

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

NÁDIA FAYEZ OMAR

Cirurgiã Dentista

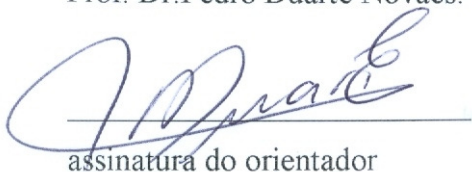
Mestre em Biologia Buco-Dental / Histologia

**Relação das MMPs, TIMP-2 e organização do colágeno com a força
de resistência do ligamento periodontal ao movimento eruptivo em
incisivos de ratos.**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da UNICAMP para obtenção do título de Doutor em Biologia Buco-Dental, na área de concentração em Histologia e Embriologia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes

Este exemplar corresponde à
versão final da Tese defendida
pelo aluno, e orientada pelo
Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes.



assinatura do orientador

Piracicaba, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
GARDÊNIA BENOSSI – CRB8/8644 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

Om1r Omar, Nádia Fayez-
Relação das MMPs, TIMP-2 e organização do colágeno com a
força de resistência do ligamento periodontal ao movimento
eruptivo em incisivos de ratos / Nádia Fayez Omar. -- Piracicaba,
SP : [s.n.], 2011.

Orientador: Pedro Duarte Novaes.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Metaloproteinases. 2. Dentes - Erupção. 3. Ligamento
periodontal. I. Novaes, Pedro Duarte. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: MMPs, TIMP-2 and collagen organization relation with the
resistance that the PL offers to the eruptive movement in rat incisors

Palavras-chave em Inglês:

Metalloproteases

Tooth eruption

Periodontal ligament

Área de concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora:

Pedro Duarte Novaes [Orientador]

Elizabete Brasil dos Santos

Fernanda Klein Marcondes

Maria Luiza Ozores Polacow

Silvana Pasetto

Data da defesa: 20-10-2011

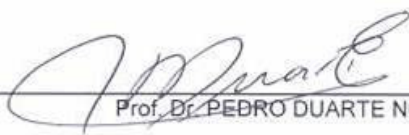
Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental



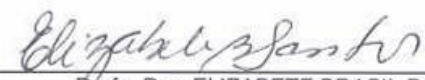
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

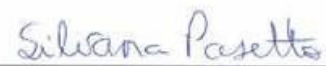


A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 20 de Outubro de 2011, considerou a candidata NÁDIA FAYEZ OMAR aprovada.


Prof. Dr. PEDRO DUARTE NOVAES


Profa. Dra. MARIA LUIZA OZORES POLACOW


Profa. Dra. ELIZABETE BRASIL DOS SANTOS


Profa. Dra. SILVANA PASETTO


Profa. Dra. FERNANDA KLEIN MARCONDES

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, na pessoa de seu Diretor Professor Doutor Jacks Jorge Júnior.

À coordenadora do Programa de Pós Graduação em Biologia Buco-Dental Professora Doutora Ana Paula de Souza Pardo pela ajuda e disposição em todos os momentos.

Ao Professor Doutor Sergio Line, deste Depto, pelo apreço e ajuda.

À Suzete e Joelma, pela ajuda junto à secretaria do Depto de Morfologia.

Ao Professor Doutor Ricardo Della Coletta, do Depto de Diagnóstico Oral, pela disponibilidade em ajudar, por abrir o espaço de seu laboratório e me ajudar a padronizar a técnica de western blotting.

Às Doutorandas do Depto de Diagnóstico Oral Rose Maria Ortega e Manoela C. M. Cavalcante Pereira pela inestimável ajuda com meus western blotting e pela amizade.

Ao Professor Doutor Francisco Groppo, do Depto de Farmacologia, pela ajuda com a estatística de minha pesquisa.

À Professora Doutora Silvana Pasetto, pela ajuda constante e pela imensa amizade.

Ao Professor Doutor José Rosa Gomes, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, amigo que com sua perseverança e sabedoria ajudou a construir a pesquisadora que sou hoje; e, com sua amizade e companheirismo me ajudou a ser a pessoa que sou hoje.

Ao Professor Doutor Marcelo Rocha Marques que, sempre com uma palavra esclarecedora e com sua amizade, se fez presente em minha vida acadêmica e pessoal.

À Bióloga Eliene Ap. Narvaes, por sua valiosa ajuda em todos os momentos, por sua determinação em ensinar e, sobretudo pela preciosa amizade e palavras incentivadoras e acolhedoras, carinho.

À Maria Aparecida Varela, técnica do laboratório de Histologia, pelo constante auxílio no preparo de minhas lâminas, pelo carinho e amizade.

À Ivani Odas pelo carinho e amizade.

Aos Amigos da Histologia: Juliana Neves, Gustavo Guimarães, Naiana Viola e Yamba Pereira, pelo companheirismo, carinho e amizade.

Aos todos os colegas da Histologia: Liza Ramenzoni, Denise Andia, Aline Planello, Marisi Aidar, Mariana Ribeiro, Luciana Mofatto, Simone Caixeta, Roberto Wolf Júnior, Juliana Pessoa, Gláucia Pereira, Daniele Portinho, Eduardo Urioste e Roger Guedes pela convivência agradável.

À todas as pessoas que, de alguma forma, colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

À Fapesp, pela concessão de bolsa de doutorado e auxílio regular à pesquisa para realização deste estudo (processos nº 2008/09225-7 e nº 2008/09141-8).

Agradecimento Especial

À **Minha Família**, mola propulsora de minhas conquistas, instituição na qual estão fundadas minhas bases; companheira, incentivadora e realizadora de meus projetos.

Minha Família é o que há de mais importante em minha vida.

§ § §

Ao meu **Orientador**, exemplo de vida para mim, pela oportunidade e confiança, por permitir que eu fizesse parte desta equipe, pelo incentivo ao crescimento, pela amizade construída ao longo destes anos.

Resumo

O ligamento periodontal (LP) é um tecido conjuntivo que ocupa o espaço entre o dente e seu alvéolo, e tem a função principal de ancoragem e suporte dos dentes. Baseados em dados na literatura que mostram que dentes em hipofunção são mais facilmente extraídos, investigamos qual(is) fatores e/ou moléculas poderiam ter relação com esse enfraquecimento da ancoragem do dente no osso por meio do LP. Dentre eles, investigamos a expressão de MMPs e TIMP-2, e organização do colágeno no LP, além da resistência que o LP oferece ao movimento eruptivo nos incisivos de ratos. Para isso, produzimos alteração na erupção de incisivos inferiores de ratos, durante períodos experimentais diferentes, produzindo hipofunção, hiperfunção e contenção do processo eruptivo, além da erupção normal; fazendo a medição da taxa de erupção em todos os grupos ao longo do período experimental.

Os resultados mostraram que no grupo hipofuncional a atividade de MMP-2 e a desorganização do colágeno aumentaram, contribuindo para a diminuição da força de resistência ao movimento eruptivo e para o aumento da taxa de erupção neste grupo. No grupo contido, a erupção dos incisivos foi interrompida, porém a atividade de MMP-2 aumentou em níveis variados ao longo do período experimental, enquanto a organização do colágeno e, consequentemente, a força de resistência do LP ao movimento eruptivo foram levemente menores. Por outro lado no grupo hiperfuncional a taxa de erupção não sofreu alteração, mas a atividade de MMP-2 estava aumentada, juntamente com a força de resistência do

LP ao movimento eruptivo, com leve desorganização do colágeno indicando, portanto, possíveis alterações em outras moléculas envolvidas no processo de remodelação da matriz extracelular no ligamento periodontal.

As análises de MT1-MMP e TIMP-2, nas condições deste estudo, não mostraram diferenças estatísticas entre os grupos e períodos estudados.

Esses dados sugerem papel da MMP-2 na remodelação do ligamento periodontal de incisivos de ratos, durante alterações na erupção, atuando diretamente sobre a degradação do colágeno, o que leva à alterações na resistência do ligamento ao movimento eruptivo, principalmente em hipofunção; e que MT1-MMP e TIMP-2 podem ter participação secundária neste processo.

Palavras chave: metaloproteinases, colágeno, incisivo de rato, erupção dentária, metabolismo do ligamento periodontal.

Abstract

The periodontal ligament (PL) is a tissue that occupies the space between tooth and its socket, and has main function to anchor and support the teeth. Based on published datas showing that hypofunctional teeth are more easily extracted, we investigated which one(s) factors and/or molecules could be related to the weakening of the periodontal ligament anchoring. We investigated the expression of MMPs and TIMP-2, collagen organization in the PL, and the resistance that the PL offers to the eruptive movement in rat incisors. Therefore, we altered the eruption of rat incisors, during different experimental periods, producing hypofunction, hyperfunction and restrain of the eruptive process, beyond the normal eruption, measuring the eruption rate, in all groups, throughout the experimental period.

The results showed that in the hypofunctional group the MMP-2 activity and collagen disorganization increased, contributing to the decrease in the resistance strength to the eruptive movement and increased eruption rate in this group. In the restrain group, the incisor eruption was interrupted, but the MMP-2 activity increased, to varying degrees, throughout the experimental period, while the collagen organization and, thus, the resistance strength to the eruptive movement of the PL were slightly lower. On the other hand, in the hyperfunctional group the eruption rate did not change, but MMP-2 activity and PL resistance strength to eruptive movement were increased, with a slight collagen disorganization, indicating, therefore, possible changes in other molecules involved in the periodontal ligament extracellular matrix remodeling.

Analyses of MT1-MMP and TIMP-2, under the conditions of this study, showed no statistical differences between groups and experimental periods.

These data suggest the role of MMP-2 in periodontal ligament remodeling of rat incisors, during altered eruption, acting directly on collagen degradation, which leads to changes in PL resistance to the eruptive movement, in hypofunction condition, and MT1- MMP and TIMP-2 may have secondary participation in this process.

Key words: metalloproteinases, collagen, rat incisor, dental eruption, periodontal ligament metabolism.

Sumário

1 – Introdução	1
2 – Revisão da Literatura	3
3 - Proposição	11
4 - Material e Métodos	12
5 – Resultados	19
6 – Discussão	28
7 – Conclusão	37
Referências	38
Anexo	49

1- Introdução

O ligamento periodontal (LP) envolve o dente dando suporte a ele no osso alveolar. Originado do folículo dentário, contem fibras colágenas e fibroblastos como principais componentes.

No incisivo de rato o LP também tem função de suporte do dente em seu alvéolo, estando exposto a diferentes tipos de força, permitindo que o dente erupcione continuamente, como é característico nesses roedores, ao mesmo tempo em que exerce certa resistência ao movimento eruptivo.

Estudos com dentes de roedores em hiper e hipofunção indicam que alterações na erupção podem induzir alterações na estrutura básica, biomecânica, e fisiológica do LP (Chiba *et al.*, 1981; Moxhan e Berkovitz, 1981; Komatsu, 1988).

Sendo assim, uma alteração na velocidade de erupção pode ser devido tanto ao aumento ou diminuição da força eruptiva do LP, aumento ou diminuição da resistência dos tecidos periodontais ou ainda das características de remodelação dos tecidos.

Alterações na taxa de erupção são produzidas por modificações na função oclusal, interferindo nas propriedades mecânicas do LP, por exemplo, a desocclusão de um incisivo de rato faz com que sua taxa de erupção dobre (Michaeli & Weinreb, 1968), e aumente a síntese de colágeno no LP, sugerindo aumento na remodelação da matriz do LP (Kanoza *et al.*, 1980).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são moléculas que atuam na remodelação da matriz extracelular, degradando alguns de seus componentes (Birkedal-Hansen, 1993; Stamenkovic, 2003).

Nossos estudos demonstram que a expressão dessas moléculas, nos tecidos periodontais de ratos, é modificada em condições alteradas de erupção (Salmon, 2008; Gomes *et al.*, 2010, 2011; Omar *et al.*, 2011).

Necessário se faz estabelecer possíveis relações entre a expressão dessas moléculas e a resistência do LP ao movimento eruptivo.

Por outro lado, as MMPs são reguladas por inibidores endógenos conhecidos como TIMPs (inibidores teciduais de MMPs). Variações nos níveis de TIMPs afetam o nível de atividade das MMPs (Visse & Nagase, 2003).

São recentes as descrições de MMPs e TIMPs em tecidos dentais, sendo escassas as conclusões sobre o papel dessas moléculas na remodelação do LP e seus componentes durante o processo eruptivo.

É necessário investigar as relações funcionais entre a expressão de MMPs e seus inibidores com as forças de resistência do LP e seus componentes, em incisivos de ratos, um modelo bastante usado para o estudo do processo eruptivo, uma vez que possui erupção e crescimento contínuo. Uma possibilidade de estabelecer tais relações é alterar a condição de erupção do incisivo por hipofunção (aceleração da erupção) ou contenção do processo eruptivo.

Assim, a análise da resistência que o LP oferece ao movimento eruptivo; a organização do colágeno (principal componente do LP) e a expressão de moléculas responsáveis pela remodelação do LP, em condições alteradas de erupção, podem fornecer informações sobre a relação entre esses parâmetros nos dentes de erupção contínua, e foi o objetivo deste estudo.

2- Revisão da Literatura

O ligamento periodontal (LP) é um tecido conjuntivo que envolve e sustenta o dente no alvéolo. Originado do folículo dentário, contém, em sua matriz extracelular fibras colágenas (colágeno tipo I) como principal componente (Katchburian e Arana, 2004).

Ao longo dos anos, estudos têm atribuído ao LP papel importante no processo de erupção dental. Além da força geradora do movimento, a translação dessa força, a resistência dos tecidos peridentais, a sustentação do dente em cada nova posição e a remodelação dos tecidos periodontais são fatores relevantes para a aceleração, retardo ou mesmo interrupção do movimento eruptivo.

Experimentos de transecção em incisivos de ratos, onde o dente é dividido em duas porções, uma proximal relacionada à região formadora e, uma porção distal ou incisal relacionada à cavidade oral, mostrando que a erupção do segmento incisal do dente continua a acontecer mesmo depois de separado de seu segmento proximal que foi fixado com pino conferiram ao LP, inicialmente, a força eruptiva (Massler & Schour, 1941; Bryer, 1957; Ness, 1957). Na década de 60 surgiram estudos envolvendo o ligamento periodontal no processo eruptivo, atribuindo ao colágeno presente nas fibras oblíquas do LP a força para o movimento eruptivo (Thomas 1964, 1967; Taverne, 1993); e também aos fibroblastos, com características de miofibroblastos, que teriam a capacidade de tracionar o dente (Bellows *et al*, 1981, Kasugai *et al*, 1990).

Estudos em dentes de crescimento limitado, como molares de ratos e cães, sugerem que o desenvolvimento do dente e a remodelação óssea controlada pelo folículo dentário explicariam o movimento eruptivo na fase supra-óssea (Marks e Schroeder, 1996).

Estudos posteriores mostram que o LP não é o único responsável pela erupção, sugerindo natureza multifatorial para o processo eruptivo, incluindo a modulação de moléculas como fatores de crescimento presentes nos tecidos peridentais, de acordo com estudo que mostra que um dano no LP retarda, porém

não impede totalmente a erupção de incisivos de ratos (Michaeli *et al*, 1982); e em estudos utilizando molares irradiados, onde as raízes não se formam (Gowgiel, 1967), ou quando os tecidos que as formam são cirurgicamente removidos (Cahill e Marks, 1980), não havendo, portanto, a formação de LP, mesmo assim as coroas destes dentes erupcionam.

Os incisivos de roedores são dentes de crescimento e erupção contínuos e para tanto apresentam um órgão odontogênico permanente na sua extremidade basal, responsável pela contínua formação dos tecidos dentais e peridentais. Embora inseridos num alvéolo como os dentes de crescimento e erupção limitados, os incisivos de roedores apresentam-se revestidos de cemento e ligamento periodontal somente nas faces mesial, lingual e parte da distal, sendo o restante revestido por um tecido periodontal relacionado ao esmalte. Dois compartimentos são facilmente identificáveis ao microscópio de luz; um compartimento relacionado ao dente e um compartimento relacionado ao osso. Um terceiro compartimento, intermediário entre os dois, seria um local onde ocorre remodelação mais intensa (Beertsen & Everts, 1977).

No incisivo de rato o ligamento periodontal tem função de suporte do dente em seu alvéolo. Durante o processo de mastigação, o ligamento periodontal está exposto a diferentes tipos de forças, funcionando como um suporte dental, fixando o dente no interior de seu alvéolo, e ao mesmo tempo permitindo que o dente erupcione continuamente, oferecendo uma resistência controlada ao movimento eruptivo. Assim os incisivos de ratos tem sido um modelo para estudar o metabolismo do LP.

Estudos envolvendo dentes impedidos e desimpedidos indicam que alterações na erupção podem induzir variações na estrutura básica e/ou biomecânica, e fisiológica do ligamento periodontal (Chiba *et al.*, 1981; Moxhan e Berkovitz, 1981; Komatsu, 1988)

Assim, baseados nesses dados, uma alteração na velocidade de erupção pode ser devido tanto ao aumento ou diminuição da força eruptiva do LP, aumento

ou diminuição da resistência dos tecidos periodontais ou ainda das características de remodelação dos tecidos.

Alterações na função oclusal induzem alterações na taxa de erupção dos dentes de ratos, e se refletem nas propriedades mecânicas do ligamento periodontal, por exemplo, a desoclusão de um incisivo de rato faz com que sua taxa de erupção dobre (Michaeli & Weinreb, 1968). A renovação do colágeno no ligamento periodontal em dentes de rato é extremamente rápida, quando comparada com outros tecidos conjuntivos (Sodek, 1976; Sodek *et al.*, 1977). Bernick, em 1960, sugeriu que o estresse da função oclusal é importante para o desenvolvimento, renovação e espessamento das fibras colágenas periodontais.

Agentes que interferem na síntese de colágeno e alteram a estrutura do LP (latirogênicos e colchicina) marcadamente retardam a erupção do incisivo (Berkovitz *et al.*, 1972; Berkovitz, 1972, Michaeli *et al.*, 1975), assim como a hidrocortisona acelera a erupção (Domm & Wellband, 1960).

Kanoza *et al.*, 1980 mostraram que na condição hipofuncional ocorre um aumento na síntese de colágeno no ligamento periodontal, sugerindo um aumento na remodelação da matriz do ligamento periodontal bem como, uma relação entre esse processo de remodelação e as condições alteradas de erupção.

Em estudos com incisivos de animais em condições alteradas de erupção (hipofunção) foram observadas diferenças no número e no diâmetro das fibras de Sharpey em molares (Short & Johnson, 1990) e em incisivos (Silva & Merzel, 2004); e alterações na forma e tamanho dos incisivos e, na espessura do ligamento periodontal (Komatsu, 1988; Steigman *et al.*, 1989; Ingber, 1989). Estudos com incisivos de animais em hipofunção (desimpedidos), onde a erupção está acelerada, e hiperfunção (impedidos), mostraram que no grupo hipofuncional a força para extrair os dentes é marcadamente reduzida (Chiba *et al.*, 1981; Shimada *et al.*, 2003), sugerindo que o LP oferece menos resistência, que pode ser atribuída a degradação de alguns componentes da matriz extracelular interferindo nas propriedades do LP.

Por outro lado, a matriz extracelular do LP também é composta por proteínas não-colágenas como a fibronectina, tenascina, laminina, e glicosaminoglicanas: heparan sulfato, dermatan sulfato, condroitin sulfato formando as proteoglicanas: versican, decorina, ácido hialurônico (Mariotti, 1993), componentes que podem interferir no metabolismo do LP.

As metaloproteinases (MMPs) são moléculas responsáveis pela remodelação da matriz extracelular, e estão envolvidas na degradação de alguns dos seus componentes (Birkedal-Hansen, 1993; Stamenkovic, 2003). O processo de remodelação mantém o equilíbrio entre as moléculas produzidas e aquelas degradadas pelas MMPs (Sahlberg *et al.*, 1999). Atualmente as MMPs compreendem um grupo de mais de 20 metalopeptidases dependentes de zinco, que são sintetizadas sob a forma de pró-enzimas (pró-MMP), por diferentes tipos celulares presentes nos tecidos conjuntivos, sendo agrupadas em categorias de acordo com a similaridade de seus domínios e afinidade por substratos. Foram identificadas 2 classes de MMPs: as metaloproteinases de matriz (MMPs) e as metaloproteinases de membrana celular (MTs-MMP). Dentre as metaloproteinases de matriz destacamos a MMP-2, também denominada gelatinase A, e a MMP-9, denominada gelatinase B (Sahlberg *et al.*, 1999). Dentre as metaloproteinases de membrana celular destacamos a MT1-MMP ou MMP-14 (Sato *et al.*, 1994).

MMP-2 e -9 são gelatinases que degradam o colágeno do tipo IV, encontrado principalmente nas membranas basais (Sahlberg *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 2003), mas também podem degradar glicoproteínas que compõem a membrana basal. Essa degradação ocorre após a clivagem das fibrilas colágenas por outras MMPs, entre elas MMP-1, -13 e -18 (Sahlberg *et al.*, 1999). Recentes estudos têm demonstrado a capacidade de MMP-2 em degradar fibras colágenas, como mostra estudo de Patterson *et al.*, 2001.

MT1-MMP tem sido considerada a mais importante metaloproteinase da superfície celular, envolvida na digestão da matriz pericelular, e direta ou indiretamente na ativação de MMP-2 (Itoh *et al.*, 2001; Strongin *et al.*, 1995). Atribui-se a ela inúmeras funções como quebra de componentes da matriz extracelular

incluindo colágeno, fibronectina (Ohuchi *et al.*, 1997) e laminina-5 (Koshikawa *et al.*, 2000).

Recentes estudos têm encontrado metaloproteinases em tecidos dentais de animais, como a MMP-2 e MMP-9 (Gomes *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2003; Goldberg *et al.*, 2003), MMP-8 (Takahashi *et al.*, 2003, Salmon, 2008) e MT1-MMP (Caron *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 2003; Salmon, 2008; Gomes *et al.*, 2011; Omar *et al.*, 2011).

MT1-MMP é indispensável para o crescimento e desenvolvimento normal segundo estudo de Holmbeck *et al.* (1999) o qual mostrou que camundongos deficientes em MT1-MMP exibem uma variedade de patologias no tecido conjuntivo. Estudos nestes camundongos mostraram que ocorre um retardo do crescimento da raiz, falha na erupção dental e subdesenvolvimento mandibular, indicando uma importante participação desta enzima no desenvolvimento do dente e na formação do osso alveolar (Beertsen *et al.*, 2002, 2003; Bartlett *et al.*, 2003).

Trabalhos recentes em nosso laboratório enfocaram o papel das moléculas da matriz extracelular em dentes incisivos utilizando o modelo de hiperfunção, hipofunção e contido. Com período experimental de 14 dias, houve diferenças na intensidade de marcação para MT1-MMP no folículo dentário na região odontogênica, sendo observada intensidade forte no grupo hipofuncional e fraca no grupo contido, sugerindo participação na migração celular que ocorre durante o processo de erupção dentária (Gomes *et al.*, 2010; Omar *et al.*, 2011). Salmon, 2008, nas mesmas condições experimentais de erupção em dentes incisivos de ratos durante 7 e 14 dias, mostrou alterações nas moléculas envolvidas no processo de remodelação da matriz extracelular, com redução na expressão de mRNA para colágeno tipo I em todos os grupos e períodos experimentais estudados quando comparados com o grupo normofuncional, aumento na expressão de mRNA para MMP-2 no grupo hipofuncional com 7 dias e para MT1-MMP no mesmo grupo com 14 dias.

Estes resultados indicam que as condições alteradas de erupção modificam a expressão das moléculas envolvidas na remodelação da matriz

extracelular do ligamento periodontal, entretanto, como o ligamento está diretamente relacionado às forças envolvidas no processo de erupção, necessário se faz estabelecer possíveis relações entre a expressão destas moléculas e a resistência do ligamento ao movimento eruptivo.

Por outro lado, a regulação endógena da atividade das MMPs durante a remodelação da matriz extracelular é realizada por moléculas chamadas de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) que são em número de quatro, denominados TIMP-1, -2, -3 e -4. Variações nos níveis de TIMPs são considerados importantes porque afetam diretamente o nível da atividade de MMPs (Visse & Nagase, 2003).

Os TIMPs tem um domínio N- e C- terminal. O domínio N-terminal apresenta-se como uma unidade separada e é capaz de inibir as MMPs. Os TIMPs tem outras funções biológicas: TIMP-1 e -2 tem atividade potencializadora eritróide e atividade promotora do crescimento (mitogênica), enquanto que a super expressão de TIMPs reduz o crescimento de células tumorais. (Nagase & Woessner, 1999; Visse & Nagase, 2003).

O papel dos TIMPs em inibir a atividade das MMPs nos processos de morfogênese ou de remodelação da matriz é evidente. Sabe-se que TIMP-1 inibe a atividade de muitas MMPs com exceção de MT1-MMP e MMP-2, enquanto que TIMP-2 também inibe a atividade de várias MMPs com exceção da MMP-9 (Yoshida *et al.*, 2003). Sabe-se também que TIMP-2 toma parte na ativação de MMP-2 formando um complexo com MT1-MMP (Strongin *et al.*, 1995).

Entretanto, são recentes as descrições da localização e da expressão de MMPs e TIMPs em tecidos dentais, principalmente durante o desenvolvimento de dentes molares e incisivos de ratos, e ainda são escassas as conclusões sobre o papel funcional tanto das MMPs como dos TIMPs com relação a remodelação do ligamento periodontal durante o processo eruptivo.

Yoshida *et al.*, 2003 mostraram TIMP-1 em odontoblastos, TIMP-2 no mesênquima dental e periodontal durante o desenvolvimento de molar de camundongo.

Tsuji *et al.*, 2004 mostraram expressão de mRNA de TIMP-1 e -2 aumentada em cultura de células do ligamento periodontal que foram submetidas à força tensil aplicada intermitente, entretanto a expressão de MMP-1 e -2 não se alteraram. Os autores sugerem que o estresse apropriado pode atuar como inibidor da atividade das metaloproteinases via TIMPs.

Utilizando forças ortodônticas aplicadas em molares de ratos Takahashi *et al.*, 2006, verificaram a expressão dos genes para MMP-2 e -9 e TIMPs e observaram níveis de MMP-2 e -9, TIMP-1 e -2 transitoriamente aumentados nas células do tecido periodontal, e Zhao *et al.*, 2008, verificaram a expressão de TIMP-1 e colágeno tipo I por meio de imunohistoquímica no LP. Observaram que colágeno tipo I e TIMP-1 estavam significativamente aumentados na zona de tensão.

Salmon, 2008 observou aumento de mRNA para TIMP-1 no grupo com 7 e 14 dias de contenção da erupção em incisivos de ratos, bem como, aumento na expressão de mRNA para TIMP-2 no grupo hipofuncional com 14 dias. Gomes *et al.*, 2010 mostraram expressão de TIMP-2 aumentada no folículo dentário de incisivos de ratos submetidos à hipofunção.

Apesar da existência de trabalhos focando a força de resistência do ligamento periodontal em dentes molares, e de forças ortodônticas sobre os componentes da matriz extracelular do ligamento periodontal, até o momento são escassas as informações sobre as relações funcionais entre a expressão de metaloproteinases e seus inibidores com as forças de resistência do ligamento periodontal no dente incisivo de rato, um modelo bastante usado para o estudo do processo eruptivo, uma vez que possui crescimento e erupção contínuos.

Portanto, se faz necessário o aprofundamento nestas questões para se entender melhor essas relações funcionais em um dente de erupção contínua. Uma possibilidade de estabelecer possíveis relações entre a resistência do ligamento periodontal ao movimento eruptivo nos incisivos, em condições alteradas de erupção e os componentes da matriz extracelular do ligamento periodontal é alterar

a condição de erupção do incisivo por hipofunção (aceleração da erupção) ou contenção do processo eruptivo.

Dessa forma, a análise da resistência que o ligamento periodontal oferece ao movimento eruptivo; a organização do colágeno e a expressão de moléculas responsáveis pela remodelação do ligamento periodontal, em condições alteradas de erupção, podem fornecer informações sobre a relação entre força de resistência, o processo de erupção e a remodelação da matriz extracelular do ligamento periodontal em dentes de crescimento contínuo.

Apesar de trabalhos na literatura mostrando que alterações nas condições de erupção têm efeito no ligamento periodontal, como a diminuição da força para extrair o incisivo hipofuncional (Chiba *et al*; 1981), ainda não existem informações se a atividade das MMPs, TIMPs e organização do colágeno estão relacionadas com a resistência que o ligamento periodontal oferece ao movimento eruptivo nos incisivos de rato.

3- Proposição

Pelas considerações mencionadas propõe-se neste trabalho de doutorado, utilizando-se como modelo o dente incisivo de ratos submetidos a 1, 7 e 14 dias de erupção hipofuncional, hiperfuncional, contida e em condição de erupção normal, as seguintes avaliações:

1. Taxa de erupção dos incisivos inferiores;
2. Resistência do ligamento periodontal ao movimento eruptivo por meio da força máxima necessária para fazer a intrusão do dente incisivo de rato em seu alvéolo, rompendo as fibras do LP.
3. Atividade de MMP-2 e -9, bem como quantificar MT1-MMP e TIMP-2 pelos métodos de zimografia e western blot.
4. Determinar a organização do colágeno no ligamento periodontal por meio de microscopia de luz polarizada.
5. Estabelecer possíveis relações entre a resistência do ligamento periodontal, a organização do colágeno e, a atividade e expressão das MMPs e TIMP.

4- Material e Métodos

4.1 Animais

Para este estudo foram utilizados ratos, adultos da linhagem Wistar mantidos em gaiolas no Biotério do Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP, com temperatura variando entre 20 e 25°C e fotoperíodo claro-escuro de 12 horas recebendo água e ração *ad libitum*, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNICAMP sob nº 1544-1.

4.2 Grupos e período experimental

Durante 1, 7 e 14 dias os animais foram submetidos a tratamentos diferentes, segundo os grupos a seguir:

A - Grupo normofuncional: esse é considerado o grupo controle no qual tanto o incisivo esquerdo como direito estão em condições normais de oclusão e erupção (Fig 1A).

B - Grupo hipo e hiperfuncional: após anestesia dos animais com halotano (Cristália, Itapira-SP) os incisivos inferiores esquerdos foram seccionados, a cada dois dias, na altura da papila interdental, com uma broca diamantada montada em alta rotação. Este procedimento mantém o dente esquerdo desocluído e livre de forças mastigatórias, produzindo uma condição hipofuncional, a qual acelera a erupção (Michaeli & Weinreb, 1968). Os incisivos direitos (contralaterais) permanecem em oclusão e com sobrecarga mastigatória por estarem suportando a carga contra os dois antagonistas superiores durante os movimentos da mastigação, portanto em condição hiperfuncional (Michaeli & Weinreb, 1968) (Fig 1B).

C - Grupo contido: os animais deste grupo foram anestesiados com injeção intramuscular de Ketamina (Francotar) na dosagem de 80mg/kg peso corporal associado ao relaxante muscular Cloridrato de Xylasina (Virbraxyl) na dosagem de 8mg/Kg de peso corporal. Após anestesia o incisivo inferior esquerdo recebeu uma contenção realizada com fio de aço nº 0,4. Para isso, foi feito um orifício com uma broca Carbide ¼ (Sorensen, KG, Brasil) na face labial do mesmo

dente; uma das extremidades do fio de aço envolve o primeiro molar inferior esquerdo enquanto a outra extremidade é presa ao orifício, e este preenchido com resina fotopolimerizável (3M, USA). Este procedimento produz uma condição de contenção do processo eruptivo (Neves *et al.*, 2009) (Fig 1C).

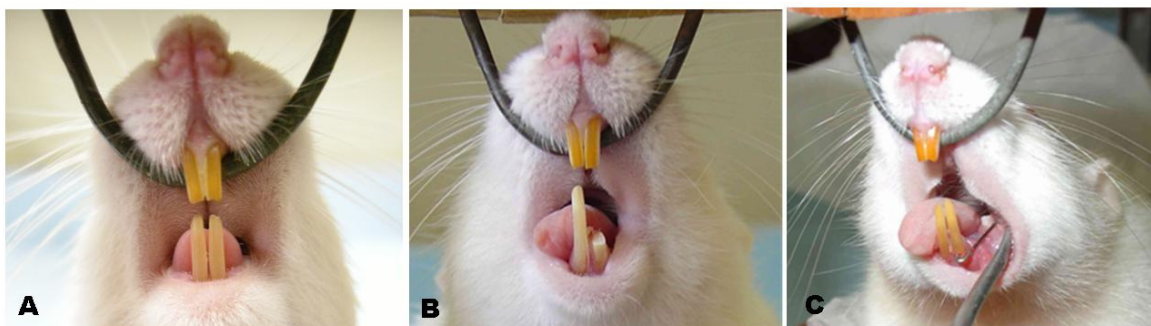


Figura 1 - Incisivos inferiores de ratos. **A** - condição de erupção normal; **B** - Incisivo inferior esquerdo seccionado em hipofunção e contralateral direito em hiperfunção; **C** - Condição de contenção da erupção.

4.3 Estimativa da taxa de erupção

No primeiro dia de experimento os animais (N≈10/grupo e período experimental) foram divididos nos grupos descritos anteriormente, foi iniciada a medição da taxa de erupção. Essa medição foi feita ao longo de todo período experimental, periodicamente, utilizando uma ocular milimetrada (Ernest Leitz wetzlar Germany 12,5x) adaptada à lupa estereoscópica, sendo utilizada para calibração uma régua milimetrada (Carl Zeiss 5+ $^{100}/_{100}$ mm). A medida foi obtida medindo a distância da margem gengival até uma referência que foi feita no dente dos grupos normo e hiperfuncional, como descrito por Merzel *et al.*, 2000, ou até o orifício feito no incisivo no grupo contido, como descrito por Neves *et al.*; 2009, ou até a extremidade do dente cortado no grupo hipofuncional, anestesiando rapidamente os animais com halotano.

As médias obtidas por dia de medição em cada grupo foram comparadas com o grupo normofuncional por teste Anova e Tukey pós teste, com nível de significância $p < 0,05$.

4.4 - Medida da resistência do ligamento periodontal

Após o período experimental de 1, 7 e 14 dias os animais foram sacrificados por deslocamento cervical sob anestesia, as hemimandíbulas foram removidas e imediatamente a força tênsil do ligamento periodontal foi medida por meio de um algômetro (mod. DDK/20 Kratos equipamentos). Neste estudo esse aparelho foi utilizado para medir a máxima carga necessária para realizar a intrusão dos dentes incisivos de ratos em seu alvéolo, o que determina o rompimento das fibras de ancoragem do dente ao osso alveolar e permite sua extração.

Os dados obtidos com o algômetro foram agrupados em média e desvio padrão e estes comparados estatisticamente por meio de análise de variância seguido por Tukey pós teste, com significância se $p < 0,05$.

4.5 - Medida da atividade de MMP-2 e MMP-9

Após a intrusão dos dentes, realizada para medir da resistência do ligamento periodontal, eles foram removidos do alvéolo e tiveram o ligamento periodontal das faces mesial, lingual e parte da distal (Fig 2) raspado com auxílio de uma cureta periodontal, coletado em microtubos contendo meio de cultura DMEN, de modo a produzir 3 amostras de cada grupo e período experimental (*pool* de 3 dentes em cada amostra), e mantido por 16h à 37°C, período após o qual foi realizada a quantificação de proteínas totais por meio do método de Bradford (1976). A eletroforese das amostras foi realizada em gel de poliacrilamida 10% com gelatina 5%, sempre com amostras em duplicata utilizando quantidade de proteína total diferente sendo: 0.1 µg e 0.05µg, com intuito de minimizar erros de pipetagem. Após a eletroforese, os géis foram lavados em Triton X e incubados em tampão de revelação, contendo Tris HCl 10mM e CaCl₂ 5mM, por 16h e, após isso, corados com Comassie Blue. A atividade das MMPs é evidenciada em bandas claras no fundo escuro do gel corado, mostrando degradação da gelatina pela MMP. As imagens das bandas, de amostras contendo 0.1 µg de proteína total, foram capturadas por um fotodocumentador e analisados pelo programa Image J 1.42, para medir, em pixels, a área da banda degradada.

A análise estatística foi feita com a comparação dos dados da medida da área das bandas entre os grupos estudados utilizando teste de Kruskal-Wallis com $p < 0,05$.

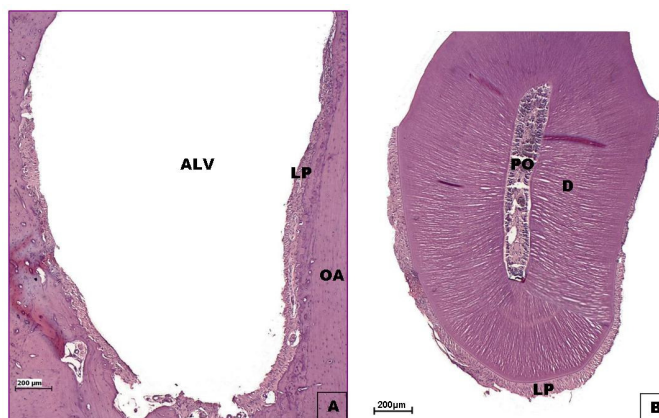


Figura 2 - Cortes histológicos corados com HE, evidenciando o ligamento periodontal após a extração do incisivo. A – Corte transversal da mandíbula de rato mostrando o alvéolo dentário. B – Corte transversal do incisivo extraído. ALV - Alvéolo; LP - ligamento periodontal; OA - osso alveolar; D - dentina; PO - polpa.

4.5.1 Testes de inibição: Após a eletroforese, géis contendo amostras de ligamento periodontal dos grupos estudados foram incubados com inibidores específicos para proteases: 1- fenantrolina, conhecido inibidor de MMPs; 2- NEM (N-ethyl-Maleinide), inibidor de cisteínas e 3- PMSF (Fenilmetilsulfonilflúor), inibidor de serina protease, na concentração de 0,5mM em tampão de revelação para comprovar a natureza das MMPs.

4.6 - Análise da organização do colágeno por meio de microscopia de luz polarizada

Para esta análise foram utilizados 5 animais em cada grupo e período experimental. Ao final do período experimental os animais foram anestesiados e mortos por perfusão intracardíaca utilizando solução fixadora de 4% paraformaldeído, 0,5% glutaraldeído em tampão fosfato 0.1M pH 7.4. As

hemimandíbulas foram dissecadas, armazenadas na mesma solução fixadora a 4°C por, pelo menos, 48 horas.

Após fixação, as hemimandíbulas foram lavadas em tampão PBS (Tampão Fosfato Salino), descalcificadas com EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetraacético) a 10%, pH 7.4, durante 35 dias. Após a descalcificação, um fragmento de cada hemimandíbula correspondente à região do primeiro molar foi removido (Fig 3A), incluído em paraplast e seccionado transversalmente com 15 µm de espessura, para análise da birrefringência das fibras colágenas do LP.

4.6.1 - Os cortes transversais de 15µm de espessura foram desparafinizados, hidratados e analisados em microscopia de luz polarizada. A lâmina contendo os cortes sem coloração foi montada utilizando água como meio de embebição (segundo resultados prévios deste laboratório) e após 30 minutos foi feita a mensuração do retardo ótico que foi determinado em nanômetros (nm). A mensuração do retardo ótico foi realizada 5 vezes em 3 cortes semi seriados de cada animal, compreendendo 6 pontos diferentes do ligamento periodontal: região mesial, distal e lingual adjacente ao osso alveolar e região mesial, distal e lingual adjacente ao dente. (Fig 3B).

Análise da birrefringência das fibras colágenas: A medida do retardo óptico do ligamento periodontal, obtida por meio do compensador de Brace-Köeler sob luz policromática em microscópio Leica DM LP (Leica Microsystems), é o valor relativo entre o maior e o menor brilho de birrefringência no tecido. Sendo assim, é necessário analisar uma área restrita para conferir maior fidelidade à medição. Para o estudo da organização do colágeno no ligamento periodontal as medidas foram feitas em 6 pontos, em cada corte, como será descrito, de modo a abranger o ligamento periodontal como um todo. Os valores obtidos em cada região medida foram reunidos em único valor com intuito de considerar toda a extensão do tecido.

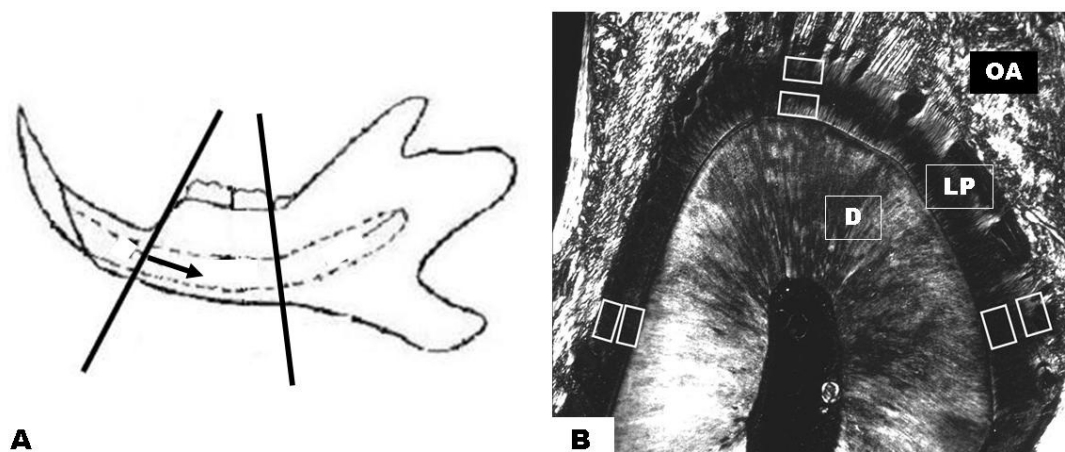


Figura 3 – Mandíbula de rato. **A** – Esquema mostrando o fragmento selecionado para análise de polarização e sentido de obtenção dos cortes (seta). **B** - Corte transversal mostrando áreas do ligamento periodontal selecionadas para análise (retângulos). OA - osso alveolar, LP - ligamento periodontal, D - dentina.

Os resultados foram obtidos comparando-se os valores médios das medidas do retardo óptico nos grupos estudados. Para a determinação de diferenças entre os grupos foi utilizado o teste de variância com Tukey pós test, e os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0.05$.

4.7 - Análise de MT1-MMP e TIMP-2 por western blotting

Para a técnica de western blotting 30 animais em cada grupo e período experimental foram necessários. Com 1, 7 e 14 dias os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tiveram as hemimandíbulas removidas e os incisivos inferiores extraídos. O ligamento periodontal mesial, lingual e parte da distal foi raspado com auxílio de uma cureta periodontal, coletado em microtubos contendo tampão de extração (Tris-HCl 50mM, CaCl_2 5mM, NaCl 0.9% e PMSF 0.1mM, pH 7.5) de modo a produzir 3 amostras de cada grupo e período experimental (*pool* de 10 dentes raspados em cada amostra). As amostras foram homogeneizadas utilizando aparelho Beadbeater (Mini Beadbeater-8/Biospec Products) realizando-se três ciclos de 40 segundos cada, intercalados com 40 segundos mantendo as amostras em gelo. Imediatamente após, as amostras foram levadas para centrifugação refrigerada à 4°C, 13.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado,

retirada uma pequena quantidade de cada amostra para realização da quantificação de proteínas totais por meio do método de Bradford, e as amostras foram mantidas à -70 °C.

Amostras, contendo 20µg de proteína total, foram preparadas com agente redutor β-Mercaptoetanol (10%), aquecidas à 95 °C durante 5 min, aplicadas em gel SDS-Page 12% e submetidas à eletroforese 165V por aproximadamente duas horas. Em seguida, transferidas para membrana de PVDF (polyvinylidene fluoride/ Immobilon-P Millipore) em tampão de transferência contendo 250mM Tris-HCl pH 8.0, 192mM Glicina e 10% metanol. A eficácia da transferência foi verificada através da coloração da membrana com o corante Ponceau S (Sigma Chemical Company, EUA.), seguida de lavagem em tampão TBST (20mM Tris-HCl pH 7,6 contendo 150mM de NaCl e 0,1% de Tween 20) e bloqueio com leite desnatado (Molico/ Nestlé) 5% no mesmo tampão, *overnight*. Na manhã seguinte as membranas foram incubadas com anti-MT1-MMP (Millipore, 1:300) ou anti-β-actina (Sigma, 1:40.000) durante 2 horas ou com anti-TIMP-2 (Abcan, 1:500) durante 3 horas, sob agitação em temperatura ambiente. Foram então realizadas três lavagens de 15 minutos cada com TBST, seguidas de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (anti-IgG de cabra, Sigma) diluído 1:2000, durante 1 hora, sob agitação, em temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas com TBST, conforme descrito anteriormente. As reações foram reveladas através de quimioluminescência, utilizando-se o kit de detecção Millipore (Western Blotting Detection System/ Millipore EUA) seguindo instruções do fabricante, e expostas a filmes radiográficos (Amersham-ECL/ GE Healthcare).

Os filmes sensibilizados na técnica de western blotting foram capturados em scanner Bio-Rad e a densidade das bandas detectadas para MT1-MMP e β-actina foi obtida por meio do programa Molecular Analyst. Os resultados normalizados foram submetidos ao teste Kruskal Wallis, com significância de $p < 0,05$.

5- Resultados

5.1 - Taxa de erupção

A taxa de erupção do incisivo inferior de rato, ao longo dos 14 dias de experimento, em todos os grupos estudados, é apresentada na figura 4. No grupo hipofuncional a taxa de erupção dobrou quando comparado com o grupo normofuncional, enquanto a taxa com valores próximos a zero no grupo contido, mostrou que a contenção impediu a erupção destes dentes. O grupo hiperfuncional mostrou taxa de erupção semelhante ao grupo normofuncional.

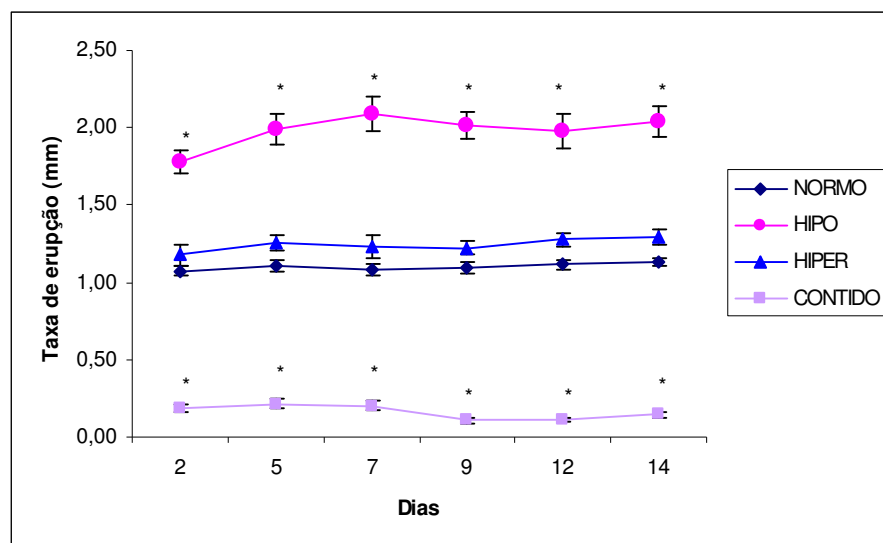


Figura 4 - Taxa de erupção do incisivo inferior de rato nos grupos estudados, medida durante 14 dias de experimento. Análise de variância: * $p < 0,05$ comparação com grupo normofuncional.

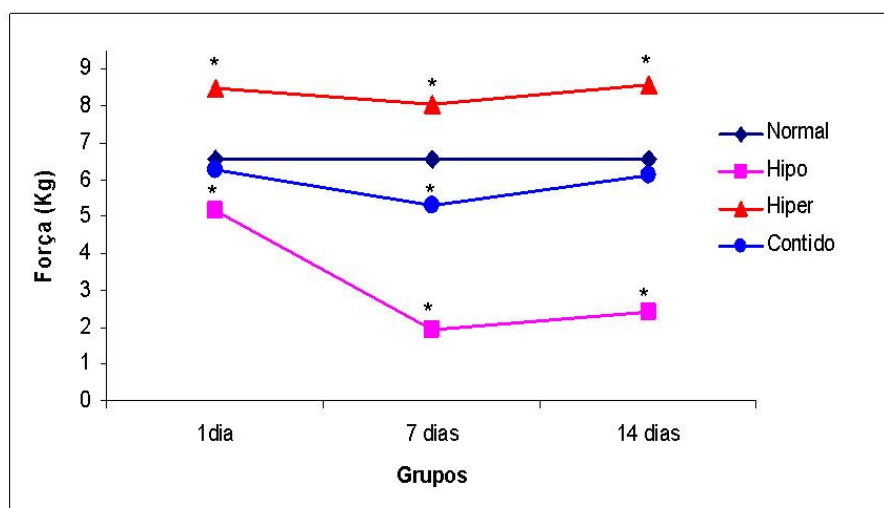
A tabela 1 mostra a média de erupção diária, por grupo estudado, durante os 14 dias de experimento. Por meio desta tabela, e do gráfico (fig 4), é possível observar que houve diferença estatística entre os grupos hipofuncional (sendo o dobro/ $p < 0,05$) e o grupo contido (sendo cerca de 10 vezes menor/ $p < 0,05$) quando comparados com o grupo normofuncional.

Tabela 1 - Média ($\pm$ desvio padrão) da taxa de erupção diária dos dentes incisivos inferiores de ratos submetidos às condições de erupção normo, hiper e hipofuncionais e contido durante 14 dias.

Grupos	Média ($\pm$ desvio padrão) da taxa de erupção diária durante 14 dias
Normofuncional	0,49mm/dia ($\pm$ 0,1)
Hipofuncional	1,03mm/dia ($\pm$ 0,3)*
Hiperfuncional	0,61mm/dia ($\pm$ 0,2)
Contido	0,04mm/dia ($\pm$ 0,02)*

* $p < 0,05$

5.2 - Força de resistência do ligamento periodontal dos incisivos:



Média ($\pm$ desvio padrão) da força de resistência do LP (Kg)			
Grupos	1 dia	7 dias	14 dias
Normofuncional	6,55 ($\pm$ 0,45)	6,55($\pm$ 0,45)	6,55($\pm$ 0,45)
Hipofuncional	5,173($\pm$ 0,32)*a	1,937($\pm$ 0,47)*b	2,417($\pm$ 0,20)*b
Hiperfuncional	8,464($\pm$ 0,46)*	8,066($\pm$ 0,46)*	8,593($\pm$ 0,59)*
Contido	6,274($\pm$ 0,9)	5,31($\pm$ 1,08)*	6,147($\pm$ 0,75)

Figura 5 - Média e desvio padrão da força necessária para realizar a intrusão dos incisivos em cada grupo estudado, segundo o período experimental. Letras minúsculas $p < 0,01$ para comparações intragrupos. * $p < 0,01$ Análise de Variância comparação com grupo normofuncional.

A figura 5 mostra os valores médios da força máxima necessária para realizar a intrusão dos incisivos, refletindo a resistência do ligamento periodontal ao movimento eruptivo, nos grupos estudados.

A força de resistência do ligamento de incisivos do grupo hiperfuncional, em todos os períodos experimentais, foi maior quando comparada com o grupo normofuncional ($p < 0,01$). No grupo hipofuncional, em todos os períodos experimentais a força de resistência foi menor quando comparado com o grupo normofuncional ($p < 0,01$). O grupo contido apresentou força de resistência menor quando comparado com o grupo normofuncional, com diferença estatística aos 7 dias de tratamento ($p < 0,01$). Na comparação intragrupos houve diferença estatística apenas no grupo hipofuncional com 7 e 14 dias quando comparados com 1 dia de desimpedimento.

5.3 - Atividade de MMP-2 e MMP-9

A figura 6 mostra um gel de zimografia obtido para MMP-2 e MMP-9.

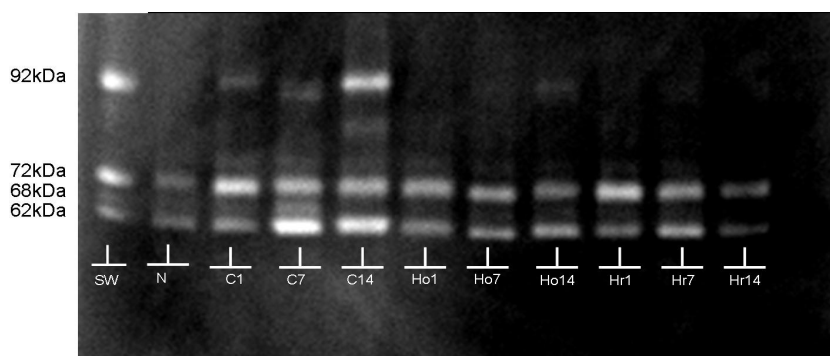


Figura 6 – Gel de zimografia mostrando a atividade de MMP-2 (72, 68 e 62 kDa) e MMP-9 (92kDa). 0,1 μ g de proteína total. Grupos normofuncional - N; contido - C1, C7 e C14; hipofuncional - Ho1, Ho7 e Ho14; hiperfuncional - Hr1, Hr7e Hr14; sw - padrão peso molecular.

Para MMP-2 foi possível observar três formas da proteína no gel de zimografia: 72kDa, forma latente; 68kDa, forma pro; e 62kDa forma ativa.

A análise estatística utilizando Kruskal Wallis, com significância se $p < 0,05$, mostrou o aumento de MMP-2, de modo geral, em todos os grupos e

períodos experimentais estudados quando comparados ao grupo normofuncional, como pode ser observado na figura 7.

Houve diferença significativa para MMP-2 com 1 dia de experimento nos grupos hipofuncional e contido ($p < 0,01$). Aos sete dias houve diferença nos grupos hipo e hiperfuncional ($p < 0,01$). Já aos 14 dias somente o grupo contido mostrou diferença significativa ($p < 0,01$), resultados estes, obtidos sempre quando comparados com o grupo normofuncional. A análise estatística intragrupos não mostrou diferença em nenhum dos grupos estudados.

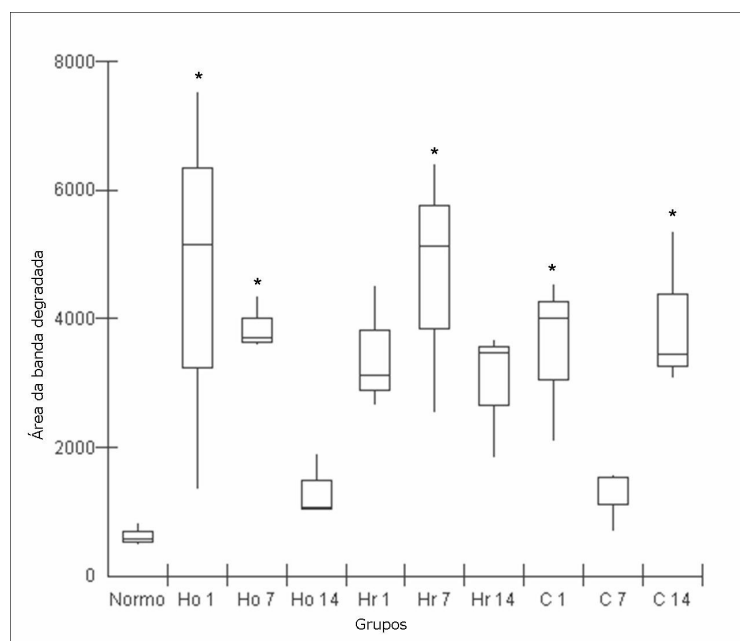


Figura 7 - Mediana e quartis (máximo e mínimo) da área das bandas de MMP-2 dos grupos estudados no ligamento periodontal. Grupos normofuncional - N; hipofuncional - Ho1, Ho7 e Ho14; hiperfuncional - Hr1, Hr7 e Hr14; contido - C1, C7 e C14.* $p < 0,01$ Kruskal-Wallis, comparações com grupo normofuncional. Análise intragrupos não mostrou diferença.

Quando a mesma análise foi feita para as bandas de MMP-9, o programa Image J não detectou bandas na maioria dos grupos e períodos experimentais

estudados, inclusive no grupo normofuncional, dados que podem ser observados na figura 6, onde é possível perceber algumas fracas bandas de MMP-9 na altura de 92kDa irregularmente distribuídas pelo grupo contido, mais evidente aos 14 dias. Sendo assim, não foi possível realizar testes estatísticos das bandas de MMP-9 entre os grupos e períodos experimentais.

5.3.1 - Testes de inibição

A figura 8B mostra que a atividade de MMP-2 e MMP-9 foi inibida pela fenantrolina confirmando a natureza dessas MMPs nas amostras de ligamento.

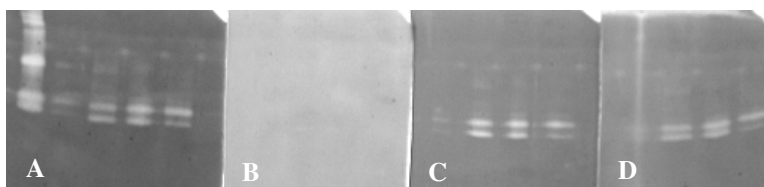


Figura 8 - Teste de inibição para metaloproteinases. Em A - zimografia, B - fenantrolina (inibidor de MMP), C - NEM (inibidor de cisteinase) e D - PMSF (inibidor de serinase protease), 0,5mM. Amostras de normofuncional, hiperfuncional, hipofuncional e contido respectivamente em cada gel; 0,1µg de proteína total.

5.4 - Análise da birrefringência do colágeno

A figura 9 mostra cortes transversais da mandíbula de um animal em condição de erupção normal, obtidos por meio de microscopia de luz polarizada.

Os dados obtidos na análise de birrefringência do colágeno, no ligamento periodontal, foram agrupados de duas formas: a) ligamento periodontal relacionado ao osso e b) ligamento periodontal relacionado ao dente. A análise estatística foi realizada agrupando esses dados representando o ligamento periodontal como um todo.

As médias e desvio padrão dos dados obtidos pela quantificação da medida de birrefringência do colágeno, nos grupos analisados, podem ser observados na figura 10. O grupo hipofuncional apresentou maior desorganização do colágeno nos três períodos experimentais estudados ($p < 0,01$) quando comparados com o normofuncional, e entre 1 e 14 dias na análise intragrupos

($p < 0,01$), sendo a desorganização crescente. Já o grupo hiperfuncional mostrou desorganização do colágeno com diferença significativa apenas no 1º dia experimental ($p < 0,01$) e o grupo contido aos 7 dias de experimento ($p < 0,01$) quando comparados com grupo normofuncional.

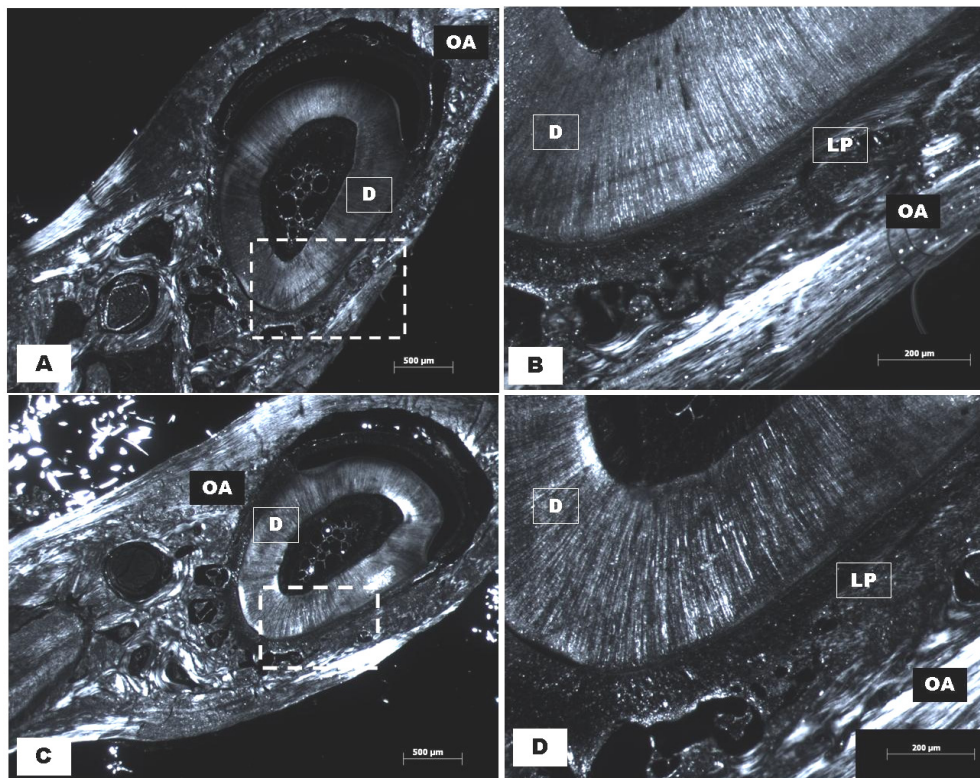


Figura 9 - Cortes transversais da mandíbula de rato em condição de erupção normal obtidos sob luz polarizada. A e C - menor aumento. B e D - detalhe correspondente ao retângulo delimitado em A e C respectivamente. OA - osso alveolar, LP - ligamento periodontal, D - dentina. Barra em A e C, 500µm; em B e D, 200µm.

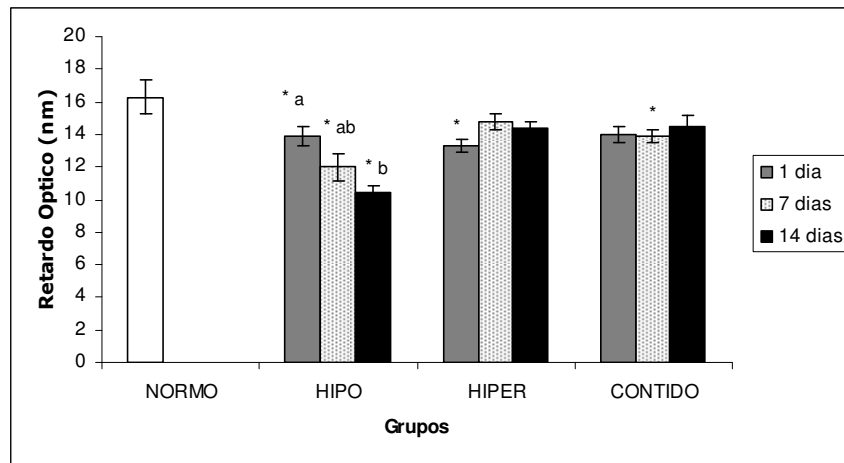


Figura 10 – Médias e desvio padrão do retardo óptico do ligamento periodontal nos grupos estudados. * $p < 0,01$ para comparações entre os tratamentos e o normofuncional. Letras minúsculas $p < 0,01$ para comparações intragrupos. Análise de variância.

5.5 - Análise de MT1-MMP e TIMP-2 por Western Blotting

5.5.1 - MT1-MMP

Bandas na altura de aproximadamente 55KDa, compatível com MT1-MMP, foram detectadas. A figura 11 mostra uma imagem de western blotting para MT1-MMP. De modo geral os níveis de MT1-MMP não se alteraram. Houve uma tendência ao aumento nos grupos hipofuncional 7 dias; hiperfuncional 1 dia e contido com 1, 7 e 14 dias, porém sem diferenças estatísticas significantes como pode ser observado na figura 12.

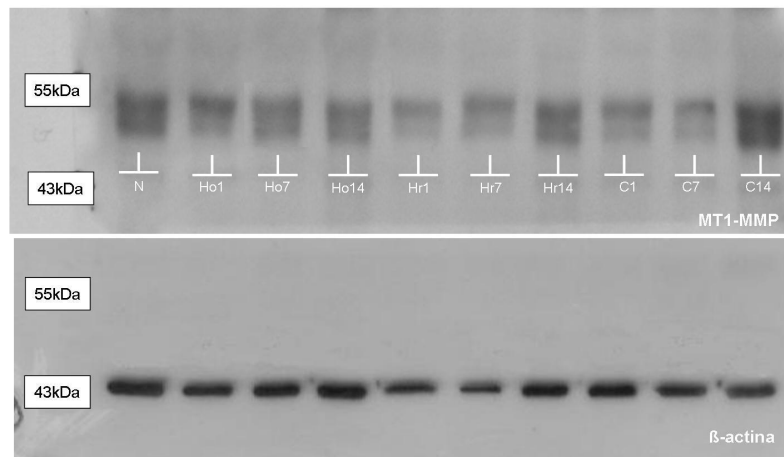


Figura 11 - Western blotting para MT1-MMP (imagem superior) e para β -actina (imagem inferior). 20 μ g proteína total aplicada. Grupos: normofuncional - N; hipofuncional - Ho1, Ho7 e Ho14; hiperfuncional - Hr1, Hr7e Hr14, e contido - C1, C7 e C14.

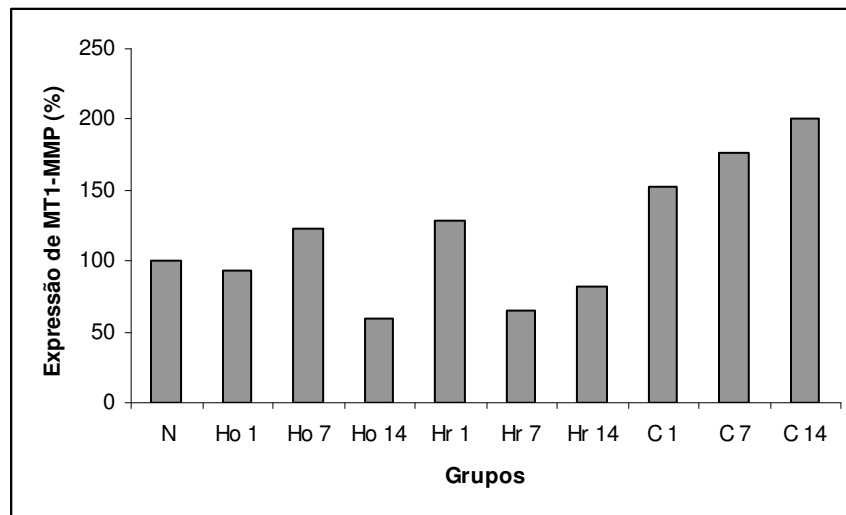


Figura 12 - Análise de porcentagem (3 amostras com *pool* de 10 dentes cada) da densidade das bandas de MT1-MMP dos grupos estudados no ligamento periodontal. Normofuncional - N. Hipofuncional - Ho1, Ho7, Ho14. Hiperfuncional - Hr1, Hr7, Hr 14. Contido - C1, C7, C14.

5.5.2 - TIMP-2

Bandas na altura de $\approx$ 24KDa, compatíveis com TIMP-2 foram identificadas. Na figura 13 pode-se observar western blotting para TIMP-2. A figura 14 mostra os resultados da densidade das bandas de TIMP-2. Não houve diferença

estatística entre os grupos períodos estudados, porém, nota-se pela figura 14 que houve uma tendência à diminuição de TIMP-2 nos grupos estudados.

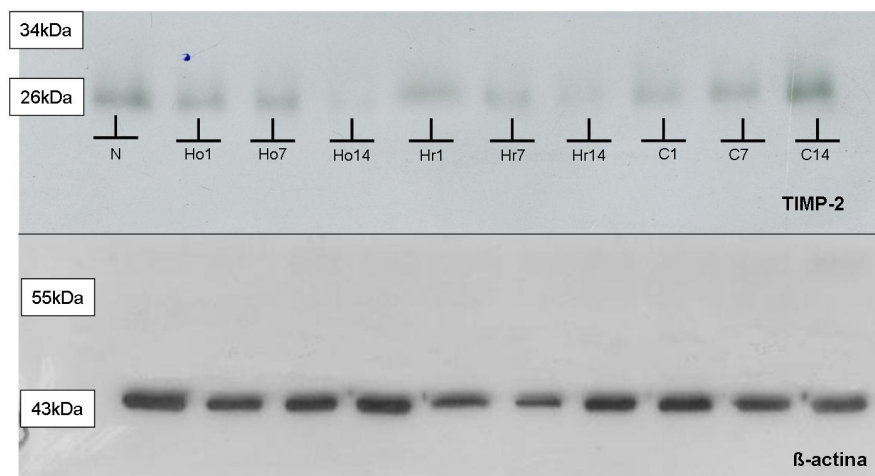


Figura 13 - Western blotting para TIMP-2 nos grupos e períodos estudados. Normofuncional - N. Hipofuncional - Ho1, Ho7, Ho14. Hiperfuncional - Hr1, Hr7, Hr 14. Contido - C1, C7, C14

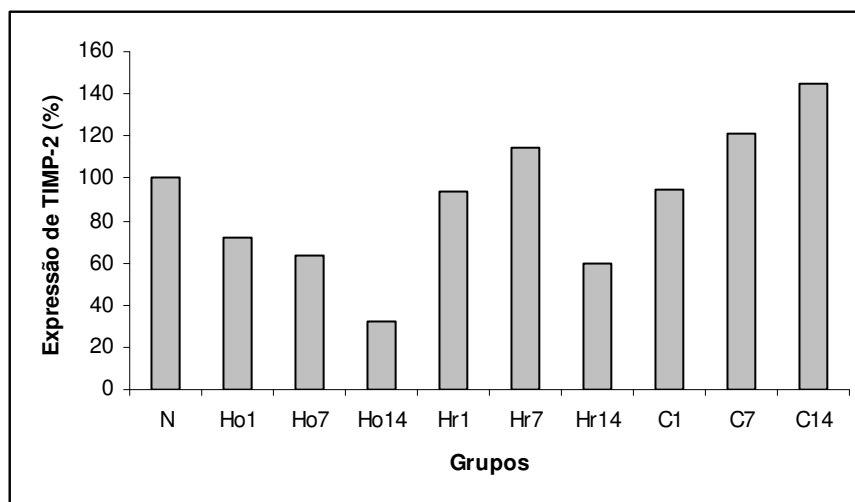


Figura 14 - Análise de porcentagem (3 amostras com *pool* de 10 dentes cada) da densidade das bandas de TIMP-2 dos grupos estudados no ligamento periodontal. Normofuncional - N. Hipofuncional - Ho1, Ho7, Ho14. Hiperfuncional - Hr1, Hr7, Hr 14. Contido - C1, C7, C14.

6- Discussão

Trabalhos na literatura mostram a facilidade para extrair molares e incisivos hipofuncionais, que apresentam erupção acelerada (Kanoza *et al*, 1980; Chiba *et al*, 1981; Tsuruta *et al*, 1982; Kinoshita *et al*, 1982; Komatsu, 1988; Shimada *et al*, 2003). Nosso estudo também mostra esses resultados nos incisivos hipofuncionais cuja taxa de erupção acelerou e que a força de resistência foi bem menor quando comparada com o grupo normal. Diante de tal constatação foi avaliada a possibilidade de alguns fatores estarem envolvidos nessa alteração que ocorre no metabolismo do ligamento periodontal, fazendo com que esse tecido fique menos resistente ao movimento eruptivo permitindo que a erupção acelere e tornando a extração do dente mais fácil.

Dentre os fatores investigados está a organização do colágeno, principal componente das fibras do ligamento periodontal. Estudos mostram que alterações do colágeno presente no LP levam a essa facilidade de extração de dentes hipofuncionais. Em 1975, Vogel já sugeria que o conteúdo de colágeno estaria envolvido na força de resistência do LP. Outros autores sugerem que pode haver uma perda de ancoragem associada a uma rápida remodelação das fibras do ligamento periodontal (Kanoza *et al*, 1980); ou desorganização de fibras colágenas e/ou fraca ligação entre as fibrilas na superfície dental e óssea (Tsuruta *et al*, 1982). Além disso, estudos mostraram que o número de fibras de Sharpey do LP de molares de ratos, em hipofunção, diminuiu (Short & Johnson, 1990) e a densidade dessas fibras em incisivos hipofuncionais aumentou (Silva & Merzel, 2004).

No presente estudo foi investigado o colágeno no LP de incisivos hipofuncionais e mostramos, com microscopia de luz polarizada, que ocorre uma importante desorganização do colágeno neste grupo, e que a desorganização se torna mais intensa quanto maior o tempo de hipofunção. Sendo assim, demonstramos uma relação direta entre organização do colágeno, resistência do LP e taxa de erupção, ou seja, quanto maior a desorganização do colágeno, menor a resistência que o LP oferece ao movimento eruptivo, levando a uma aceleração da taxa de erupção nos dentes hipofuncionais.

Durante o desenvolvimento de um dente, sabe-se que as fibras do LP só se organizam completamente quando o dente entra em contato com seu antagonista, e, sendo assim, a organização das fibras do LP está diretamente relacionada ao contato oclusal e força mastigatória do elemento dentário, para dar suporte ao dente. No incisivo do rato essa organização está localizada próximo à crista alveolar, iniciando se na altura da face mesial do primeiro molar (Sloan, 1981; Silva e Merzel, 2004). É nesta região que o LP exerce efetivamente sua função de fixação e ancoragem no incisivo de rato. Em condição de hipofunção o contato oclusal é perdido, portanto uma desorganização do colágeno das fibras do LP é esperada.

Associado a isso, Kaneko *et al*, 2001, demonstraram diminuição do conteúdo de algumas proteoglicanas, como condroitin sulfato, decorina e heparan sulfato, no LP de molares em hipofunção. Van Den Bos e Tonino (1984) apesar de observarem aumento de proteínas não-colágenas de um modo geral, não

observaram alteração na quantidade de glicosaminoglicanas no ligamento periodontal de incisivos de ratos do grupo hipofuncional.

Esses fatores podem colaborar para uma alteração no metabolismo do LP, diminuindo a resistência que ele oferece ao movimento eruptivo, acelerando a erupção e facilitando a remoção do dente, porém essa hipótese precisa ser investigada, uma vez que não foi o objetivo deste estudo analisar proteínas não-colágenas.

As fibras colágenas na matriz extracelular do ligamento periodontal também estão sujeitas à ação de outras moléculas, que promovem a remodelação constante da matriz extracelular e de seus componentes. Sabe-se que essa remodelação da matriz extracelular do ligamento ocorre por atividade das MMPs. Os TIMPs tomam parte neste processo no que diz respeito à regulação endógena da atividade das MMPs, entretanto, nenhuma relação ainda foi feita entre a expressão de MMPs e TIMPs em condições alteradas de erupção com a força de resistência do ligamento periodontal e organização do colágeno nos incisivos de ratos.

Foi proposto investigar a MMP-2 e MT1-MMP, conhecidas metaloproteinases com papel importante na remodelação da matriz extracelular e, principalmente, na degradação de colágeno (Ohuchi *et al*, 1997; Visse & Nagase, 2003; Sahlberg *et al.*, 1999 e Patterson *et al*, 2001); além de TIMP-2, um inibidor de MT1-MMP (Brew *et al*, 2000; Visse e Nagase, 2003), com papel na ativação de MMP-2 formando um complexo com MT1-MMP (Strongin *et al*, 1995).

A literatura é escassa nos relatos de MMP-2 no LP normal, mas em geral ela é descrita em periodontites (Achong *et al.*, 2003; Corotti *et al.*, 2009; Lorencini *et al.*, 2009). Nossos resultados mostraram a presença de MMP-2 no LP dos grupos estudados, mostrando aumento da atividade de MMP-2 nos grupos hipofuncionais. Essa demonstração, associada aos nossos resultados já descritos referentes à diminuição da força de resistência do LP e aumento da taxa de erupção, mostra relação direta entre aumento da atividade de MMP-2 associada à desorganização do colágeno que ocorre nos grupos hipofuncionais.

MT1-MMP e TIMP-2, neste estudo foram avaliadas por meio de análise de western blotting, porém não mostraram diferenças estatísticas no LP nos grupos estudados, dados que corroboram com estudos prévios do nosso laboratório utilizando RT-PCR (Salmon, 2008), mostrando que não houve alteração na expressão dos genes que codificam tais proteínas, nem alteração da expressão da proteína no LP, nas condições estudadas. Apesar da demonstração do papel de MT1-MMP no folículo dentário durante o processo inicial de erupção dental e papel indispensável na formação da raiz (Beertsen *et al.*, 2002, 2003; Bartlet *et al.*, 2003). No LP parece que essa molécula exerce papel secundário. TIMP-2 também foi descrita no folículo dentário durante o processo de erupção (Yoshida *et al.*, 2003, 2006; Goldberg *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2010); porém, nas condições deste estudo, não houve alteração no LP, sugerindo assim que TIMP-2 pode estar exercendo um papel secundário neste tecido.

Por outro lado, MT1-MMP, TIMP-2 e MMP-2 estão diretamente relacionadas quando se trata da ativação de MMP-2 (Strongin *et al.*, 1995, Itoh *et al.*,

2001). Enquanto neste estudo houve aumento de MMP-2 no LP dos grupos hipofuncionais, a MT1-MMP e TIMP-2 não sofreram alterações significativas. Sabe-se que TIMP-2 modula a ativação de pró-MMP-2 por meio da inibição de MT1-MMP. A proporção de MT1-MMP e TIMP-2 parece ser de 2:1 ou 3:1, mostrando que TIMP-2 e MT1-MMP formam um complexo que se ligam a pro-MMP-2, e uma MT1-MMP, livre de TIMP-2, ativa essa pró-MMP-2 (Butler *et al*, 1998).

Porém, também foi demonstrado que a ativação de pró-MMP-2 é evidenciada na presença de pequena quantidade de TIMP-2 (Strongin *et al* 1995) e que, o excesso de TIMP-2 inibe a ativação da pró-MMP-2 (Butler *et al*, 1998). Nós não observamos alterações na expressão de TIMP-2 ou de MT1-MMP proporcionalmente ao aumento de MMP-2, o que seria esperado diante do exposto sobre o papel dessas moléculas na ativação de pró-MMP-2. No entanto, estudos mostram que outras MTs-MMP também tem papel na ativação de pró-MMP-2 (Butler *et al*, 1997; Takino *et al*, 1995), além de sua ativação pelo sistema uPA/plasmina na superfície celular, onde a plasmina solúvel toma parte na ativação (Mazzieri *et al*, 1997). Tais dados podem mostrar que a ativação de MMP-2, nas condições estudadas, pode ter ocorrido por outras vias.

No grupo hiperfuncional, este estudo mostrou aumento da força necessária para extrair os incisivos de ratos, resultados similares aos apresentados por Shimada *et al*, (2003); Komatsu, (1988), sem alteração na taxa de erupção; e por Moxhan & Berkovitz (1981) em incisivos de coelhos. Também a atividade de MMP-2 não apresentou alterações significativas na organização do colágeno no LP. Na condição de hiperfunção, possivelmente mais colágeno seja produzido pelos

fibroblastos como resposta para melhorar a fixação e ancoragem do dente, portanto para compensar esse aumento na síntese há necessidade de maior degradação pela MMP-2, levando a um equilíbrio entre a síntese e degradação do colágeno no LP, nesta condição de erupção.

Por outro lado, Silva e Merzel, (2004) demonstraram que há um pequeno aumento na densidade das fibras de Sharpey em hiperfunção, o que pode contribuir para o aumento da ancoragem do dente, tornando-o mais resistente no interior do alvéolo.

Outros componentes presentes no LP são as proteínas não-colágenas, que estão relacionadas com aumento de estresse ou função em determinados tecidos, como por exemplo, aumento de condroitin sulfato em tendão bovino submetido a forças de tensão e compressão (Koob & Vogel, 1987), e próximo a superfície do osso alveolar, que corresponde à face submetida a força de compressão durante a erupção de molares (Kagayama, 1996). Também como exemplo, o aumento da síntese de decorina em cultura de cartilagens de bezerros submetidas a uma carga (Visser *et al*, 1994).

Sendo assim, pode haver um aumento do conteúdo das proteínas não-colágenas, glicosaminoglicanas e proteoglicanas no LP hiperfuncional, interferindo na sua força de resistência. Por exemplo, a decorina pode se ligar a regiões específicas de fibrilas colágenas, funcionando como um regulador da formação de fibrilas colágenas. (Weber *et al*, 1996). Outra glicoproteína importante é a fibronectina que tem diversas funções biológicas: adesão celular, migração celular, organização da matriz extracelular, cicatrização (Mariotti, 1993) demonstrada, por

imunohistoquímica, com ampla distribuição no LP (Luckinmaa, *et al*, 1991) e na interface de célula-fibra colágena (Connor *et al*, 1984), podendo atuar na fixação e ancoragem entre as células e fibras do LP, tornando-o mais resistente quando submetido à força mastigatória.

Outra hipótese é o aumento da remodelação que pode estar ocorrendo no LP hiperfuncional, para se adaptar a nova necessidade de resistência a que está submetido, gerando maior quantidade de novas fibrilas colágenas, que podem estar bem aderidas ao osso e ao dente, oferecendo maior resistência. Portanto, um estudo associando o conteúdo de glicosaminoglicanas e colágeno em dentes hiperfuncionais pode elucidar dúvidas sobre o metabolismo deste tecido, explicando a maior resistência do LP nestas condições.

Nos dentes incisivos submetidos à contenção, a força de resistência do ligamento periodontal foi significativamente menor, associada à desorganização do colágeno, com 7 dias de experimento, quando comparadas com o grupo normofuncional, com aumento da atividade de MMP-2, embora sem diferença significativa aos 7 dias de experimento.

Devido ao desgaste incisal durante os movimentos mastigatórios, e falta de erupção, devido à contenção, no 7º dia experimental os incisivos ficam fora de oclusão, diminuindo as cargas mastigatórias, levando assim, às alterações no LP que são semelhantes a um dente que está em hipofunção. Nestas condições, possivelmente o LP esteja sendo pouco requisitado nas suas funções de suporte e ancoragem, levando ao aumento da degradação de seus componentes, como por exemplo, o colágeno, observada neste grupo de forma mais evidente aos sete dias

de experimento. Como um exemplo semelhante a essa situação fisiológica podemos citar a degradação enzimática do colágeno que ocorre no miométrio após o parto (Junqueira & Carneiro, 2011).

A instalação da contenção, inicialmente só provocou alterações na atividade de MMP-2, com o passar do período experimental outros parâmetros foram alterados, como a força de resistência e desorganização do colágeno com 7 dias. Com 14 dias, no final do experimento, pode haver uma tendência deste tecido a se adaptar à nova condição, visto que a organização do colágeno e a força de resistência têm valores mais próximos ao normal.

Por outro lado, o grupo contido foi o único que expressou atividade de MMP-9, embora em níveis baixos. Estudos prévios deste laboratório mostraram que MMP-9 está associada somente aos nervos na região odontogênica de incisivos de ratos (Gomes *et al*, 2011), o que pode explicar o fato de não termos detectado esta molécula nos outros grupos estudados. Porém, MMP-9 está mais expressa em periodontos inflamados (Lorencine *et al*, 2009). Dessa forma, como detectamos MMP-9 somente no LP de incisivos contidos, pode-se levantar a hipótese de que o trauma da instalação da contenção pode ter causado um estado inflamatório no LP dos incisivos deste grupo.

Pelos resultados apresentados neste estudo podemos concluir que MMP-2 apresenta papel importante na modulação da remodelação do ligamento periodontal, agindo diretamente sobre a degradação do colágeno, o que leva à uma diminuição na resistência deste tecido ao movimento eruptivo, em diferentes condições de erupção, principalmente em hipofunção, no incisivo de rato.

Consequentemente, essas alterações podem regular a velocidade da erupção nestes dentes com erupção contínua; e que MT1-MMP e TIMP-2 podem ter participação secundária neste processo, necessitando, ainda, estudos para esclarecer qual é esta participação.

7- Conclusão

- A condição de hipofunção acelerou a taxa de erupção, e a instalação da contenção interrompeu a erupção dos incisivos inferiores de rato.
- Houve uma desorganização do colágeno do LP de incisivos de ratos, em todos os grupos e períodos estudados comparados com o grupo normofuncional, nas condições deste estudo.
- A atividade de MMP-2, no LP de incisivos de ratos, aumentou em todos os grupos e períodos experimentais deste estudo comparados com grupo normofuncional.

MMP-2 exerce papel importante no processo eruptivo em incisivos de rato, regulando a resistência do ligamento periodontal ao movimento eruptivo, por meio do equilíbrio entre síntese e degradação de colágeno.

Referências*

Achong R, Nishimura I, Ramachandran H. Howel TH, Fiorellini JP, Karimbux NK. Membrane type (MT) 1 – matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 expression in ligature-induced periodontitis in the rat. J Periodontol. 2003; 74 (4): 494-500.

Bartlett JD, Zhou Z, Skobe Z, Dobeck JM, Tryggvason K. Delayed tooth eruption in membrane type-1 matrix metalloproteinase deficient mice. Connect Tiss Res. 2003; 44 suppl 1: 300-304.

Beertsen W, Holmbeck K, Niehof A, Bianco P, Chrysovergis K, Birkedal-Hansen H, Everts V. On the role of MT1-MMP, a matrix metalloproteinase essential to collagen remodeling, in murine molar eruption and root growth. Eur Oral Sci. 2002; 110: 445-51.

Beertsen W, Holmbeck K, Niehof A, Bianco P, Chrysovergis K, Birkedal-Hansen H, Everts V. Inhibition of molar eruption and root elongation in MT1-MMP-deficient mice. Connect Tiss Res. 2003; 44 Suppl. 1: 298-99.

Beertsen w & Everts V. The site of remodeling collagen in the periodontal ligament of the mouse incisor. Anat Rec. 1977; 189:479-498.

Bellows CG, Melcher AH, Aubin JE. Contraction and organization of collagen gels by cells cultured from periodontal ligament, gingiva and bone suggest functional differences between cell types. J Cell Sci. 1981; 50:299-314.

Bernick S. The organization of the periodontal membrane fibres of the developing molars of rats. Arch Oral Biol. 1960; 2: 57-63.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Berkovitz BKB. The effect of demecolcine and of triethanolmelanine on the unimpeded eruption rate of normal and root ressected incisor teeth in rats. Arch Oral Biol. 1972; 17: 934-947.

Berkovitz BKB, Migdalski A, Solomon M. The effect of the lathyric agent amino-acetonitrilo on the unimpided eruption rate in normal and root ressected rat lower incisors. Arch Oral Biol. 1972; 17:1755-1763.

Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflamatory mediators in tissue destruction. J Peridont Res. 1993; 28:500-10.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72:248-54.

Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. Biochim Biophys Acta. 2000; 1477(1-2):267-283.

Bryer L W. An experimental evaluation of physiology of tooth eruption. Int Dent J. 1957; 7:432-478.

Butler GS, Will H, Atkinson SJ, Murphy G. Membrane-type-2 matrix metalloproteinase can initiate the processing of progelatinase A and is regulated by the tissue inhibitors of metalloproteinases. Eur J Biochem. 1997; 244(2):653-7.

Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ, Will H, Tamura T, Schade van Westrum S *et al.* The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. J Biol Chem. 1998; 273(2):871-880.

Caron C, Xue J, Bartlett JD. Expression and localization of membrane type 1 matrix metalloproteinase in tooth tissues. *Matrix Biol.* 1998; 17: 501-511.

Cahill DR & Marks SCJr. Tooth eruption:evidence for the central role of the dental follicle. *J Orla Pathol.* 1980; 9(4):189-200.

Chiba M, Ohshima S, Kuroda T, Ohkawa S. Effects of repeated shortenings and of artificial restraint on the tensile strength of the periodontium of the rat mandibular incisor. *Arch Oral Biol.* 1981; 26:135-141.

Connor NS, Aubin JE, Melcher AH. The distribution of fibronectin in rat tooth and periodontal tissues: an immunofluorescence study using a monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem.* 1984; 32:565-572.

Corotti MV, Zambuzzi WF, Paiva KB, Menezes R, Pinto LC, Lara VS, Granjeiro JM. Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development. *Arch Oral Biol.* 2009; 54 (8):764-71

Domm LV, Wellband WA. Effect of adrenalectomy and cortisone on eruption rate of incisors in young female albino rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1960; 104:582-584.

Goldberg M, Septier D, Bourd K, Hall R, Georg A, Goldberg H, Menashi S. Immunohistochemical localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in the forming rat incisor. *Connect Tiss Res.* 2003; 44: 143-153.

Gomes JR, Omar NF, Neves JS, Narvaes EA, Novaes PD. Increase of MT1-MMP, TIMP-2 and Ki-67 proteins in the odontogenic region of the rat incisor post shortening procedure. *J Mol Histol.* 2010; 41(6): 333-41

Gomes JR, Omar NF, Neves JS, Narvaes EA, Novaes PD. Immunolocalization and activity of the MMP-9 and MMP-2 in odontogenic region of the rat incisor tooth after post shortening procedure. *J Mol Histol.* 2011; 42:153-159.

Gowgiel JM. Observations on the phenomena of tooth eruption. *J Dent Res.* 1967; 46:1325-1330.

Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA *et al.* MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell.* 1999; 99:81-92.

Ingber JS. Forced eruption: alterations of soft tissue cosmetic deformities. *Int J Perio Res Dent.* 1989; 9:416-425.

Itoh Y, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N *et al.* Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J.* 2001; 20(17): 4782-93.

Junqueira LC & Carneiro J. *Histologia Básica.* 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.

Kagayama M, Sasano Y, Mizoguchi I, Kano N, Takahashi I, Mitani H. Localization of glycosaminoglycans in periodontal ligament during physiological and experimental tooth movement. *J Periodont Res.* 1996; 31: 229-234.

Kaneko S, Ohashi K, Soma K, Yanagishita M. Occlusal hypofunction causes changes of proteoglycan content in the rat periodontal ligament. *J Periodont Res.* 2001; 36:9-17

Kanoza RJJ, Kelleher L, Sodek J, Melcher AH. A biochemical analysis of the effect of hypofunction on collagen metabolism in the rat molar periodontal ligament. *Archs Oral Biol.* 1980; 25:663-668.

Kasugai S, Suzuki S, Shibata S, Yasui S, Amano H, Ogura H. Measurements of the isometric contractile forces generated by dog periodontal ligament fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol.* 1990; 35(8):597-601.

Katchburian E & Arana V. *Histologia e embriologia oral.* 2. ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2004.

Kinoshita Y, Tonooka K, Chiba M. The effect of hypofunction on the mechanical properties of the periodontium in the rat mandibular first molar. *Archs Oral Biol.* 1982; 27:881-885.

Komatsu K. In vitro mechanics of the periodontal ligament in impeded and unimpeded rat mandibular incisors. *Archs Oral Biol.* 1988; 33(11):783-91.

Koob TJ, Vogel KG. Proteoglycan synthesis in organ cultures from regions of bovine tendon subjected to different mechanical forces. *Biochem J.* 1987; 246:589-598.

Koshikawa N, Giannelli G, Cirulli V, Miyazaki K, Quaranta V. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J Cell Biol.* 2000; 148(3): 615-24.

Lorencini M, Silva JA, De la Hoz CL, Carvalho HF, Stach-Machado DR. Changes in MMPs and inflammatory cells in experimental gingivitis. *Histol Histopathol.* 2009; 24 (2): 157-66.

Luckinmaa LP, Mackie EJ, Thesleff I. Immunohistochemical localization of the matrix glycoprotein tenascin and the ED-sequence-containing form of cellular fibronectin in the human permanent teeth and periodontal ligament. *J Dent Res.* 1991; 70:19-26

Mariotti A. The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissues. *Periodontol.* 1993; 3:39-63.

Marks SC, Schroeder HE. Tooth eruption: theories and facts. *Anat Rec.* 1996; 245:374-393.

Massler M & Schour I. studies on tooth development. Theories of tooth eruption. *Am J Orthod.* 1941; 27:552-576.

Mazzieri R, Masiero L, Zanetta L, Monea S, Onisto M, Garbisa S, Mignatti P. Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *EMBO J.* 1997; 16(9):2319-32.

Merzel J, Novaes PD, Furlan S. A histological study of root-resected and root-transected rat incisors when eruption ceases, shortly before they are exfoliated from the socket. *Arch Oral Biol.* 2000; 45(4): 315-322.

Michaeli Y & Weinreb M. Role of attrition and occlusal contact in the physiology of the rat incisor. III: Prevention of attrition and occlusal contact in the nonarticulating incisor. *J Dent Res.* 1968; 47: 633-640.

Michaeli Y, Pitaru S, Zajicek G. Localized damage to the periodontal ligament and its effect on the eruptive process of the rat incisor. *J Periodontol Res.* 1982; 17: 300-308.

Michaeli Y, Pitaru S, Zajicek G, Weinreb MM. Role of attrition and occlusal contact in the physiology of the rat incisor. IX. Impeded and unimpeded eruption in lathyrotic animals. J Dent Res. 1975; 54: 891-896.

Michaeli Y, Steigman S, Yitschaky M, Weinreb M. The response of the fibroblast population in the periodontal ligament of the rat incisors to altered eruption rates. J Periodontal Res. 1986; 21(1): 86-94.

Moxhan BJ & Berkovitz BKB. A quantitative assessment of the effects of axially directed extrusive loads on displacement of the impeded and unimpeded rabbit mandibular incisor. Arch Oral Biol. 1981; 26:209-215.

Nagase H & Woessner JR Jr. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 1999; 274: 21491-94.

Ness A R. Experiment on the role of periodontal tissues in the eruption of the rabbit mandibular incisor. J Dent Res. 1957; 36:810.

Neves JS, Salmon CR, Omar NF, Narvaes EA, Gomes JR, Novaes PD. Immunolocalization of CSF-1, RANKL and OPG in the enamel-related periodontium of the rat incisor and their implications for alveolar bone remodeling. Arch Oral Biol. 2009; 54(7): 651-7.

Ohuchi E, Imai K, Fuji Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. J Biol Chem. 1997; 272(4): 2446-2451.

Omar NF; Gomes JR, Neves JS, Salmon CR, Novaes PD. MT1-MMP expression in the odontogenic region of rat incisors undergoing interrupted eruption. J Mol Histol. 2011; 42(6): 505-511.

Patterson ML, Atkinson SJ, Knäuper V, Murphy G. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. FEBS Lett. 2001; 503(2-3): 158-162.

Sahlberg C, Reponen P, Tryggvason K, Thesleff I. Timp-1, -2 and -3 show coexpression with gelatinases A and B during mouse tooth morphogenesis. Eur J Oral Sci. 1999; 107: 121-30.

Salmon CR. Expressão de colágeno tipo I, MMP-2, MMP-8, MMP-14 e TIMPs no ligamento periodontal de incisivos de ratos em condições funcionais normal e alterada. [Tese]. Piracicaba: UNICAMP/ FOP; 2008.

Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E *et al.* A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. Nature. 1994; 370(6484): 61-65.

Shimada A, Shibata T, Komatsu K, Chiba M. The effects of intrusive loading on axial movements of impeded and unimpeded rat incisor: estimation of eruptive force. Arch Oral Biol. 2003; 48:345-351.

Short E & Johnson RB. The effects of tooth eruption on adjacent alveolar bone and Sharpey's fibers of the rat periodontium. Anat Rec. 1990; 227:391-96.

Silva MAJ & Merzel J. Alveolar bone Sharpey fibers of the rat incisor in normal and altered functional conditions examined by scanning electron microscopy. Anat Rec. 2004; 279: 792-97.

Sloan P. Some comparative observations on the distribution and form of alveolar sharpey fibers in rat, rabbit, macaque and man. J Dent Res 1981; 60:213.

Sodek J. A new approach to assessing collagen turnover by using a microassay. A highly efficient and rapid turnover of collagen in rat periodontal tissues. *Biochem J.* 1976; 160: 243-246.

Sodek J, Brunette DM, Feng J, Heersche JNM, Limeback HF, Melcher AH, Ng B. Collagen synthesis is a major component of protein synthesis in the periodontal ligament. *Archs Oral Biol.* 1977; 22: 647-653.

Stamenkovic I. Extracellular matrix remodeling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol.* 2003; 200: 448-464.

Steigman S, Michaeli Y, Yitzhaki M, Weinreb M. A three-dimensional evaluation of the effects of functional occlusal forces on the morphology of dental and periodontal tissues of the rat incisor. *J Dent Res.* 1989; 68: 1269-1274.

Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GL. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem.* 1995; 270(10): 5331-5338.

Takino T, Sato H, Shinagawa A, Seiki M. Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMPs form a unique membrane-type subclass in the MMP family. *J Biol Chem.* 1995; 270(39):23013-23020.

Taverne AA. Collagen responsible for tooth eruption? A study of the eruption of rat incisors. *Aust Orthod J.* 1993; 12(4):199-206.

Takahashi I, Nishimura M, Onodera K, Bae JW, Mitani H, Okazaki M *et al.* Expression of MMP-8 and MMP-13 genes in the periodontal ligament during tooth movement in rats. *J Dent Res.* 2003; 82: 646-51.

Takahashi I, Onodera K, Nishimura M, Mitnai H, Sasano Y, Mitani H. Expression of genes for gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontal tissues during orthodontic tooth movement. *J Mol Hist.* 2006; 37:333-342.

Thomas N R. The role of collagen maturation in alveolar bone growth and tooth eruption. *J Dent Res.* 1964; 43:497.

Thomas N R. The properties of collagen in the periodontium of an erupting tooth. In: *The mechanism of tooth support. A Symposium.* 1967; 102-106.

Tsuji K, Uno K, Zhang GX, Tamura M. Periodontal ligament cells under intermittent tensile stress regulate mRNA expression of osteoprotegerin and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and -2. *J Bone Miner Metab.* 2004; 22:94-103.

Tsuruta M, Ohkawa S, Nakatani Y, Kuwahara Y, Chiba M. effect of experimental tooth movement on the mechanical strength of the periodontium in the rat mandibular first molar. *Archs Oral Biol.* 1982; 27: 875-879.

Van den Bos T & Tonino GJM. Composition and metabolism of the extracellular matrix in the periodontal ligament of impeded and unimpeded rat incisors. *Archs Oral Biol.* 1984; 29:893-97.

Visse R & Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Cir Res.* 2003; 92: 827-839.

Visser NA, Vankampen GP, Dekoning MH, Vanderkorst JK. Mechanical loading affects the synthesis of decorin and biglycan in intact immature articular cartilage in vitro. *Int J Tissue React.* 1994; 16:195-203

Vogel HG. Collagen and mechanical strength in various organs of rats treated with D-penicillamine or amino-acetonitrile. *Connect Tissue Res.* 1975;3(4):237-44

Vogel HG. Correlation between tensile strength and collagen content in rat skin. Effect of age and cortisol treatment. *Connect Tissue Res.* 1974; 2: 177-182.

Weber IT, arrison RW, lozzo RV. Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis. *J Biol Chem.* 1996; 271:31767-31770.

Yoshida N, Yoshida K, Stoetzel C, Perrin-Schmitt F, Cam Y, Ruch JV *et al.* Temporal gene expression and protein localization of matrix metalloproteinase and their inhibitors during mouse molar tooth development. *Dev Dyn.* 2003; 288: 105-123.

Yoshida N, Yoshida K, Stoetzel C, Perrin-Schmitt F, Cam Y, Ruch JV *et al.* Differential regulation of TIMP-1, -2, and -3 mRNA and protein expressions during mouse incisor development. *Cell Tissue Res.* 2006; 324:97-104.

Zhao Z, Fan Y, Bai D, Wang J, Li Y. The adaptive response of periodontal ligament to orthodontic force loading- A combined biomechanical and biological study. *J Clin Biomech.* 2008; 23 Suppl 1:S59-66.

Anexo


UNICAMP
CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

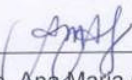
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1544-1, sobre "Relação das MMPs, TIMPs e organizações do colágeno com a força de resistência do ligamento periodontal ao movimento eruptivo de incisivos de ratos", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes / Nádia Fayeze Omar, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 04 de julho de 2008.

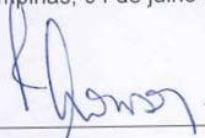
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1544-1, entitled "Relation of MMPs, TIMPs and collagen organization with eruption movement periodontal ligament resistance in lower incisor rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on July 4, 2008.

Campinas, 04 de julho de 2008.



Profa. Dra. Ana Maria Garaldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>