 13 exons e íntrons similares. Análises citogenéticas da gelatinase B em comparação com a de outras MMPs mostraram que os genes das MMPs se localizam no cromossomo 11q22. Os genes das MT-MMPs (metaloproteinases de membrana) estão em loci diferentes e a gelatinase B ocupa um único locus no cromossomo 20q12-q13. O locus do gene da gelatinase B murina foi identificado no cromossomo 2 e o da estromelina 3 (ST3, MMP-11) no cromossomo 22q11,2⁽²³⁾.

As MMPs são reguladas por mecanismos de transcrição gênica, secreção, ativação, inibição e glicosilação, mas os seus genes não são expressos em todos os tipos de células. A expressão da gelatinase B geralmente não apresenta níveis basais detectáveis e só pode ser observada após a transcrição do gene e síntese de *RNA_m*. Na maioria das células, a transcrição genética é induzida e só depois da tradução do *RNA_m* é que a enzima passa a ser secretada pelos mecanismos normais^(23, 30). Na indução e ativação das gelatinases participam componentes da matriz extracelular, incluindo a fibronectina, colágeno tipo I e IV⁽²²⁾.

A ativação das gelatinases pode ser induzida nas células endoteliais humanas

por agentes não fisiológicos como “*phorbol myristate acetate*” (PMA) que é responsável pela fosforilação da proteína Kinase C. Mudanças nos componentes da matriz extracelular como a matriz de colágeno tipo I, podem alterar a secreção e a ativação de células humanas endoteliais⁽²²⁾.

A maioria das MMPs é liberada na forma de pró-enzima, e sua ativação envolve interferência de proteinases incluindo das próprias metaloproteinases. Os inibidores endógenos, TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4), podem inibir virtualmente todos os membros da família das metaloproteinases. O equilíbrio entre os TIMPs e as MMPs é importante para a regulação de proteólise⁽³⁰⁾.

A Interleucina – 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral - α (TNF - α) estimulam a produção de MMPs incluindo a gelatinase B. A expressão de gelatinase A, contudo, não são alteradas com essas citocinas^(23,32).

A presença da estromelina 3 (MMP-11) foi demonstrada em fibroblastos do estroma localizados ao redor das células tumorais em vários tipos de carcinomas humanos, incluindo os mamários e o de células basais, o que sugere sua participação na progressão desses tumores. A estromelina 3, também, foi encontrada em células musculares lisas, células endoteliais e macrófagos presentes nas lesões ateroscleróticas, mas não no tecido vascular normal^(23,33).

Como outras metaloproteinases, a estromelina 3 é secretada durante os processos de reparo tecidual, implantação do trofoblasto e involução de glândulas mamárias, participam em todos os processos onde ocorre em intensa remodelação

tecidual ⁽²³⁾.

Poucos hormônios foram relacionados com a expressão de MMPs. Em estudos de indução de metamorfose por hormônio tireoidiano em girinos, a MMP-11 apresentou altos níveis de *RNAm* detectáveis em fibroblastos ⁽⁸⁾. No endométrio humano, a MMP-11 foi encontrada durante a fase proliferativa e inibida pela progesterona ^(23, 34, 35).

As metaloproteinases ocorrem em sítios de remodelamento do tecido gengival e no fluido crevicular gengival em pacientes com doença periodontal. Em condições normais, elas participam do remodelamento periodontal e seu controle feito pelos TIMPs, que mantém o equilíbrio entre degradação e regeneração da matriz extracelular, em condições fisiológicas ^(36, 37).

Técnicas de zimografia de gel com gelatina e de gel com caseína, são usadas para a detecção da atividade de metaloproteinases porque são de simples execução e de alta sensibilidade. Elas permitem a identificação de enzimas específicas em uma mistura complexa de proteinases e a estimativa do peso molecular das formas latente e ativada da enzima devido aos processos de desnaturação e renaturação aos quais o gel pode ser submetido ⁽²¹⁾.

A zimografia em gel com gelatina é um método simples e muito sensível largamente utilizado na detecção da atividade da MMP-2 e MMP-9, porém, não muito utilizada para outras MMPs que apresentam atividade gelatinolítica fraca ou ausente.

A zimografia em gel de caseína é mais sensível para estudar a atividade de MMP-3, MMP-10 e da MMP-7⁽³⁸⁾.

1.5 Estimulação Mecânica

Para simular a ação da força ortodôntica *in vitro*, alguns estudos têm utilizado a centrifugação de culturas de fibroblastos como estímulo^(11, 39, 40).

Em culturas de fibroblastos, provenientes do ligamento periodontal e da gengiva, estimulados por força mecânica, foi observado aumento nas concentrações de fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF)^(6, 40).

O efeito da força centrífuga na produção de colágeno tipo I e de colagenases provocou aumento na transcrição gênica e níveis detectáveis de *RNAm* de colagenase em fibroblastos gengivais caninos⁽¹¹⁾.

Culturas de fibroblastos do ligamento periodontal estimuladas por diferentes gradientes de centrifugação demonstraram aumento dos níveis de *RNAm* de tropoelastina, β -actina e MMP-1, mas não de colágeno tipo I e TIMP 1 e 2^(39, 42).

A força mecânica pode alterar as interações entre as células e a matriz extracelular. A proliferação celular sofreu pouca alteração nesse processo, entretanto, a adesão a componentes da matriz extracelular diminuiu significativamente⁽⁴⁰⁾.

É sugerido que a força mecânica afeta uma variedade de processos no ligamento periodontal, incluindo os níveis de cálcio, transdução de sinal, expressão gênica além da síntese de proteínas⁽⁴¹⁾.

1.6 Justificativa e Relevância

Os efeitos celulares da força ortodôntica simulada ainda não são bem esclarecidos com relação à expressão de mediadores inflamatórios, apesar da comprovação da síntese de *RNAm* correspondente a vários desses mediadores. As metaloproteinases, foram bem caracterizadas quanto à sua participação em processos auto-imunes, infecciosos, traumáticos e relacionados a micro-ambientes neoplásicos, mas pouco se conhece da sua expressão em células estimuladas com força mecânica.

Este projeto visa aperfeiçoar o modelo experimental de força ortodôntica simulada e estudar seus efeitos na síntese de metaloproteinases em fibroblastos humanos retirados do ligamento periodontal, em cultura.

Acredita-se que a compreensão desses mecanismos poderá contribuir para uma interpretação mais detalhada da participação de mediadores da resposta inflamatória relacionada à movimentação dentária, dor, oclusão, reabsorção radicular e óssea, tempo de tratamento e ao agravamento dos estados de degradação do colágeno, nos casos de doença periodontal e contribuir para o planejamento ortodôntico.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Estudar em culturas de fibroblastos humanos, derivados do ligamento periodontal, submetidos à simulação de força ortodôntica comparados aos de fibroblastos não estimulados:

- A produção e excreção das seguintes metaloproteinases: MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 e MMP-10, e a diferenciação entre suas formas latente e ativa.
- A produção e excreção de proteínas.
- A viabilidade celular.

Método

3. MÉTODO

3.1 Materiais

Culturas de fibroblastos

Reagentes:

Meio de cultura:

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, n° cat.12800-017); Soro Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*, Sigma n° cat. F-0643); *Antibiotic-Antimycotic* (Gibco, n° cat. 15245-012); Hidrocortisona, (Cortisonal, União Química Farmacêutica Nacional S/A); Água deionizada; Cloreto de Sódio P.A.(Carlo Erba Reagents, n° cat. 7647-14-5); Solução de Tripsina (*Trypsin-EDTA*, Gibco n. 25300-062); Etanol (Álcool Absoluto, EMFAL Ltda., Betim, Minas Gerais).

Equipamentos:

Capela de Fluxo Laminar (VECO); Incubadora com fonte de CO₂ a 5% (*Queue*, USA); Deionizador de água Milli-Q Millipore; Microscópio de campo invertido (Zeiss Axiovert 25); Agitador (*Orbital shaker thermolyne* Aros 160); Centrífuga Eppendorf, 5804 R; Micropipetas Eppendorf (1000 a 100 µL); Cronômetro; Pipetas de Pasteur; Pipetas graduadas (5 e 10 ml); Ponteiras para micropipetas; Placas de Petri; Tubos de base cônica graduados (15 e 45 ml); Frascos para cultura de células do tipo T25; Placa de cultura com 6 poços NUNCTM; Tubos eppendorf de 500 µL; Instrumental cirúrgico (bisturi com lâmina n° 12, porta-agulha, tesoura e pinça anatômica); Beakers 50 mL; Filtros de cultura (NALGENE 0,45 µm); Seringas de 3 mL e agulhas, 25 x 7 mm estéreis (Plastipak);

Viabilidade celular

Reagentes:

Tripsina (*Trypsin-EDTA*, Gibco n. 25300-062); Azul de Trypan (*Trypan Blue Stain* 0,4%, BIOWHITTAKER n. 17-942E);

Equipamentos:

Microscópio de campo invertido (Zeiss Axiovert 25); Agitador (*Orbital shaker thermolyne* Aros 160); Centrífuga HITACHI himac CT6D; Tubos de base cônica graduados (15 e 45 ml); Tubos eppendorf de 500 μ L; Contador de células; Câmara de Neubauer; Micropipetas Eppendorf (100 a 1000 μ L e de 10 a 100 μ L); Micropipetas Gilson (1 a 20 μ L); Ponteiras para micropipetas; Pipetas de Pasteur;

Dosagem de proteínas

Reagentes:

Kit de dosagem de proteínas (BCA Protein assay reagent kit, PIERCE, cat. 23227)

Equipamentos:

Espectrofotômetro calibrado a 546 nm; Agitador (*Vortex mixer*); Placa de 96 poços; Micropipetas Eppendorf (100 μ L a 10 μ L e de 20 μ L a 1 μ L); Ponteiras para micropipetas; Tubos Eppendorf 500 μ L.

Eletroforese de proteínas

Reagentes:

Ácido Acético glacial (100%, Merck Kgaa, n° cat. 64271); Acrilamida (Bio-Rad, n° cat. 161-0103); Azul de Bromofenol (*Bromophenol Blue*); Bicarbonato de Sódio P.A. (Reagen, Quimibrás Indústrias Químicas S.A.); Bis-N-N-acrilamida (Bio-Rad, n° cat. 161-0201); caseína, Sigma, n° cat. C-0376; cloreto de cálcio

dihidratado granulado (J.T.BAKER Ltda., n° cat.1332); cloreto de sódio P.A.(Carlo Erba Reagents, n° cat. 7647-14-5); coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad, n°cat. 161-0400); Etanol (Álcool Absoluto, EMFAL Ltda., Betim, Minas Gerais); gelatina (Reagen, Quimibrás Indústrias Químicas S.A.); glicina (Bio-Rad, n° cat. 161-0724); glicerol (Sigma, n° cat. G-2289); HCl 37% (Merck); metanol (*spectrophotometric grade*, Sigma, n° cat. m-3641); persulfato de amônio (Bio-Rad, n° cat. 161-0700); SDS (Bio-Rad, n° cat. 161-0302); TEMED (Bio-Rad, n° cat. 161-0800); Tris (Bio-Rad, n° cat. 161-0719); Triton X-100 (Sigma, n° cat. X-100).

Equipamentos:

Mini-PROTEAN[®] 3 Cell (Bio-Rad, n° cat. 165-3301); Gerador elétrico (SX 250 *power supply, mighty slim*, Hoefer); micropipetas Eppendorf (1000 a 100 µL e de 20 a 1 µL); ponteiras para micropipetas; Espátulas e cuba para eletroforese; Pipetas graduadas (5 e 10 mL); aspirador pipette pump (Bel-Art Products); tubos de base cônica graduados 15 mL; cubas para incubação e revelação do gel; scanner Genius (ColorPage-Vivid Pro II).

3.2 Coleta e processamento dos dentes

Os fibroblastos humanos eram obtidos a partir de amostras de tecido periodontal proveniente de excedentes de cirurgias de exodontia. Todos os pacientes envolvidos no estudo assinaram um termo de consentimento previamente apresentado, e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP.

Os dentes eram coletados no Centro Cirúrgico da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais de forma asséptica. Após a ressecção cirúrgica, eles eram lavados em solução de NaCl a 0,9% e acondicionados em meio de cultura a 4°C composto por DMEM com 10% de soro fetal bovino, penicilina a 100 U/mL, estreptomicina a 100 µg/mL, anfotericina B a 2,5 µg/mL e hidrocortisona a 10 µg/mL, até seu transporte para o laboratório de cultura de células na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, onde toda manipulação era realizada em capela de fluxo laminar empregando-se técnica asséptica.

Critérios definidos para a seleção dos dentes:

- Hígidos sem ocorrência de cárie ou doença periodontal e com mais da metade da raiz formada;
- Ausência de odontosseção que inviabilize a remoção do ligamento.

Cada dente era banhado em etanol a 70% estéril durante 20 segundos para

descontaminação bacteriana, lavado 4 vezes com solução de NaCl a 0,9% para a remoção do etanol e remanescentes de sangue, e transferido para uma placa de petri.

A remoção do ligamento periodontal era realizada com o auxílio de porta-agulhas e lâmina de bisturi n° 12. Os dentes eram imobilizados com o porta-agulhas pela coroa e com a parte traseira da lâmina de bisturi, era feita a raspagem da raiz do dente para a remoção do tecido (Figura 1).

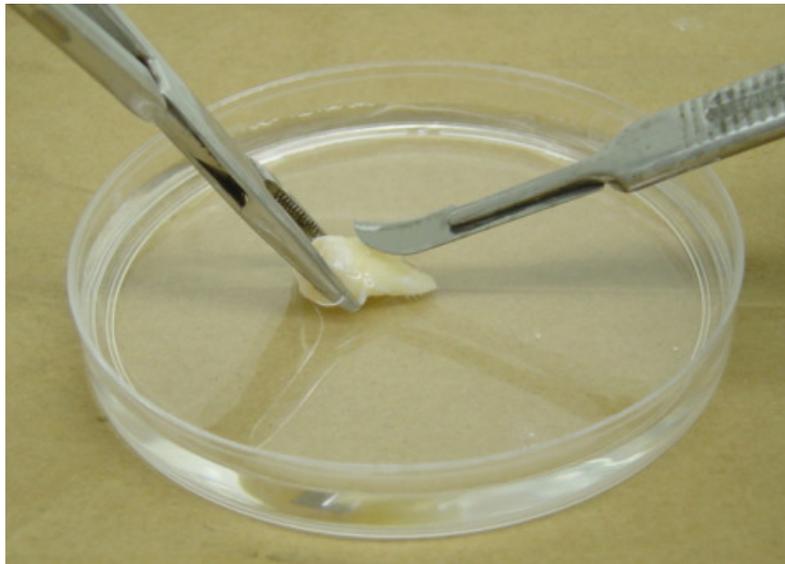


Figura 1: Imobilização do dente com porta-agulhas para extração do ligamento periodontal com lâmina de bisturi n° 12.

Partes do terço coronário e terço apical do ligamento periodontal eram desprezadas para evitar a contaminação por fibroblastos gengivais ou provenientes do saco pericoronário, bem como de fibroblastos provenientes da polpa dentária (Figura 2).

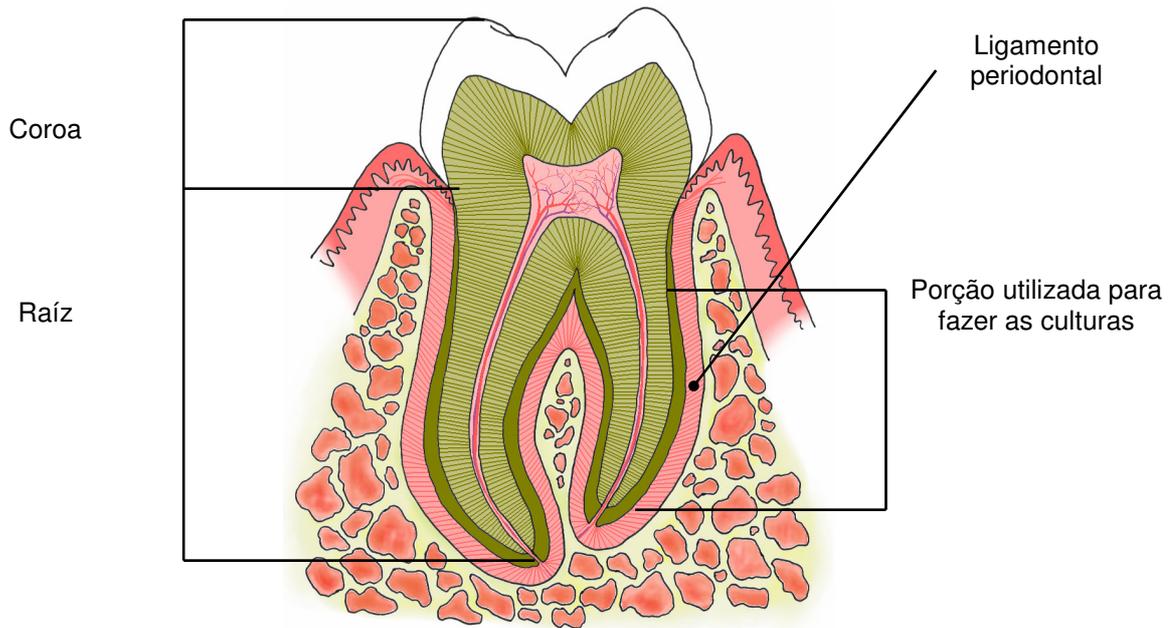


Figura 2: Desenho esquemático de um dente erupcionado, mostrando a porção do ligamento periodontal utilizada para fazer as culturas celulares.

As amostras de tecido periodontal eram recortadas com o uso de uma pinça e tesoura pequenas, em fragmentos de aproximadamente 2 mm² (Figura 3).



Figura 3: Fragmentação do ligamento periodontal extraído (seta) para cultivo celular.

3.3 Explantes e preparo das culturas de fibroblastos

Após o processamento do tecido, os fragmentos eram transferidos para um frasco de cultura de 25 cm² e posicionados de forma ordenada no fundo do frasco.

Com a ajuda de uma pipeta Pasteur estéril, era feita a remoção do excesso de solução salina dos explantes a fim de que eles aderissem no frasco de cultura sem sofrer desidratação (Figura 4).

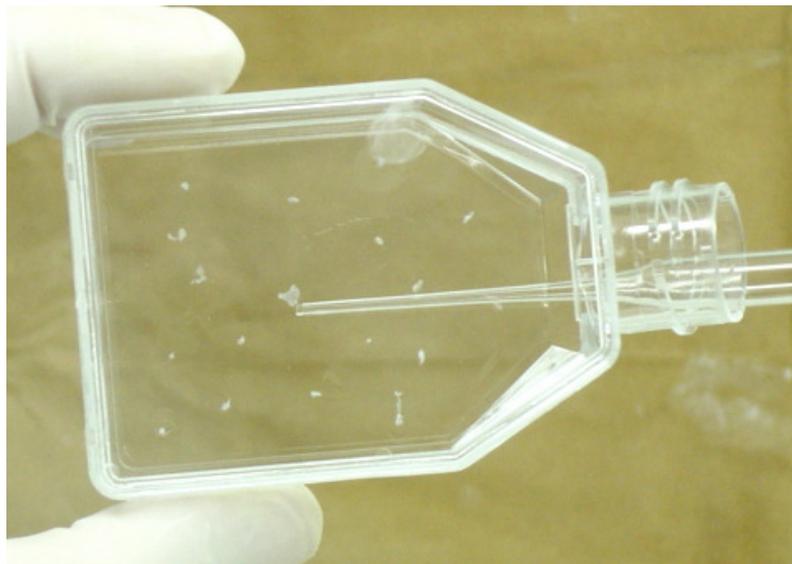


Figura 4: Posicionamento dos explantes de forma ordenada no frasco de cultura com uma pipeta Pasteur estéril. Os explantes devem permanecer aderidos para que as células possam proliferar ocupando a superfície no fundo do frasco de cultura.

Com o frasco na posição vertical, eram acrescentados 5 mL do meio de cultura e com a ajuda de uma nova pipeta Pasteur, os fragmentos eram levemente banhados em meio para evitar que fossem removidos com a inclinação do frasco para a posição horizontal.

Os frascos eram numerados e transferidos para a estufa de cultura de células a 37° e 5% de CO₂. A manipulação desse frasco deve ser a mínima possível e com muito cuidado para não remover os explantes de posição.

As trocas de meio de cultura eram realizadas a cada 3 dias e sempre que se detectasse alteração do pH, indicada pelo corante vermelho fenol presente no meio.

Ao ser observada a presença de células em torno dos explantes, estes eram removidos e semeados em outro frasco para o início de uma nova cultura.

Quando as culturas atingiam confluência (Figura 5), eram submetidas à remoção enzimática das células com solução de tripsina a 0,05 % em EDTA 0,02 % a 37° em agitação por 7 minutos e, semeadas em uma nova placa de cultura com seis poços.

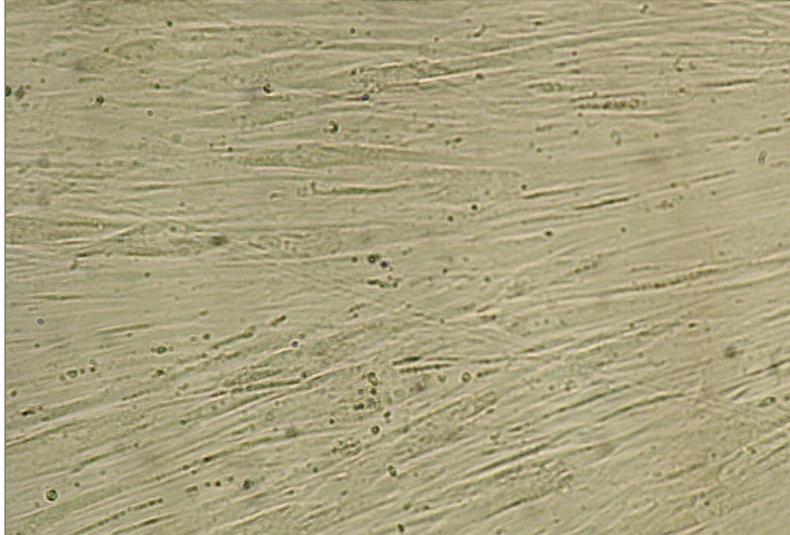


Figura 5: Cultura confluenta de fibroblastos. As células ocupam toda a superfície do fundo do frasco de cultura. (Aumento: 10x).

Na nova placa, o meio era trocado para DMEM com 10 % de soro fetal bovino, penicilina a 100 U/mL, estreptomicina a 100 µg/mL e anfotericina B a 2,5 µg/mL e a cultura mantida até atingir a confluência para, então, ser estimulada.

3.4 Simulação da força ortodôntica nas culturas

Para cada experimento eram preparadas cinco placas de cultura (NUNC™, 6 poços) divididas em: grupo controle (células não estimuladas), e grupos teste (células estimuladas).

Previamente à estimulação, todas placas com as culturas eram lavadas com solução de NaCl a 0,9% e o meio de cultura trocado para DMEM com solução antibiótica e antifúngica sem soro fetal bovino (Figura 6A).

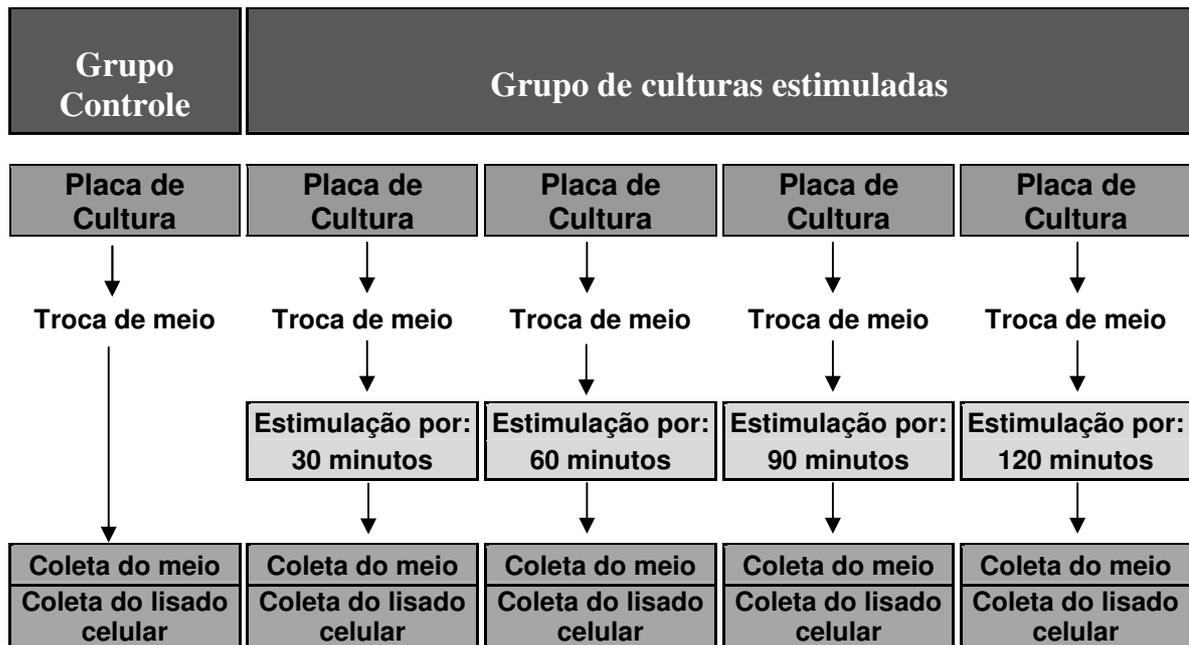
No grupo controle, apenas a troca do meio de cultura foi realizada (Figura 6A).

Nos grupos estimulados, para simular a força ortodôntica, as culturas de fibroblastos eram centrifugadas a 141 g durante 30, 60, 90 e 120 minutos (Figura 6A).

Logo após a centrifugação, todas as placas eram recolocadas na incubadora a 37°C e fluxo de CO₂ a 5%. Após 24 horas, era realizada a coleta do material a ser dosado.

Passadas 24 horas da estimulação, o meio de cultura de 2 poços (poços 1 e 4 da placa de 6 poços) de cada uma das placas era coletado, incluindo a do controle (Figura 6B). A seguir, amostras de todos os grupos eram aliqüotadas e acondicionadas em tubos “Eppendorf” de 0,5 mL. As culturas eram lavadas com solução de NaCl a 0,9 % e submetidas à lise celular, por 4 minutos, pela adição de 200 µL de solução de Triton-X 100 a 0,5 % em PBS, pH 7,4 a 4° C. Após a lise celular, as placas eram raspadas com a ajuda de uma espátula de borracha para remoção dos fragmentos das células aderidas ao fundo de cada poço.

A -



B -

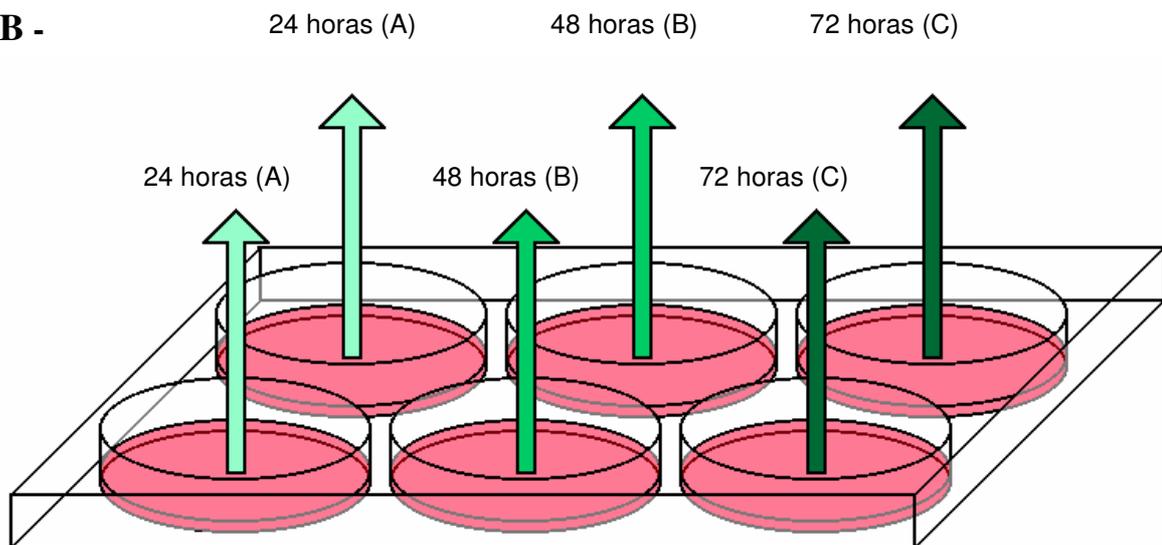


Figura 6: **A** - Esquema da estimulação das culturas. Todas as culturas eram lavadas com solução de NaCl a 0,9% e meio de cultura, sem soro fetal bovino, era adicionado. Uma placa de cultura era utilizada como controle e as demais centrifugadas a 141g durante 30, 60, 90 e 120 minutos. **B** - Esquema do horário de coleta das amostras. A cada intervalo (24, 48 e 72 horas) eram coletados o meio de cultura e o lisado celular.

Para homogeneização, o lisado celular era aspirado e passado sucessivas vezes

através de uma agulha (25 X 7 mm) acoplada a uma seringa de 3 mL. A solução homogeneizada era, a seguir, alíquotada e congelada da mesma forma que as amostras de meio de cultura para confecção dos zimogramas. Todas as amostras coletadas após 24 horas de estímulo eram identificadas pela letra “A”: Controle A, 30, 60, 90 e 120 minutos A.

Após a coleta das amostras, as culturas eram reconduzidas para a incubadora, e novas coletas realizadas após 48 e 72 horas da estimulação (Figura 6B). As amostras coletadas após 48 horas eram identificadas com a letra B e as coletadas após 72 horas com a letra “C”.

3.5 Teste de Viabilidade Celular

Para determinação da viabilidade celular, após as estimulações, eram utilizados dois frascos de cultura confluentes de 75 cm². As culturas eram tripsinizadas de acordo com o método já descrito e as células ressuspensas em meio de cultura. A seguir, alíquotas com a mesma concentração de células eram separadas e centrifugadas a 141g pelos mesmos intervalos de 30, 60, 90 e 120 minutos. Em seguida, eram feitas as contagens de células viáveis com o uso de solução de azul de tripan a 0,25% e câmara de Neubauer.

Em outro teste, eram preparadas cinco placas de cultura com seis poços em confluência. A seguir, as culturas eram lavadas com solução de NaCl a 0,9% seguida pela adição de novo meio de cultura sem soro fetal bovino.

As culturas eram estimuladas em centrifuga de placas do mesmo modo que as anteriores utilizadas para coleta das amostras de meio de cultura e lisado celular. A contagem de células viáveis era realizada, como anteriormente, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas após a troca inicial do meio de cultura e estimulação dos grupos.

3.6 Dosagem de proteínas totais

A dosagem de proteínas totais era feita pelo método de Bradford, sendo realizada em amostras de meio de cultura e de lisado celular de todos os grupos.

O padrão de albumina na concentração de 2 mg/mL era adicionado em duplicata e em volumes de: 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 e 1 μ L em placa de 96 poços. Nesses poços, era acrescentada água destilada para completar o volume de 30 μ L em cada poço. A seguir, as alíquotas de meio de cultura e lisado celular, também em duplicata, diluídas 5 vezes, eram dispostas com o volume de 30 μ L juntamente com uma amostra de DMEM sem soro fetal bovino, que funcionou como um controle negativo na avaliação dos resultados (Figura 7).

Como reagente, era utilizado 250 μ L de solução combinada do *kit* de dosagem de proteínas em cada poço. A placa era incubada a seguir por 30 minutos a 37° C e a espectrofotometria era realizada em um leitor de placas com filtro de comprimento de onda de 546 nm (Figura 7). Com os valores de referência fornecidos pelo leitor e a concentração padrão conhecida era possível calcular, a partir de regressão linear, a

concentração aproximada de proteínas das alíquotas de meio de cultura e de lisado celular, ajustando os valores pela diluição empregada.

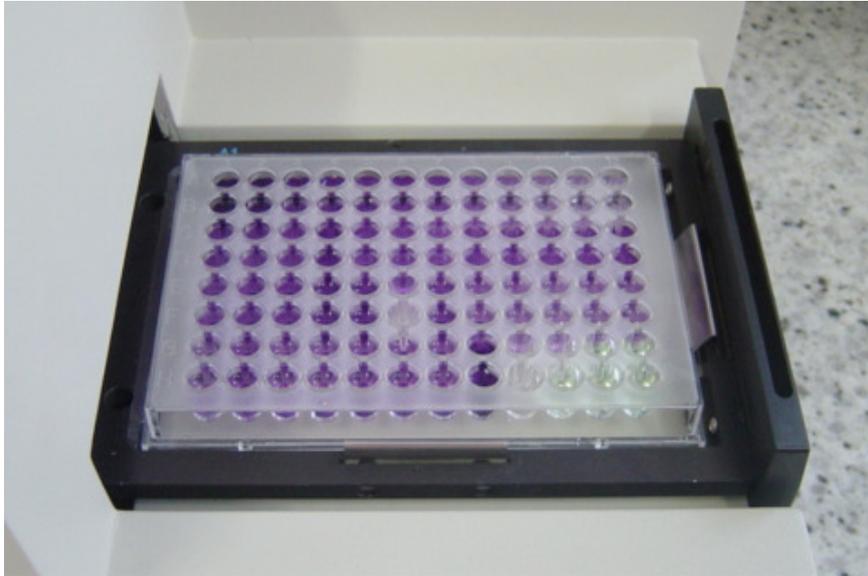


Figura 7: Placa de 96 poços com coloração decorrente da dosagem de proteínas no meio de cultura e no lisado celular realizada segundo a técnica de Bradford.

3.7 Eletroforese de proteínas

Os géis de SDS-Poliacrilamida eram montados com os géis de separação das proteínas a 10,5% e os géis para o carregamento das amostras a 5%. A composição dos géis de separação e de carregamento estão descritos a seguir: Gel de separação: solução de bis-acrilamida a 30%, tris-HCL a 1,5M pH 8,8, solução de persulfato de amônio a 10%, TEMED, solução de SDS a 10% e água destilada; Gel de carregamento eram constituídos por: solução de Bis-acrilamida a 30%, Tris-HCL a 0,5M pH 6,8, solução de persulfato de amônio a 10%, TEMED, solução de SDS a 10% e água destilada.

Para o estudo das gelatinases, era acrescentada solução de gelatina a 20 mg/mL e para estromelisinases, solução de caseína a 20 mg/mL diluída em tris HCl a 1,5 M pH 8,8.

Os géis eram montados na cuba de eletroforese com solução tampão, diluída a cada experimento a partir de uma solução de estoque 5 vezes concentrado, preservado a 4° C e contendo: tris a 125 mM pH 8.3; glicina a 1,23 M, SDS a 5%.

Os níveis de metaloproteinases detectados pelo zimograma eram avaliados pelo ajuste do volume das amostras de meio de cultura e de lisado celular em relação à quantidade de proteínas totais de cada grupo. A seguir cada amostra já ajustada, era diluída (1:1) em tampão Tris-HCl não-redutor (2,8 mL de H₂O destilada; 1 mL de solução 0,5 M Tris-HCl, pH 6.8; 0,8 mL de glicerol; 3,2 mL de SDS a 10%; 0,2 mL de azul de bromofenol a 0,2%) e dispensada no gel para eletroforese (Figura 8). Os géis foram carregados com 8.83 µg de proteína nas amostras do meio de cultura e 5.03 µg de proteína nas do lisado celular. Amostras com marcadores de peso molecular também eram carregadas nos géis para identificação das metaloproteinases.

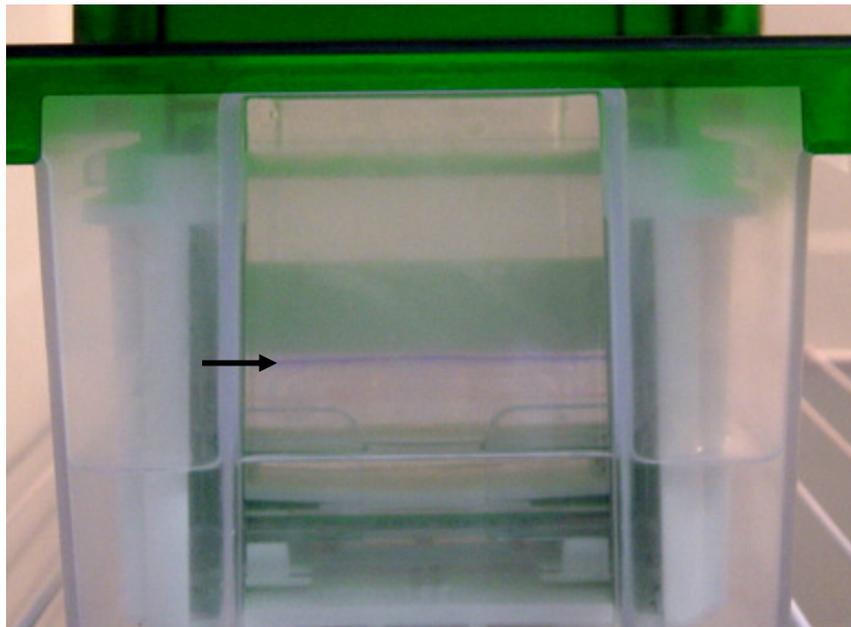


Figura 8: Amostras (seta) diluídas em tampão não-redutor migrando no gel sob refrigeração a 4°C na cuba de eletroforese.

A eletroforese era realizada à temperatura de aproximadamente 4° C com voltagem de 90 V e amperagem de 35 mA até que as bandas de marcação percorressem todo o gel (Figura 8).

Após a eletroforese, o gel era desmontado, lavado duas vezes em solução de Triton-X 100 a 2,5% por 15 minutos e incubado a 37°C por 18 horas em 200 mL de solução de: Tris-HCl 50 mM; CaCl₂ 10 mM; NaCl 50 mM. O pH é de 7,6.

A revelação era realizada em solução de azul de coomassie R-250 a 0,1%; metanol a 40% e ácido acético a 10% sob baixa agitação em incubação até o dia seguinte.

Cada gel era, a seguir, descorado em solução de etanol a 25% e ácido acético a 8% 2 x por 20 minutos (Figura 9).

Depois da revelação, os géis eram lavados em água destilada e escaneados a 600 dpi para quantificação da atividade zimolítica por densitometria com um scanner Genius.

A densitometria era realizada com o programa de avaliação de imagens: *Kodak Molecular Imaging v.4.0.1*. Após a diagramação das imagens dos géis pelo programa, a intensidade de cor era calculada em cada “*pixel*” das bandas e comparadas com o fundo na imagem.

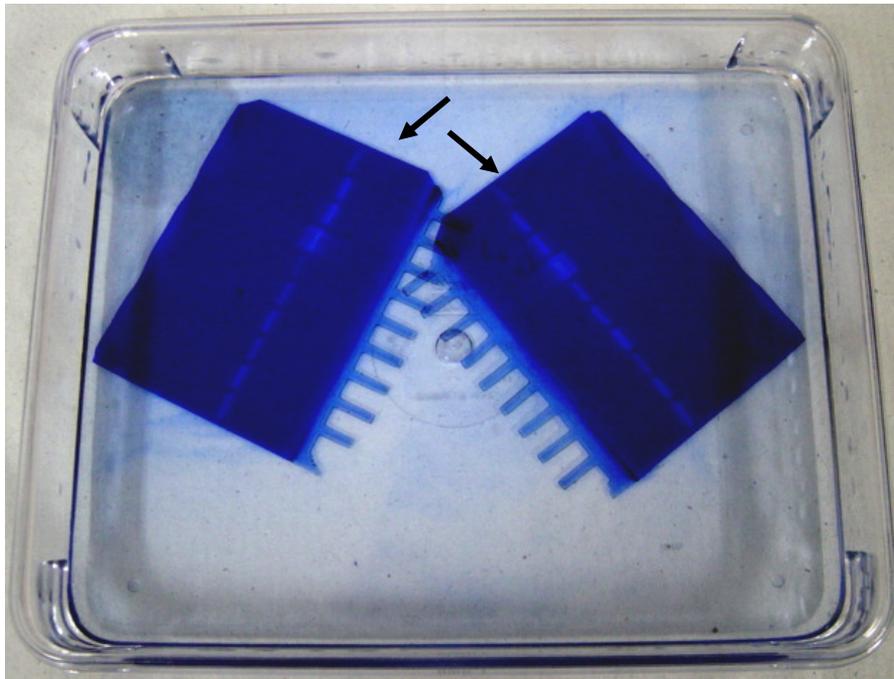


Figura 9: Géis sendo descorados em solução de etanol e ác. acético após a revelação com Azul de Coomassie. As bandas de metaloproteinases aparecem como bandas claras em um fundo azul (setas pretas).

3.8 Análise Estatística

Os testes de independência, variância e normalidade eram aplicados com o

auxílio do programa *Minitab 13.20* para verificar se era aplicável o teste *ANOVA* ou se a análise estatística seria realizada pelo teste de *Kruskal-Wallis*.

Os testes de *ANOVA* e *Kruskal-Wallis* eram realizados com o auxílio do programa *GraphPad Prism 4.0*. Nos grupos onde a análise estatística, realizada pela *ANOVA*, mostrasse diferença significativa ($p < 0,05$), o pós-teste de *Tukey* era aplicado, para discriminação da diferença em relação a cada um dos grupos. Nos grupos em que a análise estatística era feita pelo teste de *Kruskal-Wallis*, era aplicado o pós-teste de *Dunns* quando houvesse diferença significativa ($p < 0,05$) para determinar quais grupos eram diferentes.

Na análise estatística as quantidades de proteínas, em mg, do meio de cultura eram comparadas com as do lisado celular e a expressão de pró-MMP 2 comparada com a de MMP-2, pelo teste de *Mann-Whitney*. As diferenças observadas entre os grupos eram considerados significativos para valores de $p < 0,05$.

Resultado

4. RESULTADO

4.1 Coleta do ligamento periodontal e culturas de fibroblastos

A coleta dos dentes no Bloco Cirúrgico da Faculdade de Odontologia da UFMG foi realizada no período de 17 de março a 27 de outubro de 2005. Durante esse período, eram atendidos no bloco cirúrgico de 5 a 6 pacientes por dia. O total de dentes coletados foi de 43, sendo possível extrair o ligamento periodontal de 26, o que equivale a um aproveitamento médio de 60,5% (Tabela 1).

Tabela 1: Porcentagem de aproveitamento da extração do ligamento periodontal a partir da coleta de dentes

Data	Dentes coletados	Dentes utilizados	Aproveitamento
17/3/2005	5	1	20,0%
31/3/2005	3	2	66,7%
7/4/2005	6	4	66,7%
14/4/2005	7	2	28,6%
12/5/2005	3	3	100,0%
19/5/2005	5	3	60,0%
16/6/2005	1	1	100,0%
30/6/2005	4	3	75,0%
25/8/2005	3	3	100,0%
1/9/2005	3	2	66,7%
27/10/2005	3	2	66,7%
Total	43	26	60,5%

As 26 culturas realizadas, somente duas não se desenvolveram (7,6%).

4.2 Ligamento periodontal

O ligamento periodontal extraído de cada dente media aproximadamente 10 x 5 mm (Figura 10).



Figura 10: Ligamento periodontal obtido por raspagem da raiz do dente. Os fragmentos medem aproximadamente 10 x 5 mm.

Os frascos de cultura com os explantes eram acondicionados na incubadora a 37° e 5% de CO₂. A presença de fibroblastos aderidos ao frasco era observada após duas semanas de cultivo.

4.3 Viabilidade celular logo após a estimulação

O teste de viabilidade celular realizado no grupo controle e nos grupos estudados logo após a estimulação, não mostrou diferença significativa nas porcentagens de células viáveis entre os grupos (*Kruskal-Wallis*, $p > 0,05$) (Figura 11; Tabela 2).

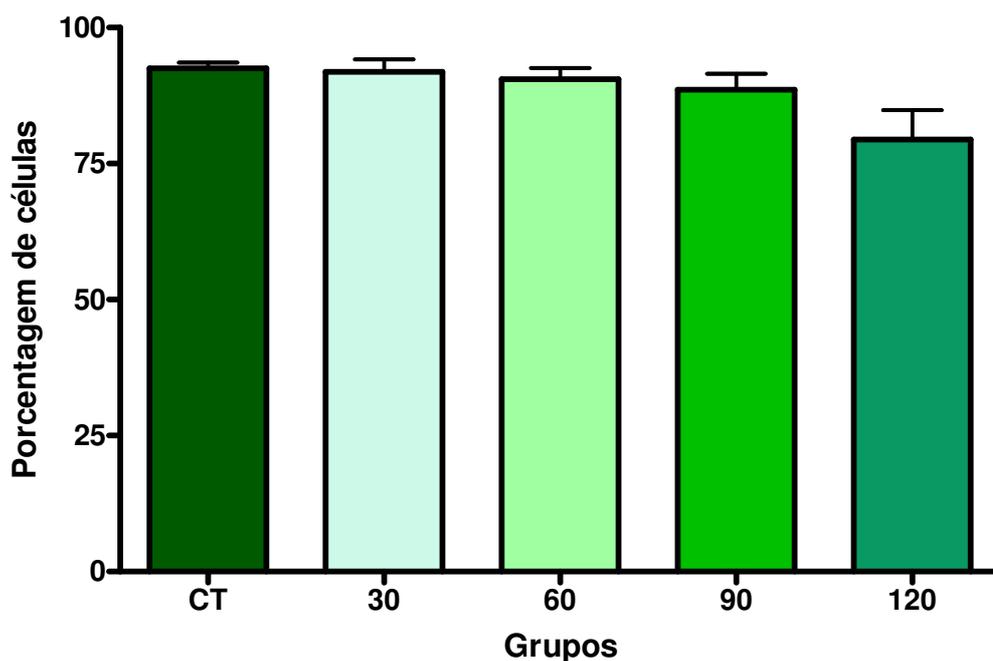


Figura 11: Viabilidade celular de fibroblastos em cultura submetidos a centrifugação por 141g por 30, 60, 90 e 120 minutos. Não há diferença da viabilidade em relação ao tempo de estimulação (*Kruskal-Wallis*, $p>0,05$).

Tabela 2: Viabilidade celular média testada logo após a estimulação

CT	30	60	90	120
92%	91%	90%	88%	79%

$p>0,05$

4.4 Intervalo de 24 horas após troca de meio do grupo controle e estimulação dos grupos teste

4.4.1 Viabilidade celular

O teste de viabilidade realizado no intervalo de análise de 24 horas não apresentou diferença significativa (*Kruskal-Wallis*, $p>0,05$) (Figura 12; Tabela 3).

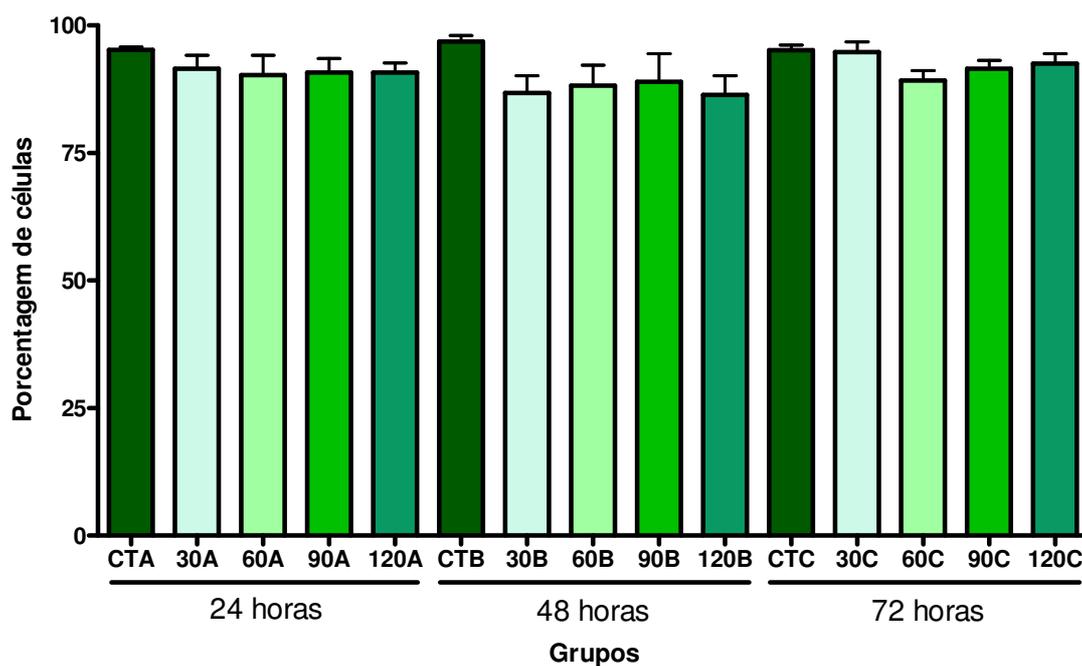


Figura 12: Viabilidade celular nos intervalos de 24 horas (CTA, 30A, 60A, 90A e 120A), 48 horas (CTB, 30B, 60B, 90B e 120B) e 72 horas (CTC, 30C, 60C, 90C e 120C). Não são observadas diferenças entre os grupos nos intervalos de 24 e 72 horas (*Kruskal-Wallis*, $p>0,05$) e de 48 horas (*ANOVA*, $p>0,05$).

Tabela 3: Viabilidade celular média testada 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas após a estimulação.

CTA	30A	60A	90A	120A
95%	92%	90%	91%	91%
CTB	30B	60B	90B	120B
95%	87%	88%	89%	86%
CTC	30C	60C	90C	120C
95%	92%	90%	91%	91%

$p>0,05$

4.4.2 Síntese e armazenamento de proteínas nas células

A dosagem de proteínas totais na solução do lisado celular, que refletia a concentração proteínas: proteínas estruturais + proteínas em produção e

armazenamento, realizada segundo a técnica de Bradford não demonstrou diferença significativa nos grupos estimulados em relação aos controles no intervalo de análise de 24 horas (*ANOVA*, $p > 0,05$) (Figura 13; Tabela 4).

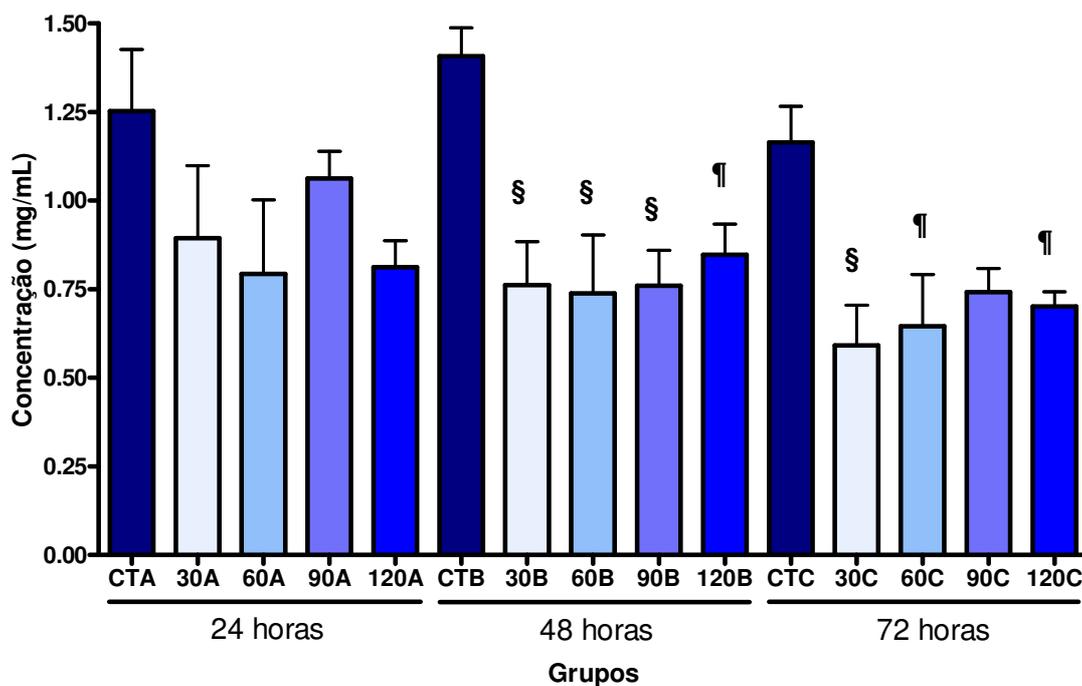


Figura 13: Concentração de proteínas totais presentes no lisado celular. É observada queda significativa nos grupos estimulados, em relação aos controles, nos períodos de 48 e 72 horas (*ANOVA*, $p < 0,01$).

¶ Comparações significativamente diferentes em relação aos controles dos intervalos de 48 (CTB) ou 72 horas (CTC) (pós-teste de *Tukey*, $p < 0,05$).

§ Comparações significativamente diferentes em relação aos controles dos intervalos de 48 (CTB) ou 72 horas (CTC) (pós-teste de *Tukey*, $p < 0,01$).

Tabela 4: Concentrações médias (%) de proteínas totais presentes no lisado celular dos grupos testados em relação aos controles 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas após estimulação.

CTA	30A	60A	90A	120A
100%	71%	63%	85%	65%
CTB	30B §	60B §	90B §	120B ¶
100%	54%	52%	54%	60%
CTC	30C §	60C ¶	90C	120C ¶
100%	51%	55%	64%	60%

Intervalos de 48 e 72 horas (*ANOVA*, $p < 0,01$). Intervalo de 24 horas (*ANOVA*, $p > 0,05$).

¶ Comparações significativamente diferentes em relação aos controles dos intervalos de 48 (CTB) ou 72 horas (CTC) (pós-teste de *Tukey*, $p < 0,05$).

§ Comparações significativamente diferentes em relação aos controles dos intervalos de 48 (CTB) ou 72 horas (CTC) (pós-teste de *Tukey*, $p < 0,01$).

4.4.3 Presença de proteínas no meio de cultura

Não foi encontrada diferença significativa entre os valores das concentrações de proteínas presentes no meio de cultura no intervalo de análise de 24 horas (*ANOVA*, $p > 0,05$) (Figura 14; Tabela 5).

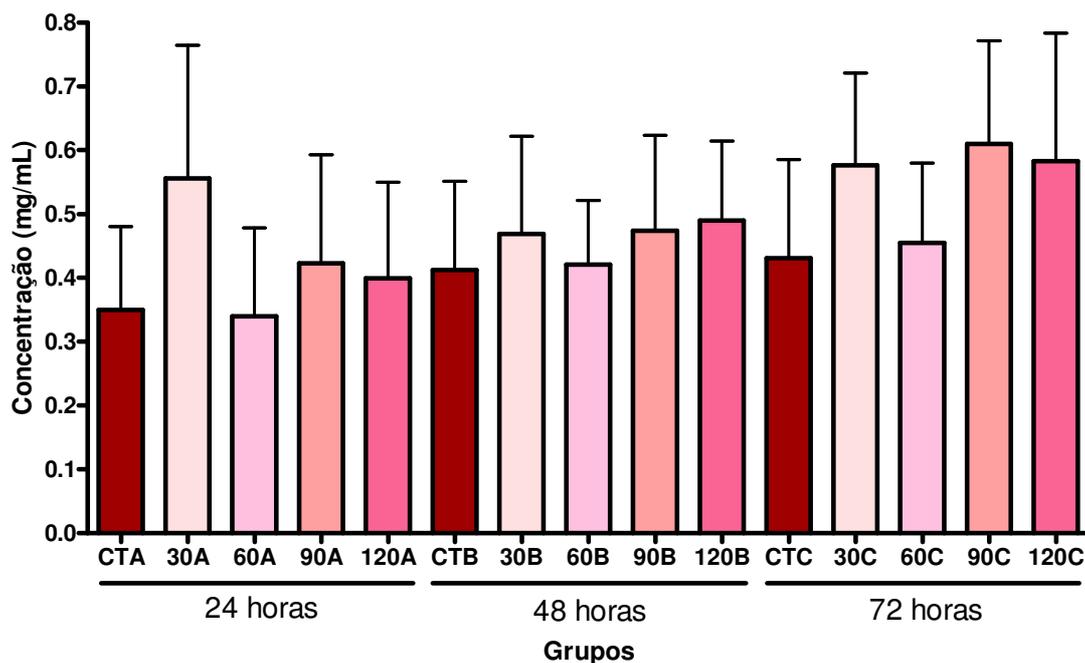


Figura 14: Concentração de proteínas presentes no meio de cultura (ANOVA, $p > 0,05$).

Tabela 5: Concentrações médias (%) de proteínas totais presentes no meio de cultura dos grupos testados em relação aos controles 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas após estimulação.

CTA	30A	60A	90A	120A
100%	159%	97%	121%	114%
CTB	30B	60B	90B	120B
100%	114%	102%	115%	119%
CTC	30C	60C	90C	120C
100%	134%	106%	141%	135%

$p > 0,05$

4.4.4 Comparação entre o teor de proteínas nas células e no meio de cultura

O cálculo do volume de proteínas produzido pelas culturas em cada grupo do

meio de cultura (volume de 2 mL) era significativamente maior em todos eles quando comparados com os do lisado celular (volume de 0,2 mL) no intervalo de análise de 24 horas (*Mann-Whitney*, $p < 0,05$).

4.4.5 Atividade das metaloproteinasas

Avaliou-se a atividade das metaloproteinasas 2 e 9 por eletroforese de gel de SDS-Poliacrilamida e gelatina e das estromelisinases e matrilisina com gel de caseína.

A presença de MMP-2 em sua forma latente e ativa foi identificada no meio de cultura e no lisado celular pela comparação com o padrão de marcador de peso molecular. Contudo, a MMP-3, MMP-7, MMP-9 e MMP-10 não foram detectadas em nenhum dos grupos do lisado celular nem do meio de cultura independentemente do estímulo e intervalo de tempo estudado.

Calculou-se a atividade da MMP-2 e da pró-MMP 2 a partir da realização das densitometrias dos zimogramas do lisado celular e do meio de cultura em todos os intervalos de tempo das análises previamente definidos no estudo.

4.4.5.1 Pró-MMP 2 no Lisado Celular

A atividade da forma latente da MMP-2 não apresentou diferença significativa entre os grupos controle e os grupos estimulados no lisado celular após o intervalo de 24 horas (*ANOVA*, $p > 0,05$) (Figura 15; Tabela 6).

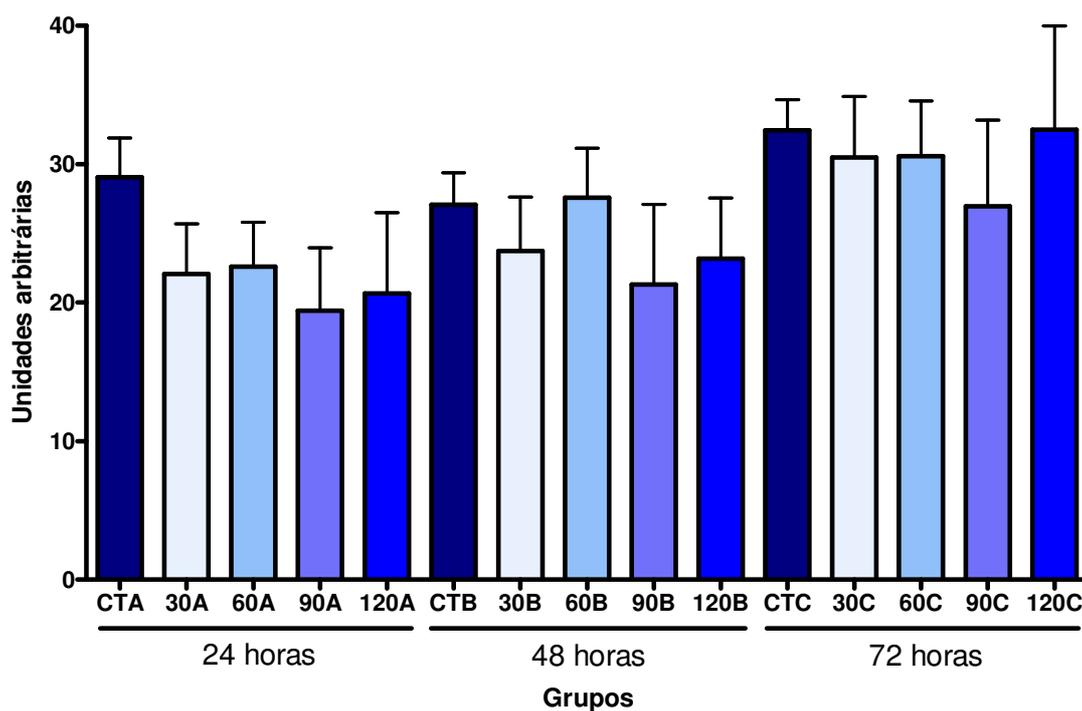


Figura 15: Densitometria da atividade da forma latente da metaloproteinase 2 presente na solução do lisado celular nos intervalos de 24 e 48 horas (ANOVA, $p > 0,05$) e 72 horas (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Não há diferença entre os grupos.

Tabela 6: Atividades médias (%) de pró-MMP 2 no lisado celular dos grupos testados em relação aos controles 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas após estimulação.

CTA	30A	60A	90A	120A
100%	76%	78%	67%	71%
CTB	30B	60B	90B	120B
100%	88%	102%	79%	86%
CTC	30C	60C	90C	120C
100%	94%	94%	83%	100%

$p > 0,05$

4.4.5.2 MMP-2 no Lisado Celular

A atividade da forma ativa da MMP-2 também não apresentou diferença

estatística no lisado celular dos grupos estimulados em relação ao grupo controle no intervalo de análise de 24 horas (*Kruskal-Wallis*, $p>0,05$) (Figura 16; Tabela 7).

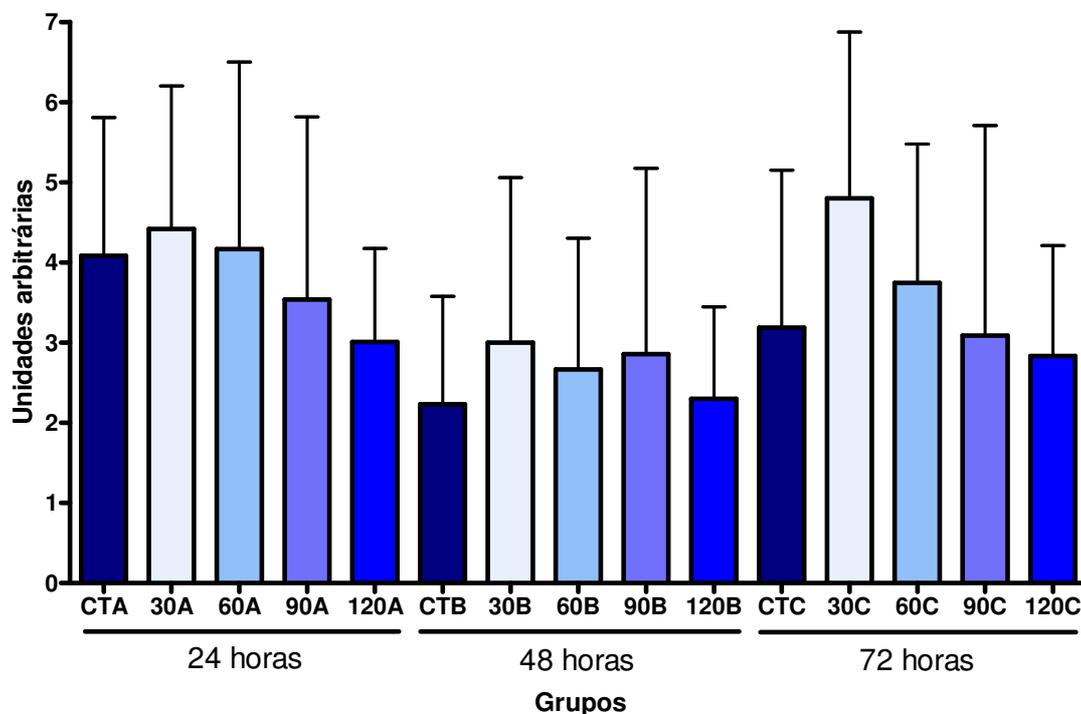


Figura 16: Densitometria da atividade da forma ativa da metaloproteinase 2 presente na solução do lisado celular (*Kruskal-Wallis*, $p>0,05$).

Tabela 7: Atividades médias (%) de MMP-2 no lisado celular dos grupos testados em relação aos controles 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas após estimulação.

CTA	30A	60A	90A	120A
100%	108%	102%	87%	74%
CTB	30B	60B	90B	120B
100%	134%	119%	128%	103%
CTC	30C	60C	90C	120C
100%	151%	117%	97%	89%

$p>0,05$

4.4.5.3 Pró-MMP 2 no Meio de Cultura

A atividade da pró-MMP 2 apresentou uma alteração significativa entre os grupos. Nos grupos estimulados, as atividades eram menores do que a dos controles nos intervalos de análise de 24 horas (ANOVA, $p < 0,0001$) (Figura 17).

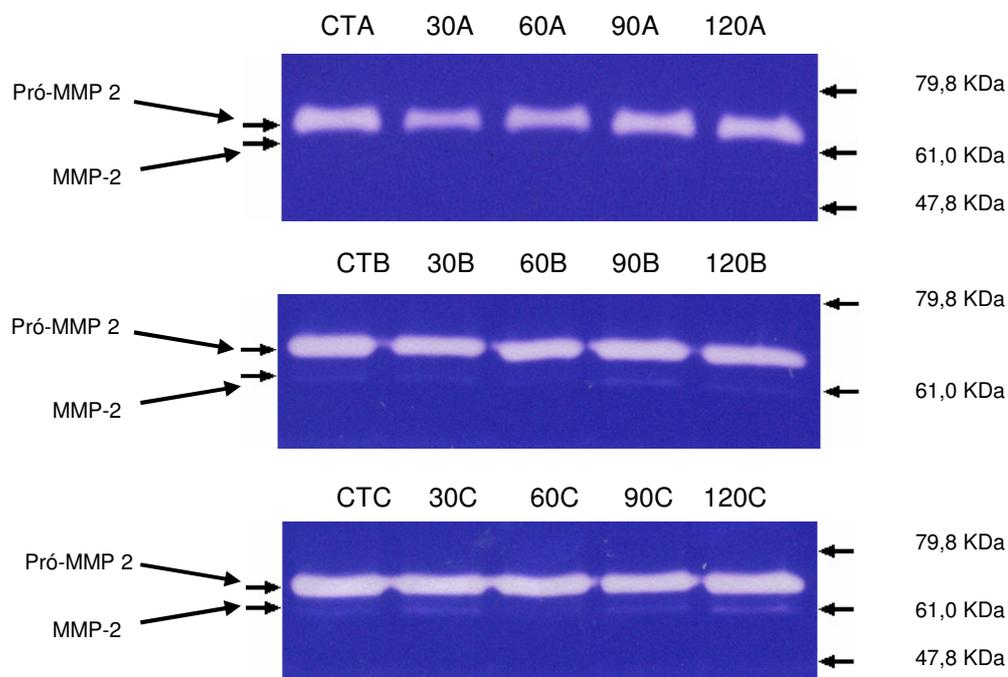


Figura 17: Gel de SDS-Poliacrilamida com gelatina. A atividade da pró-MMP 2 (72kDa) e da MMP-2 (62kDa) presentes no meio de cultura. A atividade da pró-MMP 2 nos grupos estimulados é inferior à dos grupos controle nos intervalos de 24 (ANOVA, $p < 0,0001$) e 48 horas (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) e aumenta significativamente com tempo de coleta em cada um dos grupos controle (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$) e de 90 (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) e de 120 minutos de estimulação (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). A forma ativa da MMP-2 aparece como uma banda muito fraca abaixo da Pró-MMP 2 (Mann-Witney, $p < 0,001$).

Após 24 horas, a atividade da forma pró-ativa da metaloproteinase 2 nas culturas de 30 minutos de estimulação, sofreu uma queda significativa para 46%, quando comparada com a atividade do grupo controle (CTA) (pós-teste de Tukey, $p < 0,001$). Quando estimuladas por 60 minutos, a atividade era equivalente a 60% do controle (CTA) (pós-teste de Tukey, $p < 0,01$). Com 90 minutos de estimulação, a atividade era equivalente a 71% do controle (CTA) (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$) e

após centrifugar as culturas por 120 minutos, a atividade era de 65% comparada à do grupo controle (CTA) (pós-teste de *Tukey*, $p < 0,01$) (Figura 18, Tabela 8).

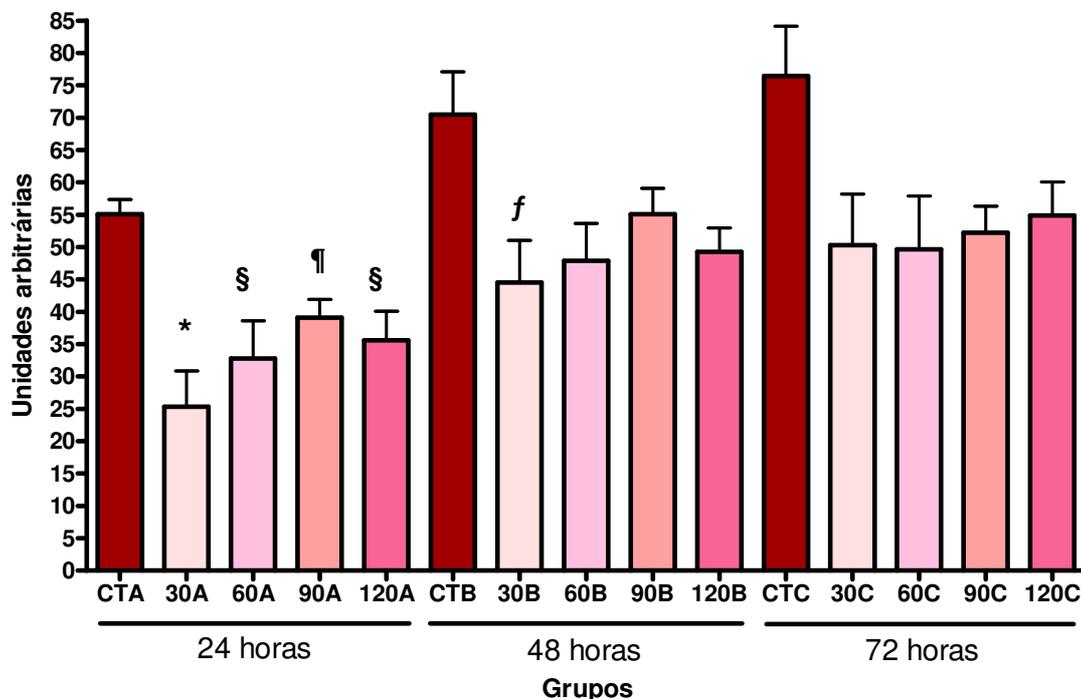


Figura 18: Densitometria da atividade da forma latente da metaloproteinase 2 presente no meio de cultura. Observar queda significativa dos grupos estimulados comparados com os controles nos intervalos de 24 (*ANOVA*, $p < 0,0001$) e 48 horas (*Kruskal-Wallis*, $p < 0,05$).

¶ Comparações significativamente diferentes em relação aos controles dos intervalos de 24 (CTA) ou 48 horas (CTB) (pós-teste de *Tukey*, $p < 0,05$).

§ Comparações significativamente diferentes em relação ao controle do intervalo de 24 horas (CTA) (pós-teste de *Tukey*, $p < 0,01$).

* Comparação significativamente diferente em relação ao controle do intervalo de 24 horas (CTA) (pós-teste de *Tukey*, $p < 0,001$).

f Comparação significativamente diferente em relação ao controle do intervalo de 48 horas (CTB) (pós-teste de *Dunns*, $p < 0,05$).

Tabela 8: Atividades médias (%) de pró-MMP 2 presentes no meio de cultura dos grupos testados em relação aos controles 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas após estimulação.

CTA	30A *	60A §	90A ¶	120A §
100%	46%	60%	71%	65%
CTB	30B f	60B	90B	120B
100%	63%	68%	78%	70%
CTC	30C	60C	90C	120C
100%	66%	65%	68%	72%

Intervalos de 24 (*ANOVA*, $p < 0,0001$) e 48 horas (*Kruskal-Wallis*, $p < 0,05$).

¶ Comparações significativamente diferentes em relação aos controles dos intervalos de 24 (CTA) ou 48 horas (CTB) (pós-teste de *Tukey*, $p < 0,05$).

§ Comparações significativamente diferentes em relação ao controle do intervalo de 24 horas (CTA) (pós-teste de *Tukey*, $p < 0,01$).

* Comparação significativamente diferente em relação ao controle do intervalo de 24 horas (CTA) (pós-teste de *Tukey*, $p < 0,001$).

f Comparação significativamente diferente em relação ao controle do intervalo de 48 horas (CTB) (pós-teste de *Dunns*, $p < 0,05$).

4.4.5.4 MMP-2 no Meio de Cultura

Não foi encontrada diferença significativa na atividade da MMP-2 no meio de cultura comparando o grupo controle com os grupos estimulados no intervalo de análise de 24 horas (*Kruskal-Wallis*, $p > 0,05$) (Figura 19; tabela 9).

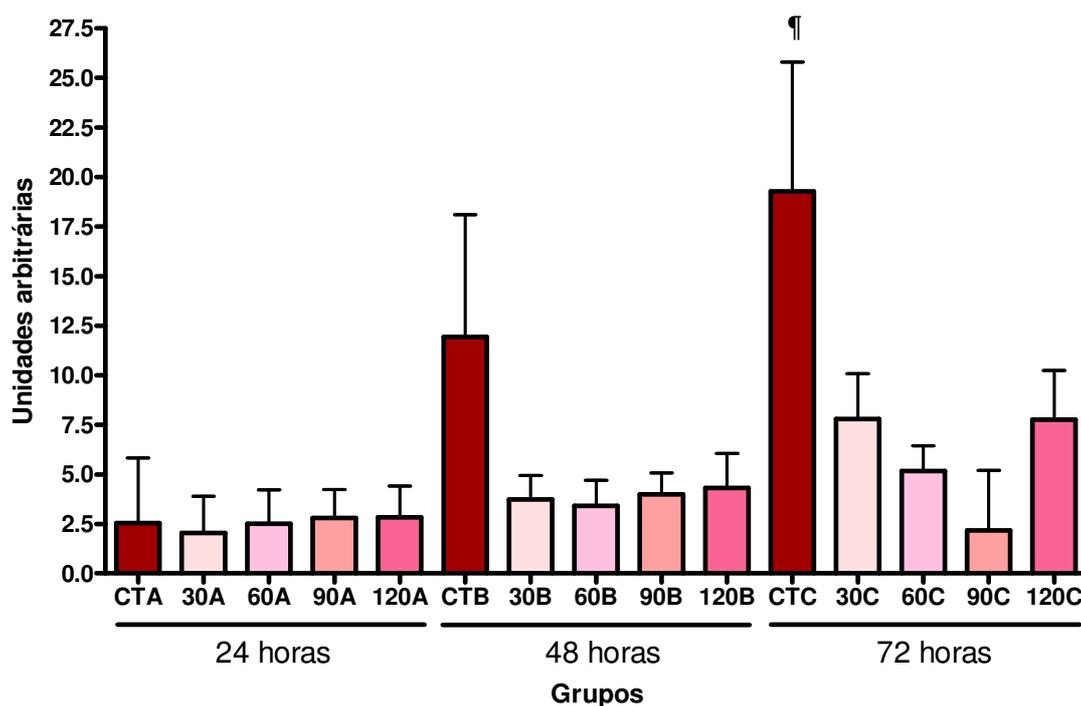


Figura 19: Densitometria da forma ativa da metaloproteinase 2 presente no meio de cultura. Observar aumento da atividade entre os grupos controle (*Kruskal-Wallis*, $p < 0,05$).

¶ Comparação significativamente diferente em relação ao controle do intervalo de 24 horas (CTA) (pós-teste de *Dunns*, $p < 0,05$).

Tabela 9: Atividades médias (%) de MMP-2 presentes no meio de cultura dos grupos testados em relação aos controles 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas após estimulação.

CTA	30A	60A	90A	120A
100%	81%	99%	110%	112%
CTB	30B	60B	90B	120B
100%	31%	29%	33%	36%
CTC ¶	30C	60C	90C	120C
100%	40%	27%	11%	40%

Grupos controle entre os intervalos de coleta (*Kruskal-Wallis*, $p < 0,05$)

¶ Comparação significativamente diferente em relação ao controle do intervalo de 24 horas (CTA) (pós-teste de *Dunns*, $p < 0,05$).

4.4.6 Atividade da pró-MMP 2 comparada com a MMP-2 no lisado celular e no meio de cultura

Comparando a atividade da forma latente (pró-MMP 2) com a forma ativa da MMP-2 no lisado celular, a atividade da pró-MMP 2 era significativamente maior em todos os grupos no intervalo de análise de 24 horas (Nos grupos de 90 e 120 minutos de estimulação coletados no intervalo de 24 horas, *Mann-Whitney*, $p < 0,01$; Demais grupos, *Mann-Whitney*, $p < 0,001$).

A atividade da pró-MMP 2 comparada com a MMP-2 no meio de cultura, também foi significativamente maior em todos os grupos no intervalo de análise de 24 horas (Nos grupos de 30 minutos de estimulação coletados no período de 24 horas, *Mann-Whitney*, $p < 0,001$; Demais grupos, *Mann-Whitney*, $p < 0,0001$).

4.5 Intervalo de 48 horas após troca de meio do grupo controle e estimulação dos grupos teste

4.5.1 Viabilidade Celular

A viabilidade celular testada no intervalo de análise de 48 horas (*ANOVA*, $p > 0,05$) não demonstrou diferença significativa entre o controle e os grupos estimulados (Figura 12; Tabela 3).

4.5.2 Síntese e armazenamento de proteínas nas células

A concentração de proteínas totais na solução do lisado celular demonstrou uma queda significativa nos grupos estimulados em relação ao controle no intervalo de análise de 48 horas (*ANOVA*, $p < 0,05$) (Figura 13; Tabela 4).

Passadas as 48 horas após a troca de meio do grupo controle e estimulação dos grupos testados, a concentração média de proteínas dentro das células não estimuladas era de 1,40 mg/mL. Nas culturas estimuladas por 30 minutos houve uma queda expressiva na concentração para 0,76 mg/mL de proteínas, representando 54% o valor da concentração do controle (pós-teste de *Tukey*, $p < 0,01$). As culturas estimuladas por 60 minutos apresentaram a concentração média de 0,73 mg/mL. Em relação ao controle coletado nesse mesmo intervalo, significa uma queda para 52% da concentração (pós-teste de *Tukey*, $p < 0,01$). Nos grupos estimulados por 90 minutos, a concentração foi de 0,75 mg/mL (54% em relação ao controle coletado após 48 horas) (pós-teste de *Tukey*, $p < 0,01$). Após a estimulação por 120 minutos, a concentração média foi de 0,84 mg/mL (60% em relação ao controle) (pós-teste de *Tukey*, $p < 0,05$) (Figura 13; Tabela 4).

4.5.3 Presença de proteínas no meio de cultura

A concentração de proteínas totais presentes no meio de cultura não apresentou diferença significativa entre o grupo controle e os grupos estimulados no intervalo de análise de 48 horas (*ANOVA*, $p > 0,05$) (Figura 14; Tabela 5).

4.5.4 Comparação entre o teor de proteínas nas células e no meio de cultura

O volume de proteínas totais produzidas em cada grupo do meio de cultura (volume de 2 mL) era significativamente maior em todos eles quando comparados com os do lisado celular (volume de 0,2 mL) no intervalo de análise de 48 horas (*Mann-Whitney*, $p < 0,05$).

4.5.5 Atividade de pró-MMP 2 no lisado celular

Não foi encontrada diferença significativa na atividade da pró-MMP 2 ao se comparar o grupo controle e os grupos estimulados do lisado celular no intervalo de análise de 48 horas (*ANOVA*, $p > 0,05$) (Figura 15; Tabela 6).

4.5.6 Atividade de MMP-2 no lisado celular

A atividade da forma ativa da MMP-2 também não apresentou diferença estatística no lisado celular dos grupos estimulados em relação aos grupos controle no intervalo de análise de 48 horas (*Kruskal-Wallis*, $p > 0,05$) (Figura 16; Tabela 7).

4.5.7 Atividade de pró-MMP 2 no meio de cultura

Nos grupos estimulados, as atividades de pró-MMP 2 no meio de cultura apresentaram uma queda significativa comparada com a atividade do controle no intervalo de análise de 48 horas (*Kruskal-Wallis*, $p < 0,05$) (Figura 17).

No intervalo de 48 horas, nas culturas estimuladas por 30 minutos, a atividade de pró-MMP 2 sofre uma queda significativa comparada a 63% a atividade do grupo

controle (CTB) (pós-teste de *Dunns*, $p < 0,01$). O grupo de 60 minutos de estimulação mostrou o equivalente a 68% do controle (CTB), o de 90 minutos mostrou 78% do controle (CTB) e o de 120 minutos apresentou atividade equivalente a 70% do controle (CTB) (Figura 18; Tabela 8).

4.5.8 Atividade de MMP-2 no meio de cultura

Não foi encontrada diferença significativa entre o grupo controle e os grupos estimulados no intervalo de análise de 48 horas (*Kruskal-Wallis*, $p > 0,05$) (Figura 19; Tabela 9).

4.5.9 Atividade da pró-MMP 2 comparada com a MMP-2 no lisado celular e no meio de cultura

A atividade da pró-MMP 2 comparada com a da MMP-2 no lisado celular era significativamente maior em todos os grupos no intervalo de análise de 48 horas (Nos grupos de 90 minutos de estimulação coletados no intervalo de 48 horas, *Mann-Whitney*, $p < 0,05$; Nos grupos de 30 e 120 minutos de estimulação coletados no intervalo de 48 horas, *Mann-Whitney*, $p < 0,001$; Demais grupos, *Mann-Whitney*, $p < 0,0001$).

A atividade da pró-MMP 2 no meio de cultura é significativamente maior que a da MMP-2 em todos os grupos no intervalo de análise de 48 horas (*Mann-Whitney*, $p < 0,0001$).

4.6 Intervalo de 72 horas após troca de meio do grupo controle e estimulação dos grupos testados

4.6.1 Viabilidade Celular

No intervalo de análise de 72 horas, não foi encontrada diferença significativa na viabilidade celular entre o grupo controle e os grupos estimulados (*ANOVA*, $p > 0,05$) (Figura 12; Tabela 3).

4.6.2 Síntese e armazenamento de proteínas nas células

Foi demonstrada uma queda significativa na concentração de proteínas totais na solução do lisado celular nos grupos estimulados em relação ao controle no intervalo de análise de 72 horas (*ANOVA*, $p < 0,01$) (Figura 13; Tabela 4).

Na coleta realizada após 72 horas, a concentração média de proteínas do grupo controle (não estimulado) era de 1,16 mg/mL. Os grupos estimulados apresentaram queda expressiva em relação ao controle desse mesmo intervalo. As culturas estimuladas por 30 minutos mostraram uma concentração média de 0,59 mg/mL, o que representa 51% do valor médio da concentração do grupo controle coletado (pós-teste de *Tukey*, $p < 0,01$). Após 60 minutos de estimulação, a concentração média era de 0,64 mg/mL, 55% em relação ao controle (pós-teste de *Tukey*, $p < 0,05$). As culturas estimuladas por 90 minutos apresentaram uma concentração média de 0,74 mg/mL (64% em relação ao controle) e, na estimulação por 120 minutos, a concentração

média de proteínas era de 0,70 mg/mL, que representa 60% do valor controle (pós-teste de *Tukey*, $p < 0,05$) (Figura 13; Tabela 4).

4.6.3 Presença de proteínas no meio de cultura

Após o intervalo de análise de 72 horas, a concentração de proteínas totais presentes no meio de cultura não apresentou diferença significativa entre o grupo controle e os grupos estimulados (*ANOVA*, $p > 0,05$) (Figura 14; Tabela 5).

4.6.4 Comparação entre o teor de proteínas nas células e no meio de cultura

O volume de proteínas produzidas pelas culturas em cada grupo do meio de cultura (volume de 2 mL) era significativamente maior em todos eles quando comparados com os do lisado celular (volume de 0,2 mL) no intervalo de análise de 72 horas (*Mann-Witney*, $p < 0,05$).

4.6.5 Atividade de pró-MMP 2 no lisado celular

A atividade da pró-MMP 2 não apresentou diferença significativa entre os grupos controle e estimulados do lisado celular no intervalo de análise de 72 horas (*ANOVA*, $p > 0,05$) (Figura 15; Tabela 6).

4.6.6 Atividade de MMP-2 no lisado celular

Não foi encontrada diferença significativa na atividade da forma ativa da MMP-2 no lisado celular comparando os grupos controle e estimulados no intervalo de análise de 72 horas (*Kruskal-Wallis*, $p>0,05$) (Figura 16; Tabela 7).

4.6.7 Atividade de pró-MMP 2 no meio de cultura

A atividade de pró-MMP 2 no meio de cultura não apresentou diferença significativa entre os grupos controle e estimulados no intervalo de análise de 72 horas (*Kruskal-Wallis*, $p>0,05$) (Figura 17; 18; Tabela 8).

4.6.8 Atividade de MMP-2 no meio de cultura

No intervalo de análise de 72 horas, a atividade da MMP-2 no meio de cultura não apresentou diferença significativa entre os grupos controle e estimulados (*Kruskal-Wallis*, $p>0,05$) (Figura 19; Tabela 9).

4.6.9 Atividade da pró-MMP 2 comparada com a MMP-2 no lisado celular e no meio de cultura

A atividade da pró-MMP 2 comparada com a da MMP-2 no lisado celular era significativamente maior em todos os grupos no intervalo de análise de 24 horas (Nos grupos de 90 minutos de estimulação coletados no intervalo de 72 horas, *Mann-Whitney*, $p<0,001$; Demais grupos, *Mann-Whitney*, $p<0,0001$).

A atividade da pró-MMP 2 no meio de cultura era significativamente maior comparada com a da MMP-2 em todos os grupos no intervalo de análise de 72 horas (*Mann-Whitney*, $p < 0,0001$).

Discussão

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi avaliada a atividade de metaloproteinases em fibroblastos humanos derivados do ligamento periodontal em cultura submetidos a uma força ortodôntica simulada. A força ortodôntica simulada exercida sobre as culturas corresponde a aproximadamente 0,290 kgf (pressão de 30,16 gf/cm² de células) dentro dos limites da força geralmente aplicada na clínica ortodôntica. Os cálculos da intensidade de força aplicada, foram realizados com base na massa do meio de cultura dentro de cada poço da placa de cultura no momento da centrifugação, na aceleração gravitacional aplicada e na área de cada poço da placa de cultura.

A força ideal capaz de produzir movimento ortodôntico é aquela que supera a pressão sangüínea dos capilares no ligamento periodontal. A pressão excessiva resulta em hialinização com desaparecimento do componente celular do ligamento periodontal, em algumas áreas ⁽¹⁰⁾. Uma força constante de 0,290 kgf aplicada nos dentes é capaz de promover a movimentação dentária e por isso foi utilizada no estudo.

A matriz óssea do osso alveolar é reabsorvida pelos osteoclastos permitindo que o dente mude de posição ^(9, 10). Para que este fenômeno aconteça é necessário que o ligamento periodontal seja remodelado, com a degradação das fibras presentes e formação de novas após a aposição óssea ⁽⁹⁾. As metaloproteinases têm o papel de degradar as fibras de colágeno e elastina do ligamento periodontal, permitindo o seu remodelamento.

É possível que a resposta das células, principalmente em relação à produção e secreção de metaloproteinases, determinada pela aplicação da força ortodôntica simulada, sofra influência de mediadores inflamatórios presentes nas culturas após o estímulo mecânico.

5.1 Método

A coleta dos dentes para as culturas no Bloco Cirúrgico da Faculdade de Odontologia da UFMG de forma asséptica, permitiu a seleção de dentes hígidos sem doença associada, como a cárie e a doença periodontal, diminuindo com isso, o risco de contaminação das culturas, tanto a derivada do próprio dente, se realizada, como demais culturas previamente mantidas na incubadora.

A rejeição de dentes submetidos a odontosseção e daqueles que não possuíam mais da metade da raiz formada era justificada por não permitirem a adequada imobilização do dente no momento da extração do ligamento periodontal e pela escassez de tecido.

A preocupação sobre qual dente deveria ser utilizado era irrelevante. Existem poucas evidências sobre as diferenças entre culturas derivadas de tipos de dentes diferentes. Mesmo assim, o potencial para essas diferenças alertou a utilização de somente dentes erupcionados e dentes funcionalmente ativos. O *status* de erupção foi considerado importante fator na característica das culturas primárias. Entretanto, foi comprovado recentemente que culturas celulares provenientes de terceiros molares não erupcionados e pré-molares erupcionados removidos por razões ortodônticas não

apresentaram diferenças consideráveis ⁽⁴³⁾.

No processamento dos dentes, ao realizar a raspagem das raízes para a extração do ligamento periodontal, em 17 (39,5%), não foram encontrados remanescentes do tecido, ficando a maior parte dele aderido à cavidade alveolar do paciente. Por isso o aproveitamento dos dentes foi de aproximadamente 60,5%.

A extração do dente, usualmente resulta no rompimento do ligamento periodontal, com uma porção permanecendo ligada ao osso alveolar, e outra porção na superfície radicular. Foi demonstrado em estudos clínicos de avulsão dentária e reimplante do ligamento periodontal, que a porção remanescente radicular também é de suma importância para a regeneração do tecido e ligação do dente ao alvéolo. O tecido que permaneceu aderido à raiz do dente foi o utilizado para as culturas de fibroblastos ⁽⁴³⁾.

Na extração do ligamento periodontal, eram desprezados parte do terço coronário e o tecido no ápice radicular. Culturas *in vitro* derivadas da gengiva ou do ligamento periodontal apresentam diferenças significativas. Para assegurar que o tecido revestindo a raiz de um dente extraído não contenha fragmentos da gengiva, somente o terço médio da raiz deve ser utilizado para cultura. Do mesmo modo, é evitado o terço apical para minimizar a cultura de tecido pulpar ^(13, 43).

Durante a troca de meio, deve-se, manusear a cultura sempre de modo a evitar o desprendimento dos fragmentos de tecido. Esse procedimento visa preservar o rendimento de células dos explantes ⁽⁴³⁾.

Experimentos *in vitro* sugerem que a utilização de uma lamínula de vidro diretamente sobre os explantes, na superfície dos frascos de cultura por alguns minutos no momento da adição do meio de cultura, é considerada como uma alternativa para promover a adesão dos explantes na superfície ⁽⁴³⁾.

O uso inicial de hidrocortisona adicionado ao meio de cultura, visa promover a adesão e proliferação celular, mas deve ser evitada em altas concentrações porque pode exercer um efeito citostático e induzir diferenciação celular nas culturas ⁽⁴⁴⁾.

5.2 Estimulação das culturas

O modelo de aplicação de força mecânica em culturas de células por meio da centrifugação, simulando a força ortodôntica nas culturas de fibroblasto, foi escolhido por ser um sistema simples de ser executado onde se pode definir a intensidade da força desejada. Outra vantagem da pressão centrífuga, é que se pode avaliar o efeito direto da pressão nas células isolando-a, em grande parte, da resposta tecidual observada *in vivo* ⁽⁴⁰⁾.

A intensidade e tempo de aplicação da força mecânica foram escolhidos com base em estudos publicados na literatura, onde era comprovada a produção de proteínas da matriz extracelular pela aplicação de força centrífuga compatível com a força ortodôntica ^(9, 11, 40, 41, 42).

Outros modelos de aplicação de força mecânica em culturas celulares também foram desenvolvidos para estudar as diferentes respostas quanto à produção de

proteínas e comportamento celular.

Experimentos *in vitro* que empregaram o uso de modelos bidimensionais com membranas de silicone elásticas demonstraram a resposta de fibroblastos a diferentes intensidades e frequências de estímulo mecânico ⁽⁵⁾. Cultura de fibroblastos em base de colágeno tipo I permite que eles desenvolvam, tridimensionalmente, interações mediadas por integrinas com substratos usualmente presentes na matriz extracelular, objetivando uma representação mais próxima do seu micro-ambiente *in vivo* ⁽⁵⁾.

Forças mecânicas podem alterar as respostas biológicas. Os mecanismos de transdução de sinal de estímulos mecânicos *in vivo* envolvem componentes extracelulares afetando sua superfície e estimulando a síntese de proteínas via remodelações do citoesqueleto. As forças mecânicas alteram a forma e a estrutura das células, *in vitro*, transmitem sinais intracelulares que podem modificar a atividade celular ⁽¹¹⁾.

5.3 Viabilidade Celular

O teste de viabilidade celular foi realizado para verificar se a intensidade e o tempo de aplicação da força durante a centrifugação nas culturas poderia causar lise e morte celular.

No presente trabalho foi verificada a viabilidade logo após a aplicação da força mecânica e nos intervalos de tempo de coleta do meio de cultura e do lisado celular.

Não houve perda celular significativa em nenhum dos momentos em que o teste era realizado.

Entretanto, em experimentos de centrifugação de fibroblastos gengivais caninos, foi observada viabilidade de 90% em culturas estimuladas por 90 minutos a 1000 RPM com uma força correspondente a $33,5\text{gf/cm}^2$. Com o aumento da intensidade da força observou-se uma queda na viabilidade celular. A força exercida a 1000 RPM correspondeu nesse estudo a $33,5\text{gf/cm}^2$, que também pode ser usada na clínica ortodôntica ⁽¹¹⁾.

Nos estudos onde foram dosadas as expressões de RNAm de diversas proteínas em fibroblastos submetidos à centrifugação, o teste de viabilidade celular foi realizado somente após as estimulações, porque a coleta das amostras para o estudo era realizada apenas nesse momento. Tais estudos apresentaram viabilidade de 90% após 90 minutos de centrifugação a 1000 RPM. Ao aumentar-se a velocidade de centrifugação para 1500 RPM e 2000 RPM foi observada uma perda de células viáveis de 30% e 50% respectivamente. Aumentando-se o intervalo de tempo das estimulações para 120 minutos e 150 minutos observou-se respectiva queda de 20% e 30% na viabilidade celular ^(11, 40, 42).

No presente trabalho utilizamos uma centrifugação a 141g, que não compromete a viabilidade celular, aplicadas durante 30, 60, 90 e 120 minutos. Para estudo dos efeitos tardios da estimulação, amostras do meio de cultura e do lisado celular eram coletadas 24, 48 e 72 horas após a estimulação

5.4 Coleta do Material

Para efetuar a lise das células, foi usada solução de Triton-X 100 a 0,5% com PBS e pH 7,4. Sabe-se que o Triton-X age como detergente e pode promover o rompimento das membranas celulares, liberando o conteúdo presente no interior celular, o que possibilitou a dosagem de proteínas em produção, estruturais e armazenadas em compartimentos intracelulares.

Para homogeneização, foi empregada a simulação do uso de um homogeneizador do tipo "*loose-fitting*" através da aspiração e dispensa rigorosa por uma seringa com agulha de metal até a obtenção de uma suspensão com aspecto homogêneo. Cada ciclo de aspiração e dispensa foi repetido por volta de 7 a 10 vezes em cada amostra.

A coleta das amostras nos períodos determinados no presente estudo (24, 48 e 72 horas) foi escolhida levando em consideração um tempo mínimo para que, após a troca de meio de cultura e a aplicação do estímulo nos grupos testados, possa ser detectada quantidade mensurável de proteínas incluindo a metaloproteinase. O último intervalo (72 horas) foi escolhido pelo fato das trocas de meio de cultura serem realizadas aproximadamente num prazo de três dias, quando o pH do meio de cultura diminui para níveis abaixo do fisiológico. A partir desse momento, não somente a centrifugação, mas também o pH menor que 7,2 do meio de cultura, poderia interferir na resposta celular.

5.5 O zimograma

O método mais sensível e prático usado para a detecção de gelatinase B é o uso de zimogramas. Esta técnica foi desenvolvida no final da década de 70 para o estudo de ativadores do plasminogênio e depois foi adaptada para outras proteases, incluindo as gelatinases. A técnica consiste no emprego de géis de poliacrilamida co-polimerizados com gelatina submetidos à eletroforese de amostras de proteína na presença de Dodecilsulfato de sódio (SDS) seguida pela lavagem e remoção do SDS. A incubação pernoite a 37°C permite a reativação enzimática e a degradação do substrato co-polimerizado. A vantagem desse método é a sensibilidade de detectar enzimas presentes na ordem de picogramas e a possibilidade de discriminar entre as formas de gelatinases com base nos respectivos pesos moleculares. Isso permite a diferenciação entre a gelatinase A e B e suas pró-formas, ativadas pela ação dos detergentes, além de possibilitar a diferenciação, quando presente, de espécies ativas, entre monômeros e homodímeros ou heterodímeros. Nesses casos, complexos não covalentes, como gelatinase B e TIMP são prontamente dissociadas pelo SDS presente no gel e são separadas durante a eletroforese ⁽²³⁾.

A zimografia é uma técnica de eletroforese usada para identificar a atividade proteolítica sob condições não redutoras. Ela é amplamente usada no estudo *in vitro* da expressão de proteases em microambientes neoplásicos ⁽⁴⁵⁾.

Uma das propriedades da zimografia que a torna uma técnica de grande interesse no estudo das metaloproteinasas é o fato de diferenciar as formas ativa e latente das gelatinases através de sua massa molecular. Acredita-se que a forma latente possa ser ativada por desnaturação seguida pelo auto-ajuste molecular com a quebra do pró-domínio. Essa propriedade é vantajosa em relação a outras técnicas de

ativação enzimática como *ELISA*, que quantificam o total da enzima presente, mas não diferenciam as formas latente da ativa^(25, 45).

Para a realização da zimografia do meio de cultura, era necessário remover o soro fetal bovino, pois nele já se encontravam quantidades consideráveis da metaloproteinase 2. O novo meio de cultura sem soro fetal bovino era testado previamente em outras culturas e mostrou que pelo menos a curto prazo, as células não sofrem nenhum dano na sua ausência. Esses dados estão de acordo com outros trabalhos da literatura⁽⁴⁶⁾.

Após a dispensa das amostras previamente homogeneizadas no gel, este foi mantido sob refrigeração a aproximadamente 4°C ligado ao gerador elétrico a 90 V e 35 mA. A separação de proteínas ocorre na forma desativada e, após a lavagem e incubação, as mesmas são ativadas, permitindo a degradação da gelatina ou da caseína usadas na preparação do gel. Esse método mostrou-se eficaz na observação da presença da gelatinase A e ausência da gelatinase B além de outras metaloproteinases, avaliadas com gel de caseína, no lisado celular e no meio de cultura.

A presença de MMP2 e MMP-9 já foi detectada pela zimografia do meio de cultura de fibroblastos de tendão de coelho cultivados sobre base de colágeno durante 24, 72 e 168 horas de cultivo⁽⁴⁶⁾. Em fibroblastos humanos derivados do ligamento periodontal cultivados em base de colágeno onde foi permitida a contração dos géis, também foi detectada a presença das duas metaloproteinases⁽⁸⁾.

A cultura de fibroblastos periodontais humanos em monocamada expressa quantidades mensuráveis de RNAm de MMP-2 enquanto que outras metaloproteinases são pouco detectadas, e na zimografia com gel de gelatina do meio de cultura expressou somente a MMP-2 ⁽⁴⁷⁾.

5.6 Ação da força mecânica

Apesar das forças mecânicas serem essenciais para a homeostase dos tecidos, o mecanismo no qual as células do tecido conjuntivo captam esses sinais mecânicos e produzem respostas específicas como a expressão de mediadores inflamatórios é pouco compreendido. Existem regiões de maior sensibilidade mecânica nas células, mas os mecanismos de adaptação e transdução de sinal do estímulo mecânico nessas regiões ainda não são bem conhecidos ⁽⁴⁷⁾. Foi postulado que forças mecânicas induzem mudanças conformacionais que ativam moléculas específicas nos sítios de adesão. Componentes trans-membrana e, principalmente, as integrinas e as proteínas adaptadoras são os principais exemplos dessas moléculas. As integrinas conectam a matriz extracelular ao citoesqueleto, o que permite a transmissão da força externa a esses componentes intracelulares ^(48, 49).

Fibroblastos humanos derivados da derme cultivados em base de colágeno e submetidos a uma aplicação de força tridimensional apresentam uma forma mais alongada com desenvolvimento de fibras de actina dependendo da intensidade da força aplicada ⁽⁵⁾.

No presente estudo foi demonstrado que a aplicação de força mecânica nas células provoca diminuição no armazenamento total de proteínas nas culturas estimuladas em relação ao controle, demonstrada pela queda significativa na concentração de proteínas totais no lisado celular, enquanto que no meio de cultura não ocorre alteração significativa.

Considerando a diferença de 10 vezes em relação ao volume das amostras de lisado celular (0,2 mL) e meio de cultura (2 mL), era possível inferir que a quantidade de proteínas produzidas pelas células e liberadas para o meio de cultura em todos os grupos nos intervalos de tempo das coletas era, no mínimo, duas vezes maior no meio de cultura do que no lisado celular.

Fibroblastos humanos, derivados do ligamento periodontal e da gengiva, estimulados por centrifugação durante 16 horas a 217g não mostram alterações na secreção de proteínas como lactato desidrogenase nem na proliferação celular. Entretanto a adesão dos fibroblastos gengivais e periodontais a componentes da matriz extracelular diminuiu significativamente quando comparada ao controle (fibroblastos gengivais, $p < 0,05$ e fibroblastos periodontais, $p < 0,01$)⁽⁴⁰⁾.

Não foram encontradas diferenças significativas na atividade tanto da forma latente quanto da ativa da metaloproteinase 2 relacionada à intensidade de estimulação das culturas no lisado celular. Sendo a metaloproteinase uma enzima de ação extracelular, é coerente afirmar que a produção e o armazenamento das duas formas da enzima não foram alteradas pela aplicação da força, uma vez que ela é transportada em vesículas alinhadas com o citoesqueleto, que participa na captação do estímulo

mecânico e provoca respostas celulares ⁽⁵⁰⁾. Esse fato sugere que possa haver um desvio na produção e armazenamento total de proteínas em relação à produção da MMP-2 tanto da sua forma latente quanto ativa demonstrada no lisado celular.

A aplicação da força mecânica nas culturas provocou uma queda significativa da atividade da pró-MMP 2 nos períodos iniciais do experimento (24 horas), demonstrada no meio de cultura. No período seguinte (48 horas), somente a estimulação por 30 minutos foi significativamente menor que o controle. No intervalo final (72 horas) não foi encontrada diferença na atividade da forma latente da enzima em relação à estimulação e o controle.

Apesar da estimulação ter causado queda da atividade de pró-MMP 2 nos períodos iniciais, houve uma recuperação progressiva da atividade da pró-MMP 2 e ao final do estudo, sua atividade já havia se comparado aos níveis basais das culturas. Esse fato pode ser entendido como um retardo na atividade causada pela aplicação da força mecânica.

Foi demonstrado no estudo, que em cultura, a atividade da pró-MMP 2 era significativamente maior comparada com a atividade da MMP-2 em todos os grupos, tanto no lisado celular quanto no meio de cultura.

Resultado semelhante foi encontrado ao cultivar tendões de cauda de rato, onde foram demonstradas expressões substanciais de RNAm da MMP-1 por *Northern blotting* após 24 horas. Quando os tendões foram submetidos à tensão mecânica, houve um decréscimo significativo na expressão da MMP-1. Também foram

detectadas expressões substanciais de pró-MMP 1 e MMP-1 por *Western immunoblotting* após 24 horas de cultivo sem aplicação de tensão ⁽⁴⁹⁾.

Ao estudar a produção de proteínas em cultura de fibroblastos humanos derivados do ligamento periodontal e estimulados por diferentes durações de força centrífuga, foram encontrados que os níveis de RNAm de β -actina diminuíram 20% em culturas centrifugadas por 120 minutos. No mesmo estudo, resultados diferentes foram encontrados nos níveis de RNAm da colagenase 1 (MMP-1) e tropoelastina, que aumentaram significativamente com 30 minutos de centrifugação ($p < 0,05$). Esse aumento foi de 2,6 vezes para a MMP-1 e 4 vezes para a tropoelastina. Esta, manteve-se em níveis 3 vezes maiores a 60 minutos ($p < 0,05$) ^(40, 42).

A expressão de RNAm de colagenase (MMP-1) encontrada em fibroblastos caninos submetidos a diferentes intensidades de força mecânica por centrifugação, também foi inferior ao controle ⁽¹¹⁾.

No presente estudo, não foi observada diferença em relação à forma ativa da metaloproteinase 2 comparada entre os grupos controle e estimulados no meio de cultura, demonstrando que a secreção da enzima se manteve em proporções semelhantes. Somente era possível ser observado o aumento do grupo controle entre os intervalos de tempo das análises, de 24 a 72 horas, explicado pela proliferação celular ocorrida durante esse período, e possível desvio da secreção em relação à MMP-2 nas culturas não estimuladas, já que não ocorre o mesmo aumento na concentração de proteínas totais no meio de cultura.

Resultado semelhante foi encontrado nos níveis de RNAm de MMP-1 em células cultivadas em base de colágeno retrátil (RCG), onde houve aumento da expressão com o relaxamento da base, permitindo o relaxamento celular, porém queda com a aplicação de tensão sobre a mesma. A adição de citocalasina D, que produz relaxamento celular pelo desmembramento do citoesqueleto, induziu um aumento semelhante na expressão de RNAm de MMP-2 e 14 comparado com o controle. Nesse mesmo estudo, foram avaliadas as expressões de MMP-2, 3, 8, 9, 11, 13 e 14, e apesar da variação na expressão de cada uma delas, apenas a MMP-2 pode ser observada em níveis basais sem relação com a ação de força mecânica nem tratamento com citocalasina D⁽⁴⁷⁾.

5.7 Perspectivas futuras

Os mecanismos de transdução de sinal pelos quais a síntese e liberação de MMPs são alteradas por aplicação de força e suas interações com as alterações estruturais do citoesqueleto constituem uma área de estudo que poderá contribuir para o avanço do conhecimento básico e posterior aplicação clínica ao planejamento terapêutico de pacientes que necessitam de correções ortodônticas.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

A aplicação de força ortodôntica simulada em culturas de fibroblastos humanos derivados do ligamento periodontal provoca queda na atividade de MMP-2, em sua forma latente, proporcional ao tempo de duração do estímulo mecânico. Com o passar do tempo das coletas, a atividade se recupera permanecendo semelhante aos níveis basais. A atividade da pró-MMP 2 é maior que a da MMP-2.

O modelo utilizado de força ortodôntica não diminui a viabilidade celular das amostras nos períodos seguintes às estimulações das culturas.

A concentração de proteínas totais presente no lisado celular diminui com a aplicação da força ortodôntica simulada nas culturas em relação às não estimuladas. Não houve variação significativa na excreção de proteínas totais do meio de cultura apesar da variação observada em relação à pró-MMP 2.

Referências bibliográficas

7. BIBLIOGRAFIA

1. Brasileiro Filho, G Bogliolo, Patologia, 6^a edição, 2000.
2. Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. McGraw-Hill, New York, NY, 5^a edição, 2003; 4:23.
3. Müssig E, Yomakidi P, Steinberg T. Molecules contributing to the maintenance of periodontal tissues. Journal of Orofacial Orthopedics 2005; 66: 422-33.
4. Kyrkanides S, O'Banion M, Subtelny JD. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in orthodontic tooth movement: Metalloproteinase activity and collagen synthesis by endothelial cells. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics 2000; 118: 203-9.
5. Derderian CA, Bastidas N, Lerman OZ, Bhatt KA, Lin SE, Voss J, Holmes JW, Levine JP. Mechanical Stain Alters Gene Expression in an in Vitro Model of Hypertrophic Scarring. Annals of Plastic Surgery 2005; 55: 69-75.
6. Kaneko S, Ohashi K, Soma K, Yanagishita M. Occlusal hypofunction causes changes of proteoglycan content in the rat periodontal ligament. Journal of Periodontal Research 2001; 36: 9-17.
7. Winter S, Kohl A, Huppertz A, Herold-Mende C, Wiest T, Komposch G, Tomakidi P. Expression of mRNA encoding for growth factors, ECM molecules, and MMP-13 in mono-cultures and co-cultures of human periodontal ligament fibroblasts and alveolar bone cells. Cell Tissue Res. 2005; 319: 467-78.
8. Von den Hoff JW. Effects of mechanical tension on matrix degradation by human periodontal ligament cells cultured in collagen gels. J. Periodont. Res. 2003; 38: 449-57.
9. Moyers RE. Ortodontia. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ, 4^a edição, 1991.
10. Roberts-Harry D, Sandy J. Orthodontics. Part 11: Orthodontic tooth movement. British Dental Journal 2004; 196: 391-4.
11. Redlich M, Palmon A, Zaks B, Geremi E, Raysman S, Shoshan S. The effect of centrifugal force on the transcription levels of collagen type I and collagenase in cultured canine gingival fibroblasts. Archives of Oral Biology 1998; 43: 313-6.

12. Ingman T, Apajalahti S, Mäntylä P, Savolainen P, Sorsa T. Matrix metalloproteinase-1 and -8 in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: a pilot study during 1 month of follow-up after fixed appliance activation. *European Journal of Orthodontics* 2005; 27: 202-7.
13. Norton LA, Andersen KL, Arenholt-Bindslev D, Andersen L, Melsen B. A methodical study of shape changes in human oral cells perturbed by simulated orthodontic strain *in vitro*. *Archs. Oral Biol.* 1995; 40: 863-72.
14. Takahashi I, Nishimura M, Onodera K, Bae JW, Mitani H, Okazaki M, Sasano Y, Mitani H. Expression of MMP-8 and MMP-13 genes in the periodontal ligament during tooth movement in rats. *J. Dent. Res.* 2003; 82: 646-51.
15. Holliday LS, Vakani A, Archer L, Dolce C. Effects of matrix metalloproteinase inhibitors on bone resorption and orthodontic tooth movement. *J. Dent. Res.* 2003; 82: 687-91.
16. Belotti D, Paganoni P, Maneti L, Garofalo A, Marchini S, Taraboletti G, Glavazzi R. Matrix Metalloproteinases (MP9 and MP2) Induce the Release of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) by Ovarian Carcinoma Cells: Implications for Ascites Formation. *Cancer Research* 2003; 63: 5224-9.
17. Stygar D, Wang H, Vladic YS, Ekman G, Eriksson H, Sahlin L. Increased level of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ripening process of human cervix. *Biology of Reproduction* 2002; 67: 889-94.
18. Nakamura T, Sakamoto A, Ishikawa T. Effects of hyaluronan on matrix metalloproteinase activity in skin fibroblasts. *International Congress Series* 1223 2001; 259-63.
19. Xu X, Wang Y, Lauer-Fields JL, Fields GB, Steffensen B. Contributions of the mmp-2 collagen binding domain to gelatin cleavage substrate binding via collagen binding domain is required for hydrolysis ofm gelatin but not short peptides. *Matrix Biology* 2004; 23: 171-81.
20. Sheu BC, Lien HC, Ho HN, Lin HH, Chow SN, Huang SC, Hsu SM. Increased Expression and Activation of Gelatinolytic Matrix Metalloproteinases Is Associated with the Progression and Recurrence of Human Cervical Cancer. *Cancer Reserch* 2003; 63: 6537-42.
21. Quesada AR, Barbacid MM, Mira E, Fernández-Resa P, Márquez G, Aracil M. Evaluation of fluorometric and zymographic methods as activity assays for stromelysins and gelatinases. *Clinical & Experimental Metastasis* 1997; 15: 26-32.
22. Cai G, Chen X, Fu B, Lu Y. Activation of gelatinases by fibrin is PA/plasmin system-dependent in human glomerular endothelial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2005; 277: 171-9.

23. Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 2002; 37: 375-536.
24. Onodera S, Nishihira J, Iwabuchi K, Koyama Y, Yoshida K, Tanaka S, Minami A. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates matrix metalloproteinase-9 and -13 in rat osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 7865-74.
25. Gogly B, Groult N, Hornebeck W, Godeau G, Pellat B. Collagen zymography as a sensitive and specific technique for the determination of subpicogram levels of interstitial collagenase. *Analytical biochemistry* 1998; 255: 211-6.
26. Gruber BL, Sorbi D, French DL, Marchese MJ, Nuovo GJ, Kew RR, Arbeit LA. Markedly elevated serum MMP-9 (gelatinase B) levels in Rheumatoid arthritis: A potentially useful laboratory marker. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1996; 78: 161-71.
27. Tam EM, Moore TR, Butler GS, Overall CM. Characterization of the distinct collagen binding, helicase and cleavage mechanisms of matrix metalloproteinase 2 and 14 (gelatinase A and MT1-MMP). *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 43336-44.
28. Subhadeep C, Patel K. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Experimental Lung Research* 2005; 31: 599-621.
29. Falconi M, Altobelli G, Iovino MC, Politi V, Desideri A. Molecular dynamics simulation of matrix metalloproteinase 2: fluctuations and time evolution of recognition pockets. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 2003; 17: 837-48.
30. Burbridge MF, Cogé F, Galizzi JP, Boutin JA, West DC, Tucker GC. The role of the matrix metalloproteinases during *in vitro* vessel formation. *Angiogenesis*. 2002; 5: 215-26.
31. Balducci C, Lilli C, Stabellini G, Marinucci L, Giustozzi G, Becchetti A, Cagini L, Locci P. Human desmoid fibroblasts: Matrix metalloproteinases, their inhibitors and modulation by toremifene. *BMC Cancer* 2005; 5-22.
32. Ehrich D, Tripathi B, Tripathi R, Duncker G. Effects of interleukin-1 β and dexamethasone on the expression of matrix metalloproteinase mRNA by trabecular cells exposed to elevated hydrostatic pressure. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 2005; 83: 104-8.
33. Andarawewa KL, Boulay A, Masson R, Mathelin C, Stoll I, Tomasetto C, Chenard MP, Gintz M, Bellocq JP, Rio MC. Dual Stromelysin-3 Function during Natural Mouse Mammary Tumor Virus-ras Tumor Progression. *Cancer Research* 2003; 63: 5844-9.

34. Patterson D, Hayes WP, Shi YB. Transcriptional Activation of the Matrix Metalloproteinase Gene stromelysin-3 Coincides with Thyroid Hormone-Induced Cell Death during Frog Metamorphosis. *Developmental Biology* 1995; 167: 252-62.
35. Ludwig MG, Basset P, Anglard P. Multiple Regulatory Elements in the Murine Stromelysin-3 Promoter. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 39981-90.
36. Kapila YL, Kapila S, Johnson PW. Fibronectin and Fibronectin Fragments Modulate the Expression of Proteinases and Proteinase Inhibitors in Human Periodontal Ligament Cells. *Matrix Biology* 1996; 15: 251-61.
37. Grenier D, Mayrand D. Inactivation of Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) by *Porphyrromonas gingivalis*. *FEMS Microbiology Letters* 2001; 203: 161-4.
38. Fernández-Resa P, Mira E, Quesada R. Enhanced detection of casein zymography of matrix metalloproteinases. *Analytical Biochemistry* 1995; 224: 434-5.
39. Redlich M, Roos H, Reichenberg E, Zaks B, Grosskop A, Kana IB, Pitaru S, Palmon A. The effect of centrifugal force on mRNA levels of collagenase, collagen type-I, tissue inhibitors of metalloproteinases and β -actin in cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Periodontal Research* 2004; 39: 27-32.
40. Theilig C, Bernd A, Leyhausen G, Kaufmann R, Geurtsen W. Effects of mechanical force on primary fibroblasts derived from the gingiva and the periodontal ligament. *J. Dent. Res.* 2001; 80: 1777-80.
41. Yoshino H, Morita I, Murota S, Ishikawa I. Mechanical stress induces production of angiogenic regulators in cultured human gingival and periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Periodontal Research* 2003; 38: 405-10.
42. Redlich M, Roos HA, Reichenberg E, Zaks B, Mussig D, Baumert U, Golan, I, Palmon A. Expression of tropoelastin in human periodontal ligament fibroblasts after simulation of orthodontic force. *Archives of Oral Biology* 2004; 49: 119-24.
43. Oates Jr. T, Hoang AM. Periodontal Ligaments. *Human Cell Culture* 2001; 27-41
44. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: a manual of basic technique*. Wiley-Liss. United States of America 2000.

-
45. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative Zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Analytical Biochemistry* 1994; 218: 325-9.
 46. Ragoowansi R, Khan U, Brown RA, Mcgrouter DA. Differences in morphology, cytoskeletal architecture and protease production between zone II tendon and synovial fibroblast *in vitro*. *Journal of Hand Surgery* 2003; 28: 465-70.
 47. Lambert CA, Colige AC, Munaut C, Lapière CM, Nusgens BV. Distinct pathways in the over-expression of matrix metalloproteinases in human fibroblasts by relaxation of mechanical tension. *Matrix Biology* 2001; 20: 397-408.
 48. Sarasa-Renedo A, Chiquet M. Mechanical signals regulating extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 2005; 15: 223-30.
 49. Arnoczky SP, Tian T, Lavagnino M, Gardner K. Ex vivo static tensile loading inhibits MMP-1 expression in rat tail tendon cells through a cytoskeletonally based mechanotransduction mechanism. *Journal of Orthopaedic Research* 2004; 22: 328-33.
 50. Schnaeker EM, Ossig R, Ludwig T, Dreier R, Oberleithner H, Wilhelmi M, Schneider S. Microtubule-dependent matrix metalloproteinase-2/matrix metalloproteinase-9 exocytosis: Prerequisite in human melanoma cell invasion. *Cancer Research* 2004; 64: 8924-31.
 51. Gelatin Zymography. University of Bristol. <http://www.bris.ac.uk/Depts/BHI/mark/zymo.html>
 52. Tris-glycine SDS-Polyacrylamide Gel (SDS-PAGE Calculator). Chang Bioscience. <http://www.changbioscience.com/calculator/sdspc.htm>

Anexos

ANEXO 2

Faculdade de Medicina – UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Av. Alfredo Balena, 190 – Bairro Santa Efigênia

Fone.: (31) 3248 – 9762 Fax.:3248 – 9760

CEP.: 30.130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado Paciente,

O senhor(a) está sendo convidado(a) para participar, como voluntário(a), em uma pesquisa.

Antes de decidir se quer participar, é importante que o senhor(a) entenda a razão deste estudo e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos. Por favor, leia atentamente todas as informações deste folheto. Por favor, faça perguntas se tiver qualquer dúvida. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Atividade de Metaloproteinases em Fibroblastos Humanos Expostos a Força Ortodôntica Simulada em Cultura

Pesquisadores: Prof. Dr. José Renan da Cunha Melo, Dr. Rodolfo Assis Lisboa

Telefone para contato: (31) 3248 – 9762 / 8833 – 4953

Qual o objetivo desta pesquisa?

A pesquisa em questão tem como objetivo cultivar células presentes no ligamento periodontal de dentes que foram extraídos dentro do bloco cirúrgico. Em laboratório, será feita uma raspagem do dente extraído para obtenção de células a serem cultivadas.

Quando a cultura estiver pronta, as células serão centrifugadas durante tempos diferentes e estudadas as características dessas células. Também será estudada a produção de substâncias conhecidas como metaloproteinases.

Preciso Participar?

A sua participação no estudo é voluntária e depende só do senhor(a). Se decidir participar, o senhor(a) irá assinar este documento chamado Consentimento Livre e Esclarecido. Mesmo decidindo participar, o senhor(a) poderá desistir a qualquer momento. Se o senhor(a) não participar do estudo ou desistir de participar, isso em nada afetará o seu atendimento nesta faculdade e o senhor(a) continuará recebendo do seu dentista o mesmo tratamento proposto.

O que acontecerá se eu participar?

A sua cirurgia será realizada conforme o planejamento realizado pelo seu dentista. O dente extraído junto com o ligamento periodontal que estiver aderido nele será recolhido e usado como descrito na página anterior.

O que devo fazer?

Seguir os procedimentos informados pelo seu dentista para que seu tratamento ocorra da melhor maneira possível.

Se o senhor(a) desejar sair do estudo, favor entrar em contato com os pesquisadores.

Quais são os possíveis riscos e desconfortos que poderão ocorrer?

Os procedimentos a serem realizados nesta pesquisa, são inócuos, nada será introduzido no seu organismo e não existe risco de dor e/ou desconforto.

Quais são os possíveis benefícios?

Esta pesquisa não traz nenhum benefício direto ao senhor(a). As informações obtidas neste estudo poderão contribuir para um melhor planejamento odontológico de pessoas que não tem os dentes adequadamente distribuídos na arcada dentária.

A informação obtida será confidencial?

Somente os pesquisadores saberão que o senhor(a) participou do estudo. O resultado deste estudo será publicado em revista especializada, sem identificação de quem doou o tecido.

Se o senhor(a) tiver alguma dúvida sobre o estudo, por favor entre em contato com os pesquisadores.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO ESCRITO

Eu,
(nome do paciente em letra de fôrma)

li e entendi toda a informação que me foi fornecida sobre minha participação no presente estudo e tive a oportunidade de discutir e tirar dúvidas. Todas as minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente e concordo voluntariamente em participar da presente pesquisa. Entendo que receberei uma cópia desse Termo de consentimento Livre e Esclarecido assinado.

Autorizo a divulgação dos resultados do estudo em revistas especializadas nacionais ou internacionais. Entendi que toda informação que eu fornecer será processada e analisada de maneira confidencial.

Eu concordo em participar deste estudo

Paciente

Nome:

Data:/...../..... Assinatura:

Eu expliquei a natureza e o propósito deste estudo para o paciente acima denominado.

Pesquisador

Nome:

Data:/...../..... Assinatura:

Se aplicável,

Testemunha (1) Eu testemunhei a explicação e o propósito deste estudo para o paciente acima denominado.

Nome:

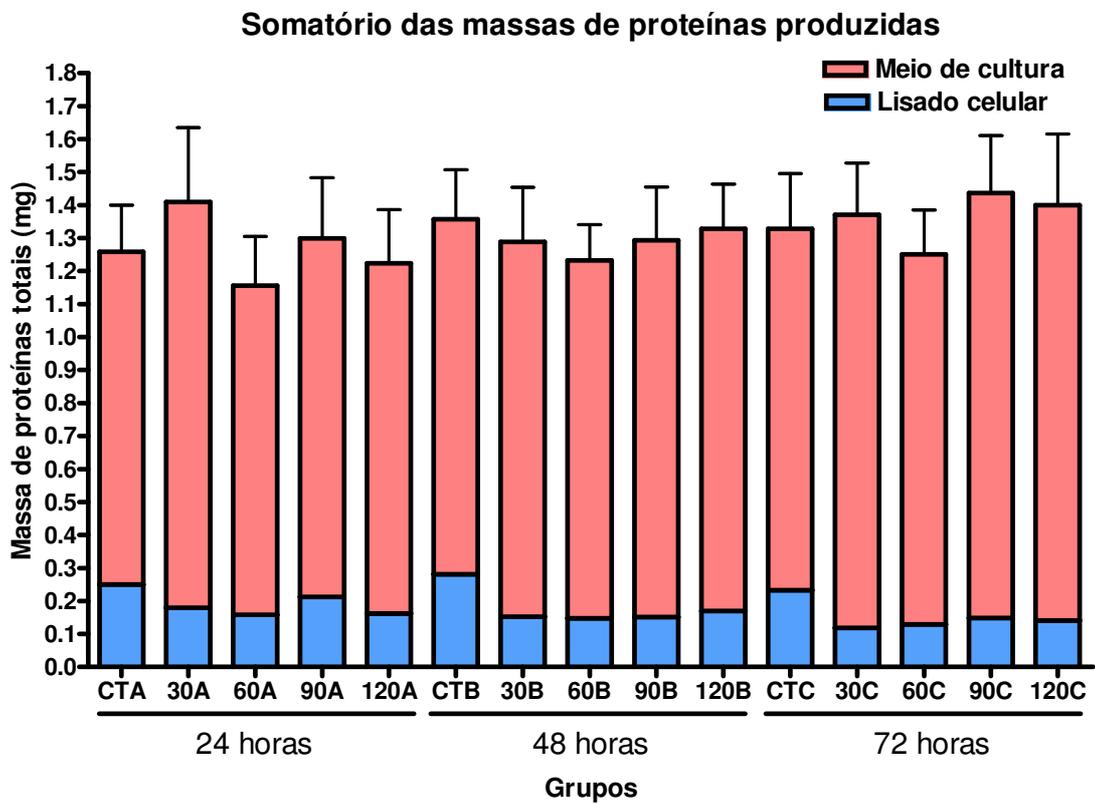
Data:/...../..... Assinatura:

Testemunha (2) Eu testemunhei a explicação e o propósito deste estudo para o paciente acima denominado.

Nome:

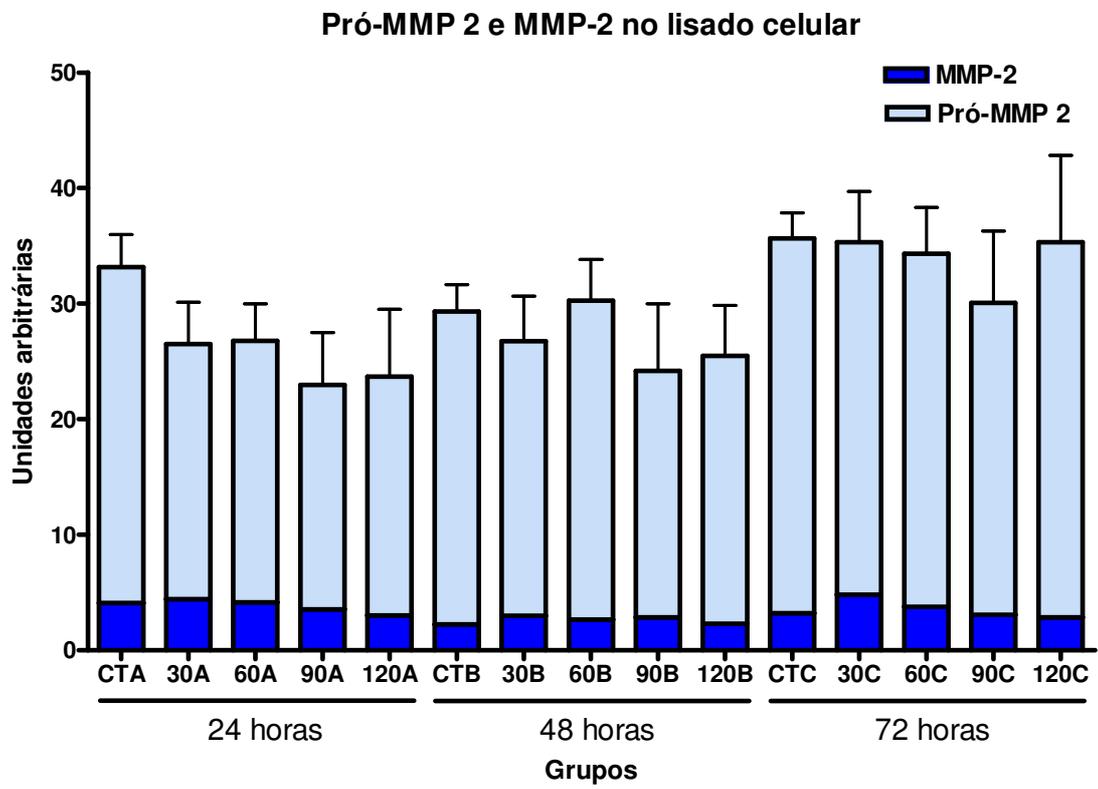
Data:/...../..... Assinatura:

ANEXO 3



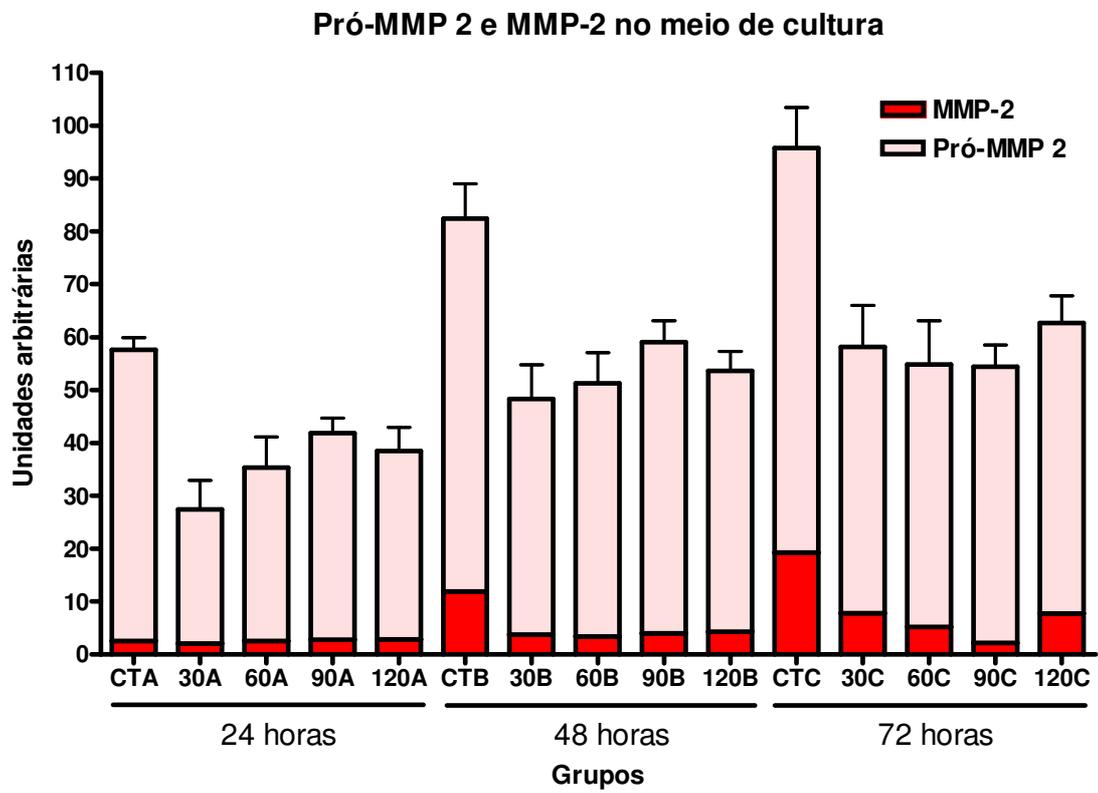
Mann-Whitney, $p < 0,05$

ANEXO 4



Mann-Whitney, $p < 0,05$

ANEXO 5



Mann-Whitney, $p < 0,001$

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)