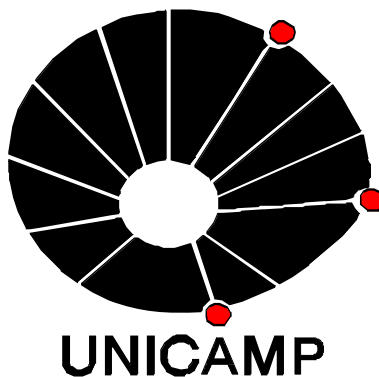


Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

BRUNO BRAGA BENATTI

Cirurgião-Dentista



INFLUÊNCIA DO FATOR IDADE NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA DE CÉLULAS DO LIGAMENTO
PERIODONTAL INDUZIDA PELO FATOR DE CRESCIMENTO BÁSICO DE FIBROBLASTOS
(bFGF).

**Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do grau de doutor em Clínica
Odontológica, Área de Periodontia.**

Orientador: Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior

Piracicaba

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª / 6159

B431i	Benatti, Bruno Braga. Influência do fator idade na modulação da resposta de células do ligamento periodontal induzida pelo fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF). / Bruno Braga Benatti. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007. Orientador: Francisco Humberto Nociti Júnior. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Envelhecimento. 2. Periodonto. I. Nociti Júnior, Francisco Humberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)
-------	---

Título em inglês: The influence of aging on the modulation of periodontal ligament cells response induced by basic fibroblast growth factor (bFGF).

Palavras-chave em inglês (*Keywords*): 1. Aging; 2. Periodontium

Área de concentração: Periodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca examinadora: Francisco Humberto Nociti Júnior; Giuseppe Alexandre Romitto; Poliana Mendes Duarte; Reginaldo Bruno Gonçalves; Karina Gonzáles Silvério Ruiz

Data da defesa: 27/06/2007

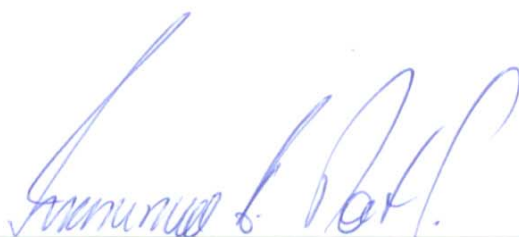
Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



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 27 de Junho de 2007, considerou o candidato BRUNO BRAGA BENATTI aprovado.



PROF. DR. FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JÚNIOR



PROF. DR. GIUSEPPE ALEXANDRE ROMITO



PROFa. DRa. POLIANA MENDES DUARTE



PROF. DR. REGINALDO BRUNO GONCALVES



PROFa. DRa. KARINA GONZALES SILVERIO RUIZ

DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese aos meus pais **Juliano e Rita**,*

Sei que a distância e ausência têm sido grande, agora maior ainda.

Pesso perdão por não poder retribuir o mesmo apoio incondicional que sempre tive.

Rezo muito para que Deus ilume seus caminhos e traga dias de mais tranquilidade,

mas realmente acredito muito no aprendizado que temos tido.

Amo muito vocês, e muito do que faço tem como objetivo retribuir todo o carinho,

amor e cuidado que nunca faltaram na minha vida.

*A minhas irmãs **Fernanda e Fabiana**,*

Obrigado por serem irmãs não só de sangue, mas de companheirismo,

amizade e compreensão. O fortalecimento cada vez maior de nossa relação me traz

muito orgulho e certeza de que sempre teremos força para superar adversidades.

*A **Luciana**,*

Teu amor, amizade, paciência e carinho são parte de mim. Você me faz uma pessoa

melhor a cada dia. Temos construído uma história muito sólida e bonita,

e tenho certeza de que somos e sempre seremos muito felizes,

e espero que possamos dividir toda essa felicidade com as pessoas que amamos.

Te amo muito.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*A Deus, de quem me afastei por muito tempo,
Continue iluminando minhas escolhas,
me dando saúde e discernimento para evoluir espiritualmente,
e tentar construir um mundo melhor ajudando e amando o próximo
em suas dificuldades e anseios.*

AGRADECIMENTO

À Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do **Magnífico Reitor Prof. Dr. José Tadeu Jorge** e **Vice-reitor Prof. Fernando Ferreira Costa** .

À Direção da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do **Diretor Prof. Dr. Francisco Haiter Neto** e **Diretor associado Prof. Dr. Marcelo de Castro Meneghim**.

Ao **Prof. Dr. Mário Alexandre Coelho Sinhoreti**, coordenador geral dos cursos de Pós-Graduação **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, coordenador do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

A Universidade de Uberaba, nas pessoas do **Reitor Marcelo Palmério** e **Pró-reitor de Pesquisa e Extensão Prof. Dr. José Bento Alves**, pelas portas abertas e confiança no meu trabalho.

A **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro durante o curso de pós-graduação.

A **AS Technology** pela parceria tão produtiva com a área de Periodontia e doação de equipamentos.

A **Prefeitura Municipal de Piracicaba**, no **Centro de Especialidades Odontológicas** pela abertura do espaço para que pudéssemos selecionar pacientes.

Ao Prof. Dr. **Francisco Humberto Nociti Jr., o Chico**, pela orientação, oportunidade, e por todo o esforço em me passar todo o conhecimento possível para que minha formação fosse sólida. Obrigado pelo exemplo profissional e pela constante luta em buscar novos desafios que possam melhorar a vida das pessoas. Mas principalmente pelo caráter, lealdade e amizade durante estes anos em Piracicaba.

Ao Prof. Dr. **Márcio Zaffalon Casati**, pela grande importância na minha formação e exemplo de ética, competência e companheirismo profissional. Obrigado pela confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. **Sérgio de Toledo**, pela serenidade, incentivo e ser humano iluminado.

Ao Prof. Dr. **Antônio Wilson Sallum**, pelo exemplo de determinação e dedicação ao ensino.

Ao Prof. Dr. **Enílson Antônio Sallum**, pela confiança e exemplo de conduta.

Ao Prof. Dr. **Antônio Fernando Martorelli de Lima** (*in memoriam*), pela importância na minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. **Getúlio da Rocha Nogueira Filho**, pela amizade e por abrir meu olhos para a ciência.

Aos Professores **Poliana Mendes Duarte**, **Karina Gonzales Silvério Ruiz**, **Giuseppe Alexandre Romito** e **Reginaldo Bruno Gonçalves**, pela disposição em ler e trazer críticas que façam o trabalho crescer, e por deixarem seus compromissos para participarem deste momento tão importante na minha formação.

Aos Professores **Ricardo Della Coletta**, **Renata de Oliveira Mattos Graner** e **Fábio André dos Santos** pela ajuda do desenvolvimento do projeto e leitura criteriosa no exame de qualificação.

A **Eliete**, um exemplo de profissional, ser humano, e com um sorriso cativante que torna mais fácil a vida de todos os membros da área. Obrigado por resolver tantos problemas, e claro pelo cafezinho da tarde.

A **Mariana**, pela dedicação, esforço em aprender, pelos papos no laboratório, e pelo grande auxílio no desenvolvimento do trabalho. Obrigado por zelar com tanta competência pelo patrimônio da área.

A **Srta. Sueli Ferreira Júlio de Oliveira**, bibliotecária da FOP, pela orientação na formação da tese.

Aos amigos de pós-graduação **Antonieta, Luciana, Bruno, Robert, Renato, Fernando, Danilo, Saulo, Sandro, Érica, Juliana, Liana, Fernanda, Renato, Beatriz, Daniela, Mauro, Fabrícia, Wágner, Tatiana, Ana Paula e Karina** pessoas indispensáveis para minha formação. Obrigado pela amizade e troca de conhecimentos e experiências.

A **Ângela, Suzana, Daiane, Poliana, Patrícia, João, Cléverson, Guilherme e Henrique** irmãos que Piracicaba me deu, que deixarão muitas saudades, mas eternas lembranças.

Aos Marcelos (**Goiano, Hermetos e Santista**), irmãos da vida. Onde quer que a vida nos leve, os laços nunca se quebrarão, e sempre encontraremos apoio um nos outros para o que der e vier.

Aos meu “sogros” **Maria Eugênia e Chico Branco**, e “cunhados” **Dandan e Kiko**, minha nova família que desde de o início me acolheu com todo carinho. É com muita felicidade que vejo nossos laços se estreitando, vocês são muito importantes para mim e a saudade é enorme.

A **Carol** (in memorian), por mostrar como a vida vale a pena, que piedade não leva a nada, que o amor entre as pessoas torna a luta da vida mais confortável, que com saúde tudo pode ser resolvido e que mesmo nos momentos sem solução, a dignidade não se perde.

EPÍGRAFE

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

“Ora, nem Jesus Cristo, quando veio a Terra, se propôs resolver o problema particular de alguém. Ele se limitou a nos ensinar o caminho, que necessitamos palmilhar por nós mesmos.”

“A gente deve lutar contra o comodismo e a ociosidade; caso contrário, vamos retornar ao Mundo Espiritual com enorme sensação de vazio... Dizem que eu tenho feito muito, mas, para mim, não fiz um décimo do que deveria ter feito...”

“Abençoemos aqueles que se preocupam conosco, que nos amam, que nos atendem as necessidades. Valorizemos o amigo que nos socorre, que se interessa por nós, que nos escreve, que nos telefona para saber como estamos indo. A amizade é uma dádiva de Deus. Mais tarde, haveremos de sentir falta daqueles que não nos deixam experimentar solidão!”

CHICO XAVIER

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência do fator idade sobre o comportamento e expressão gênica de células do ligamento periodontal (CLPD), e quais alterações o tratamento com fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF) pode induzir nestas populações celulares. Culturas primárias de CLPD foram obtidas e divididas nos seguintes grupos experimentais: A – inclusos (células obtidas de terceiros molares inclusos de voluntários entre 18 e 30 anos de idade), B – jovens (células obtidas de pré-molares erupcionados de voluntários entre 15 e 20 anos de idade), C – idosos (células obtidas de dentes erupcionados de voluntários acima de 60 anos de idade), D – grupo A submetido ao tratamento com 10ng/ml de bFGF, E – grupo B submetido ao tratamento com 10ng/ml de bFGF e F – grupo C submetido ao tratamento com 10ng/ml de bFGF. Foram realizados ensaios de proliferação e viabilidade celular, mineralização, quantificação dos níveis de proteína total e do padrão de expressão dos seguintes genes: Colágeno tipo I e III, metaloproteinase (MMP)-2 e -8, inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP)-1 e -2, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)-1, proteína morfogenética óssea (BMP)-3, bFGF, osteoprotegerina (OPG), receptor ativador do fator nuclear κ B ligante (RANKL), interleucina (IL)-1 β , IL-4, IL-6, IL-8 e receptor de fator de crescimento de fibroblasto (FGFR) 1 por meio da técnica de “real-time” PCR (PCRq). A análise dos resultados demonstrou que a idade diminuiu a taxa de proliferação celular e a formação de nódulos minerais ($P < 0,05$), enquanto que não se observou efeito significativo da idade sobre a viabilidade celular e quantidade total de proteína secretada ($P > 0,05$). Já na análise de expressão gênica observou-se que a idade diminuiu significativamente os níveis de RNAm para colágeno tipo I e IL-4, enquanto que para os genes FGFR1, MMP-8, TIMP-1, OPG e IL-1 β e 6, observou-se um aumento nos níveis de RNAm ($P < 0,05$). O tratamento com 10ng/ml de bFGF aumentou a taxa proliferativa em todos os grupos ($P < 0,05$), entretanto com menor intensidade nas células de idosos ($P < 0,05$). Já a formação de nódulos minerais foi inibida pelo fator crescimento em todos os grupos experimentais ($P < 0,05$), enquanto que a viabilidade celular e quantidade total de proteína secretada não foram afetadas ($P > 0,05$). Na avaliação do padrão de expressão gênica, os resultados demonstraram que o tratamento com bFGF, diminuiu nos níveis de RNAm para todos os genes ($P < 0,05$), com exceção da TIMP-1 e IL-8 que aumentaram ($P < 0,05$),

BMP-3 que aumentou nas células de jovens e diminuiu nas células de idosos ($P < 0,05$), e PDGF-1 que não foi afetada ($P > 0,05$). Dentro dos limites do estudo, podemos concluir que: i) foi possível estabelecer culturas primárias de células do ligamento periodontal obtidas de pacientes jovens e idosos, ii) a idade pode modular propriedades importantes das CLPD, diminuindo seu potencial de regeneração de estruturas minerais além de exacerbar características pró-inflamatórias e de degradação da matriz extracelular e iii) o tratamento com 10ng/ml de bFGF induz alterações similares no comportamento de CLPD independentemente da idade do doador.

Palavras-chave: envelhecimento, periodonto, reparo, células do ligamento periodontal

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of aging on periodontal ligament cells (PDLC), modulated by the treatment with bFGF. Primary periodontal ligament cell cultures were obtained and divided into the following experimental groups: A – impacted (cells from impacted molars from subjects aged 18 to 30 years), B – young (cells from erupted pre-molars from subjects aged 15 to 20 years), C – aged (cells from erupted teeth from patients aged more than 60 years), D – group A treated with 10ng/ml of bFGF, E – group B treated with 10ng/ml of bFGF and F – group C treated with 10ng/ml of bFGF. For all groups, we performed proliferation and cell viability assays, mineralization assay, total protein quantification and assessed mRNA levels of: type I and III collagen, MMP-2 e -8, TIMP-1 e -2, PDGF-1, BMP-3, bFGF, OPG, RANKL, IL-1, IL-4, IL-6, IL-8 and FGFR 1 utilizing the “real-time” PCR technique. Data analysis demonstrated that aging negatively influenced cell proliferation and mineral nodule formation ($P<0.05$), while cell viability and total protein secretion were not affected ($P>0.05$). Gene expression analysis revealed that aging decreased mRNA levels of collagen type I and IL-4, and increased mRNA levels of FGFR1, MMP-8, TIMP-1, OPG and IL-1 and 6 ($P<0.05$). Treatment with 10ng/ml of bFGF significantly increased cell proliferation for all groups ($P<0.05$), however with a less impact on aged cells ($P<0.05$). In addition, cell viability and total protein secretion were not affected by bFGF ($P>0.05$), while mineral nodule formation was significantly inhibited ($P<0.05$). Finally, gene expression analysis demonstrated that bFGF decreased mRNA levels of all genes ($P<0.05$), except for TIMP-1 and IL-8 that were increased ($P<0.05$), PDGF-1 that was not affected ($P>0.05$) and BMP-3 that was increased in young cells and decreased in aged cells ($P<0.05$). Within the limits of our study, we may conclude that: i) it was possible to establish primary cultures of PDLC obtained from young and aged donors, ii) aging modulates important features of periodontal ligament cells (PDLC), decreasing the potential for regeneration of mineralized tissues and favoring a pro-inflammatory and degenerative profile and iii) treatment with 10ng/ml of bFGF leads to similar PDLC behavioral alterations despite of the donor age.

Key Words: aging, periodontium, repair, periodontal ligament cells

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO ENVELHECIMENTO	4
2.2 INFLUÊNCIA DO ENVELHECIMENTO NO REPARO DOS TECIDOS	7
2.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO ENVELHECIMENTO DO PERIODONTO	10
2.4 INFLUÊNCIA DO ENVELHECIMENTO NO REPARO DOS TECIDOS PERIODONTAIS	12
3 PROPOSIÇÃO	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA	16
4.2 CULTURAS PRIMÁRIAS DE CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL	17
4.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR	18
4.4 ENSAIO DE MINERALIZAÇÃO	20
4.5 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE RNAm POR MEIO DE PCRq	21
4.5.1 Extração de RNA	21
4.5.2 Síntese de cDNA	23
4.5.3 Desenho dos “Primers”	23
4.5.4 Otimização das reações	23
4.5.5 Reações de PCRq	23
4.6 ENSAIO PARA PROTEÍNA TOTAL SECRETADA	24
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
5 RESULTADOS	26
5.1 OBTENÇÃO DE CULTURAS PRIMÁRIAS DE CLPD	26
5.2 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO E EXPRESSÃO GÊNICA DE CLPD OBTIDAS DE DOADORES JOVENS E IDOSOS FRENTE AO TRATAMENTO COM bFGF (10ng/ml)	27
5.2.1 Proliferação e viabilidade celular	27
5.2.2 Proteína total	29
5.2.3 Mineralização	29
5.2.4 Expressão gênica	32
6 DISCUSSÃO	38
6.1 OBTENÇÃO DE CULTURAS PRIMÁRIAS DE CLPD DE DOADORES JOVENS E IDOSOS	38

6.2 INFLUÊNCIA DO FATOR IDADE NA PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR DE CLPD	39
6.3 INFLUÊNCIA DO FATOR IDADE NA MINERALIZAÇÃO DE CLPD	41
6.4 INFLUÊNCIA DO FATOR IDADE NOS NÍVEIS DE RNAm PARA COLÁGENO E FATORES DE CRESCIMENTO DE CLPD	42
6.5 INFLUÊNCIA DO FATOR IDADE NOS NÍVEIS DE RNAm PARA FATORES DE DEGRADAÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR DE CLPD	43
6.6 INFLUÊNCIA DO FATOR IDADE NOS NÍVEIS DE RNAm PARA FATORES DE REGULAÇÃO DE OSTEOCLASTOGÊNESE DE CLPD	44
6.7 INFLUÊNCIA DO FATOR IDADE NOS NÍVEIS DE RNAm PARA MEDIADORES INFLAMATÓRIOS DE CLPD	45
6.8 INFLUÊNCIA DO bFGF NA PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR DE CLPD DE JOVENS E IDOSOS	46
6.9 INFLUÊNCIA DO bFGF NA MINERALIZAÇÃO E NOS NÍVEIS DE RNAm PARA COLÁGENO DE CLPD DE JOVENS E IDOSOS	47
6.10 INFLUÊNCIA DO bFGF NA EXPRESSÃO GÊNICA DE CLPD DE JOVENS E IDOSOS	48
7 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXO	64
APÊNDICE	65

1 INTRODUÇÃO

O organismo é capaz de substituir células lesadas ou mortas promovendo o reparo dos tecidos por meio de dois mecanismos distintos: regeneração e fibroplasia ou fibrose. Vários fatores podem interferir na qualidade e adequação do reparo dos tecidos. Alguns têm influência local como infecções, corpos estranhos além do tamanho e da localização da ferida (Robbins *et al.*, 1999). Outros têm ação sistêmica como nutrição, fumo, diabetes e a idade (Kornman & Robertson, 2000). Com o aumento da população idosa, o esclarecimento de mecanismos básicos do envelhecimento tem tido grande importância na pesquisa médica (Abiko *et al.*, 1998). Durante o processo de envelhecimento ocorre um aumento natural na degradação do RNAm de alguns genes, provocando mudanças na sua expressão durante a proliferação e diferenciação celular. Estes genes são de diferentes classes funcionais incluindo genes do ciclo celular, de fatores de crescimento, citocinas e matrix extracelular (Brewer, 2002). Ocorre também um aumento no acúmulo de células senescentes nos tecidos, levando não somente a uma diminuição do número de células funcionais, como também a importantes alterações ambientais devido a secreção de citocinas e metaloproteinasas que afetam a estrutura tecidual (Campisi, 2005). Além disso, existe uma menor sensibilidade a agentes estimuladores de diferenciação, podendo diminuir a capacidade de regeneração e renovação dos tecidos (Schlessinger & Van Zant, 2001).

Os fibroblastos são uma das principais células envolvidas nos processos de reparo responsáveis pela síntese, organização e manutenção estrutural do tecido conjuntivo (Grinnell, 2003). Entretanto, com a idade ele diminui seu metabolismo, apresentando um retículo endoplasmático pouco desenvolvido e se tornam células quiescentes levando a diminuição na sua mobilidade, quimiotaxia, migração e proliferação (Pieraggi *et al.*, 1985; Albin *et al.*, 1988; Pienta & Coffey, 1990; Bruce & Deamond, 1991; Reed *et al.*, 2001). Estudos utilizando o envelhecimento *in vitro*, demonstraram ainda uma redução nos níveis de fator de crescimento transformador (TGF) β e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) além da diminuição da expressão de receptores para fatores de crescimento (Bauer *et al.*, 1986; Ashcroft *et al.*, 1997a e 2002). Alterações importantes também ocorrem na remodelação de colágeno, ocorrendo um aumento na expressão de collagenases (metaloproteinase (MMP) -2 e -9) e uma diminuição na expressão de seus inibidores

(inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP) -1 e -2 (Ashcroft *et al.*, 1997b e 1997c). Conforme sua passagem em cultura ocorre, estas células perdem a capacidade de se replicar, sendo portanto, consideradas células senescentes (Hayflick, 1965) além de haver um aumento na quantidade de células apoptóticas (Mammone *et al.*, 2006) demonstrando um aumento nos níveis de morte celular programada por meio de fragmentações específicas de DNA.

Embora diversas evidências sugiram um menor potencial regenerativo em indivíduos com idade avançada (Van de Kerkhof *et al.*, 1994), as informações no campo da regeneração periodontal são limitadas. Van der Velden (1984) sugeriu que mudanças relacionadas ao envelhecimento do periodonto como a diminuição da atividade mitótica e a redução na produção de matriz orgânica e quantidade relativa de colágeno solúvel, podem levar a um desenvolvimento inflamatório mais acentuado e retardar os processos de reparo periodontal (Stahl & Tonna, 1977; Paunio, 1969). Além disso, o reparo ósseo em defeitos periodontais pode ser prejudicado pelo envelhecimento, com uma menor extensão e densidade (proporção de tecido mineralizado) do tecido ósseo neoformado em fenestrações periodontais criadas cirurgicamente (Benatti *et al.*, 2006).

O comportamento de CLPD senescentes tem sido investigado na maioria das vezes pelo sistema de envelhecimento *in vitro*, que consiste em induzir o envelhecimento celular por meio de seguidas passagens da cultura de células (Abiko *et al.*, 1998). Estes estudos demonstram que sob estímulo (lipopolissacarídeos), existe um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias importantes no processo de remodelação óssea como as interleucinas (IL)-1 β e -6, e prostaglandina (PGE)-2 (Ogura *et al.*, 1994; Okamura *et al.*, 1999). Além disso, observa-se uma diminuição nos níveis de fosfatase alcalina, e alterações na fagocitose e formação de colágeno, indicando que com o tempo, o periodonto se torna mais catabólico (Goseki *et al.*, 1996; Lee & McCulloch, 1997). Entretanto, alguns estudos sugerem que o envelhecimento celular *in vitro*, não necessariamente corresponde ao envelhecimento *in vivo*. As mudanças observadas com o tempo em cultura podem representar tanto uma instabilidade fenotípica quanto à seleção de uma subpopulação destas células, ao invés das reais alterações decorrentes da idade (Mochizuki *et al.*, 1999).

Estudos realizados com culturas primárias de doadores idosos confirmam que a senescência de CLPD traz alterações funcionais significativas como a diminuição na capacidade de divisão celular e proliferação, além de uma menor secreção de proteínas ósseas como cisteína, osteopontina e osteocalcina importantes na modulação da atividade osteoclástica e da síntese óssea

e de matriz extracelular (Korn, 1975; Shiba *et al.*, 2000; Sawa *et al.*, 2000). Ocorre ainda, um aumento na quantidade de cicloxigenase (COX)-2 e na produção de PGE₂ a partir dos 35 anos de idade (Mayahara *et al.*, 2007) que pode estar relacionada a aceleração na reabsorção óssea alveolar em movimentações ortodônticas em adultos e possivelmente durante a progressão das doenças periodontais. Entretanto, informações sobre o comportamento e a expressão de genes relacionados à regeneração periodontal, em CLPD obtidas de doadores idosos, ainda não está bem caracterizada na literatura.

O fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) é um membro da família dos fatores ligados a heparina, sendo um potente fator mitogênico e quimiotático para células endoteliais, condrócitos, células musculares, osteoblastos e fibroblastos (Thomas & Gallego, 1986; Baird & Walicke, 1989). Acredita-se que ele seja um fator de crescimento de competência, ou seja, induz células em repouso (G0) a entrar no ciclo celular (G1)(Caffesse & Quiñones, 1993). Uma vez que a utilização de bFGF está estabelecida *in vitro* e *in vivo* como uma potente moduladora da resposta de células do ligamento periodontal (Blom *et al.*, 1994; Takayama *et al.*, 2001), esta se constitui em um importante instrumento para a avaliação do padrão de resposta destas células.

Diante do exposto acima os objetivos do presente estudo foram: i) estabelecer uma cultura primária de CLPD isoladas de doadores jovens e idosos; ii) avaliar o comportamento e expressão gênica de CLPD obtidas de doadores idosos e jovens e iii) avaliar o comportamento e expressão gênica destas populações celulares frente ao tratamento com bFGF na concentração de 10ng/ml.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO ENVELHECIMENTO

As manifestações somáticas do envelhecimento são geralmente bem evidentes e facilmente observáveis, porém pouco se sabe sobre a origem desse fenômeno, havendo muita discordância quanto à verdadeira natureza e dinâmica do processo (Carvalho-Filho & Alencar, 1994). Por se tratar de um processo comum a praticamente todos os seres vivos, o envelhecimento deveria ter suas bases fisiológicas melhor conhecidas, porém a maior parte do que se sabe hoje é fruto de pesquisas recentes, respondendo não só aos profissionais interessados, mas também as necessidades geradas pela explosão demográfica da população de gerontes (Jacob-Filho & Souza, 1994).

Considerando o envelhecimento como um processo gradual, cumulativo e irreversível, suas conseqüências deveriam ser causadas por fatores universais (Bayne, 2000). Dentre as reações biológicas relacionadas ao envelhecimento que ocorrem espontaneamente e causam danos, está o stress oxidativo de radicais livres que causa o acúmulo de danos fisiológicos e patológicos por meio de da oxidação de proteínas e lipídeos. Elas perdem sua integridade catalítica e estrutural e são preferencialmente hidrolisadas (Stadtman, 2001) além de formar produtos não degradáveis como a lipofuscina que ficam acumulados no citoplasma (Brunk & Terman, 2002). Outro processo que ocorre em todos os tipos celulares é a glicolização não-enzimática de proteínas, que quando degradadas produzem produtos secundários e carbonilas insaturadas, que se ligam e polimerizam com ácidos nucléicos e aminas formando uma espécie de “lixo biológico” (Bayne, 2000). Essa ligação e denaturação de proteínas podem causar o endurecimento de proteínas estruturais, e danos a proteínas funcionais que perdem sua capacidade antioxidante, de reparo de DNA, além de afetar processos essenciais como metabolismo celular, fornecimento de energia e homeostasis (Yin & Chen, 2005). As alterações intracelulares que ocorrem em células senis também afetam o DNA. O telômero, uma sequência de nucleotídeos responsável pela proteção e estabilidade da porção final dos cromossomos durante sua replicação, vão ficando mais curtos com a passagem de cada ciclo celular. O mecanismo natural de defesa do telômero, constituídos por moléculas que reparam quebras em fitas duplas de DNA, também são alteradas com o envelhecimento (Ju *et al.*, 2006).

Este “encurtamento” têm sido relacionado a senescência celular, pois leva ao acúmulo de danos a fita dupla de DNA, além de afetar sua estabilidade.

Esses fenômenos intracelulares característicos do envelhecimento se traduzem em inúmeras alterações físicas em todo o organismo do idoso. Com relação à composição e forma do corpo, os idosos começam a perder estatura a partir dos 40 anos, devido principalmente a alterações vertebrais (Atkinson, 1969). Já o crânio, as orelhas e o nariz tendem a crescer. Existe ainda um aumento no tecido adiposo e uma diminuição no teor total de água provavelmente devido à diminuição de células e da massa consumidora de oxigênio nos tecidos, sendo um aspecto muito importante na farmacocinética de idosos, que também sofrem uma redução de cerca de 10% a 20% no metabolismo basal, diminuindo suas necessidades calóricas diárias. A tolerância à glicose se altera, criando dificuldades no diagnóstico do diabetes (Myhre & Kessler, 1966). As células adiposas começam a invadir tecidos não-adiposos como o fígado, aumentando a porcentagem de gordura no organismo (Cree *et al.*, 2004). Num estudo longitudinal observando idosos por 10 anos, foi observado um aumento médio de aproximadamente 1 Kg de gordura tanto para homens como para mulheres, que constatou com um declínio no tamanho das coxas e braços e na espessura da pele (gordura subcutânea), indicando uma possível redistribuição da gordura para a área visceral (Hughes *et al.*, 2004).

A pele de indivíduos idosos sofre muitas alterações estruturais e funcionais, não só por fatores inerentes ao envelhecimento, mas também por fatores ambientais (exposição ao sol) por se tratar do principal tecido de proteção do organismo. A espessura da pele dos idosos tende a diminuir, devido a uma retração das cristas epiteliais resultando em uma união mais plana entre a epiderme e a derme, que tem como consequência uma menor capacidade de resistência durante a distribuição de forças e maior facilidade de romper após um trauma (Hull & Warfel, 1983). A irrigação diminui principalmente em regiões muito vascularizadas como dedos e lábios, além de haver uma menor vasodilatação e/ou vasoconstrição quando expostas a variações de temperatura (Tolino & Wilkin, 1988). O colágeno tipo I, que corresponde a aproximadamente 70-80% do peso seco da derme, tem sua expressão, solubilidade e espessura diminuídas (Gniadecka *et al.*, 1994). Além disso, a organização desta proteína começa a possuir uma orientação mais desorganizada formando fibras mais frouxas, juntamente com um aumento significativo na quantidade de colágeno tipo III, que é normalmente abundante em tecidos de granulação (Waller & Maibach, 2006). A resiliência da pele

também é afetada pois, apesar de haver um aumento na quantidade e na extensão das fibras de elastina a partir dos 40 anos de idade, elas possuem quantidades anormais de lipídeos e carboidratos que prejudicam sua elasticidade (Escoffier *et al.*, 1989).

O envelhecimento causa inúmeras mudanças no tecido ósseo. O balanço entre neoformação e reabsorção é alterado, causando uma involução na arquitetura do tecido (Kloss & Gassner, 2006). Esse desequilíbrio parece ser causado não por um aumento no número de osteoclastos, mas sim por uma maior inatividade osteoblástica e um menor número de osteócitos, diminuindo a neoformação óssea e mineralização da matriz osteóide (Qiu *et al.*, 2002). Sendo assim, o tecido ósseo se torna com o tempo, mais poroso, com um número maior de lacunas de osteócitos vazias e canais de Harvers mineralizados (Chan & Duque, 2002). Essas mudanças afetam principalmente o osso medular diminuindo a densidade óssea trabecular, entretanto também ocorrem reabsorções ósseas na camada endocortical, só que numa velocidade mais lenta (Riggs *et al.*, 2004). Outra importante alteração que favorece a reabsorção óssea em idosos é o declínio na produção de estrógeno tanto em homens quanto em mulheres. Este hormônio funciona como protetor do tecido ósseo inibindo os efeitos do paratormônio na ativação de osteoclastos, além da produção de citocinas pró-inflamatórias com IL-1 e fator de necrose tumoral (TNF) (Chan & Duque, 2002). Por fim, existe um declínio generalizado na retenção de proteínas da matriz óssea, como por exemplo, a osteocalcina e as proteínas ósseas morfogenéticas que são secretadas por osteoblastos e desempenham um papel importante nas interações entre células e matriz óssea (Kloss & Gassner, 2006).

O tecido muscular de idosos também sofre alterações significativas com a idade. O peso do músculo diminui, com fibras brancas e vermelhas em degeneração que são substituídas por tecido conjuntivo (Ermini, 1976), e sarcômeros mais desorganizados e com filamentos de miosina mais finos (Herndon *et al.*, 2002). A partir da quarta década de idade, existe um declínio na área muscular e no número de fibras musculares (Lexell *et al.*, 1992), levando a músculos com menos força e com uma menor capacidade de captar oxigênio, causando fadiga muscular com mais rapidez e com menos esforço (Proctor & Joyner, 1997). O músculo cardíaco, considerado um órgão pós-mitótico, ou seja, com baixa capacidade de renovação celular, também sofre alterações como a perda de miócitos, que diminui a sua capacidade de responder a alterações no fluxo ventricular, levando a uma menor performance e maior índice de doenças no miocárdio (Anversa & Olivetti,

2002). Embora o músculo cardíaco aumente de tamanho, o número e volume de miócitos diminuem, havendo uma progressão no débito cardíaco e uma diminuição na frequência cardíaca (Lakatta & Levy, 2003).

Após os 25 anos de idade, apesar de manter para o resto da vida sua capacidade de exercer sua principal função de fazer as trocas gasosas, o sistema respiratório começa a perder performance. Primeiramente, ocorre uma perda de elasticidade estática dos pulmões, devido a calcificações nas cartilagens dos ossos da cavidade torácica e uma diminuição nos espaços entre os discos vertebrais (Janssens *et al.*, 1999). Essas alterações na caixa torácica também ajudam a diminuir a força dos músculos respiratórios, com perdas de até 25% na força gerada pelo diafragma (Polkey *et al.*, 1997). Alterações no pulmão também ocorrem, como no tecido conjuntivo que apresenta fibras colágenas mais estáveis e menos organizadas e ainda com a presença de uma pseudoelastina (Janssens *et al.*, 1999). Após os 50 anos, ocorre uma degeneração em parte da elastina presente nos brônquios e alvéolos pulmonares, alterando sua dilatação e levando a um quadro conhecido como enfisema senil (Edge *et al.*, 1984).

2.2 INFLUÊNCIA DO ENVELHECIMENTO NO REPARO DOS TECIDOS

Mudanças específicas relacionadas ao envelhecimento no sistema imuno-inflamatório que podem afetar o reparo dos tecidos incluem alterações na adesão celular, migração e respostas funcionais, que levam a uma excessiva resposta inflamatória e degradação de matriz orgânica. O macrófago, uma das principais células responsáveis pela resposta imune inata, possui sua adesão e migração aumentada com a idade (Iiyama *et al.*, 1992), possivelmente devido a um declínio na expressão do fator inibidor de migração de macrófagos (MIF), considerado um fator central na regulação da inflamação e reparo dos tecidos (Hardman *et al.*, 2005). Este declínio na função dos macrófagos pode contribuir para o pior reparo em animais velhos: ratos jovens que sofreram uma injeção subcutânea com soro anti-macrófago apresentaram um retardo no fechamento de feridas, similar ao dos animais velhos (Cohen *et al.*, 1987). O neutrófilo, outra célula que desempenha um papel central, principalmente no início da resposta inflamatória, também sofre alterações com a idade. Células obtidas de doadores idosos, demonstraram aderência a fibras de nylon aumentada após os 60 anos, particularmente em mulheres (Silverman & Silverman, 1977). Estudos *in vitro* têm relatado ainda, que apesar do maior número de neutrófilos, ocorre uma redução na sua capacidade

de fagocitose e quimiotaxia, além de uma diminuição na sua diapedese devido a menor permeabilidade vascular (Butcher *et al.*, 2001).

Estudos *in vivo* têm proporcionado evidências que confirmam alterações na resposta inflamatória com a idade. Em modelos animais e humanos, um fluxo precoce de neutrófilos ocorre nas feridas de idosos, porém, com uma proporção de células maduras e imaturas alteradas (Ashcroft *et al.*, 1998). Swift *et al.* (2001), relataram um retardo no aparecimento de células T em feridas de ratos velhos, com 37-43% de redução na sua capacidade fagocítica. Recentemente, também foi demonstrado que a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α por células mononucleares de idosos é aumentada.

A resposta imune adaptativa controlada principalmente por linfócitos T, também é afetada pelo envelhecimento. Tanto a medula óssea (responsável pelas células progenitoras), quanto o timo (responsável pela maturação destas células), sofrem alterações degenerativas, criando populações de células T com uma capacidade comprometida de responder a desafios antigênicos (Pawelec *et al.*, 2001). Apesar de não haver um declínio na expressão dos receptores de antígenos em células T de idosos, sua re-expressão, necessária para uma resposta imune efetiva, cai significativamente (Wakikawa *et al.*, 1997). Além disso, a capacidade de células T de idosos de formar o complexo antígeno-anticorpo, e dentre as que formam o complexo, conseguem sinalizar adequadamente para o desenvolvimento dos mecanismos de defesa específicos, é aproximadamente 4 vezes menor do que em células T de jovens (Garcia & Miller, 2001). A resposta imune adaptativa também é afetada por meio da redução na expressão de IL-2 pelas células T de idosos. Esta citocina pró-inflamatória está intimamente ligada à expansão de clones de célula T e a resposta imuno-inflamatória Th1. A redução de sua expressão provoca um desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2. Na tentativa de compensar esta redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias pelas células T, o sistema imune inato começa a produzir mais citocinas Th1 como IL-1 e IL-6, levando a um estágio conhecido como “Inflammaging”, que se torna ainda mais acentuada em idosos que possuem alguma patologia (Fulop *et al.*, 2006).

Os fibroblastos desempenham um papel importante no reparo dos tecidos, que na sua fase inicial é controlado por sinais heterotrópicos entre fibroblastos e células inflamatórias. Estas células também se tornam senis, e apesar de continuarem viáveis, elas param de proliferar e a responder a estímulos mitogênicos, provavelmente para se proteger de um processo de divisão

descontrolado (Hayflick, 1965). Existe ainda um declínio global em todos os aspectos na mobilidade de fibroblastos humanos em doadores idosos (Pienta & Coffey, 1990), sendo o soro sanguíneo de pacientes entre 60 e 64 anos inibitório para a migração de fibroblastos pulmonares (Kondo *et al.*, 1989). Uma relação inversa entre a idade do doador e a capacidade proliferativa de fibroblastos dérmicos também foi observada por Bruce & Deamond (1991), ocorrendo ainda alterações importantes na migração, função de integrinas e organização do seu citoesqueleto (Reed *et al.*, 2001). A resposta de fibroblastos da pele ao ferimento *in vitro*, demonstra um retardo na habilidade de se restabelecer uma camada confluyente com o aumento da idade do doador (Muggleton-Harris *et al.*, 1982). A produção de metaloproteinases como MMP- 2 e 9, está aumentada em feridas de idosos (Ashcroft *et al.*, 1997b), podendo aumentar a destruição de colágeno, associada à uma elevada produção na quantidade de elastase derivada de neutrófilos, levando a excessiva quebra de fibronectina em humanos idosos (Herrick *et al.*, 1996).

Durante a fase de remodelação tecidual, que ocorre por meio da síntese, degradação, reorganização e estabilização de colágeno pelos fibroblastos, também é afetada pela idade. Estudos recentes *in vitro* afirmaram que ocorre uma desregulação na atividade proteolítica, com menores níveis de proliferação, e um aumento na atividade de collagenase e expressão do RNAm para collagenase em indivíduos velhos (Khorramizadeh *et al.*, 1999). Em 1968, Halasz observou que feridas que ocorrem em idosos, possuem índices de rompimento maiores além de adquirirem resistência mais devagar quando comparadas com animais jovens, podendo resultar num aumento na incidência de infecções e complicações médicas entre idosos.

A angiogênese, outro importante fenômeno que ocorre durante o reparo dos tecidos é retardada e alterada com a idade. Existe uma diminuição na densidade capilar da vascularização pré-existente, atingindo níveis 40% menores na neoformação vascular em tecidos de idosos (Reed & Edelberg, 2004). Os vasos envelhecidos perdem sua capacidade de dilatar inibindo a passagem de sangue para o tecido isquêmico, causada em parte pela redução na expressão de endotelina 1 (Tschudi & Luscher, 1995). A produção de trombospondina, um componente extracelular importante durante a angiogênese, ocorre em células obtidas de jovens, mas é praticamente ausente em idosos (Kramer *et al.*, 1985). Por fim, a expressão do fator de crescimento endotelial (EGF), um componente crítico tanto na angiogênese fisiológica quanto patofisiológica, é

diminuída no seu estado basal e após injúrias aos tecidos envelhecidos (Ferrara & Gerber, 2001).

2.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO ENVELHECIMENTO DO PERIODONTO

Com a idade, algumas mudanças podem ocorrer nos principais tecidos do periodonto:

Epitélio – Muitas mudanças ocorrem no epitélio oral com o envelhecimento, começando por um afinamento do epitélio (Shklar, 1966) e queratinização diminuída (Papic & Glickman, 1950). Wentz *et al.* (1952), observaram ainda, um aumento na altura das pregas epiteliais, assim como na presença de papilas do tecido conjuntivo. Além disso, o epitélio oral possui uma maior densidade celular, porém sem alterações morfológicas (Ryan *et al.*, 1974). Com relação ao tempo necessário para a regeneração do epitélio oral de idosos, alguns estudos indicam que a atividade mitótica aumenta (Toto *et al.*, 1975), e outros que ela diminui (Karring & Løe, 1973), possivelmente por diferenças metodológicas na avaliação dos tecidos. O sulco gengival também pode sofrer mudanças mesmo na ausência de biofilme dental. Sashima *et al.* (1991) observaram um aumento no comprimento do epitélio juncional, acompanhado de uma diminuição na altura da crista gengival sem a formação de bolsa gengival, levando assim, a um aumento da recessão gengival. Alterações importantes relacionadas as células de Langerhans (CL), situadas na camada espinhosa do epitélio, e que representam uma importante linha de defesa intraepitelial por capturarem o antígeno e apresentarem as células T nos nódulos linfáticos também ocorrem. Existe uma diminuição na densidade de CL, que também apresentam dendritos mais curtos e com menos prolongamentos citoplasmáticos. Estas alterações sugerem uma deterioração celular que limita a capacidade destas células de prevenir a invasão de antígenos (Zavala & Cavicchia, 2006).

Tecido conjuntivo – O ligamento periodontal de indivíduos jovens é bem organizado e estruturado, e com a idade, o número de fibras e células diminui e sua estrutura se torna mais irregular (Severson *et al.*, 1978). Alguns estudos demonstraram que a atividade mitótica e produção de matriz orgânica são reduzidas (Stahl & Tonna, 1977), havendo uma diminuição na quantidade de colágeno solúvel, e assim, aumentando sua temperatura de contração. A velocidade na renovação de colágeno também diminui, entretanto assim como em jovens, ela ocorre em maior quantidade nos terços apical e cervical devido a demandas funcionais, e do lado do osso que é um tecido mais dinâmico do que o cemento (Oehmke *et al.*, 2004). Estas alterações na estrutura e produção de colágeno por células do PDL envelhecidas, podem ser explicadas pela hipermetilação da região promotora do gene que

expressa colágeno 1, que leva ao bloqueio na expressão do gene e consequente diminuição na produção da proteína (Ohi *et al.*, 2006). Finalmente, Haim & Baumgärtel (1968) relataram um aumento no número de fibras elásticas e uma diminuição no número de restos epiteliais de Malassez. Com relação a microvascularização do ligamento, apesar de haver um aumento na densidade de vasos por mm², ela ocorre em grande parte devido à diminuição na área do ligamento periodontal e não pelo aumento no número de vasos. Ocorre ainda uma diminuição nas anastomoses de cada vaso, reduzindo sua área de irrigação e possivelmente a difusão sanguínea pelo tecido (Sims *et al.*, 1996).

Cimento – Com a idade o cimento aumenta em espessura com uma tendência a uma maior aposição na região apical e lingual, provavelmente devido à erupção passiva que envolve a reinserção de fibras entre o cimento e o ligamento periodontal (Severson *et al.*, 1978). Logo após a formação cementária, ocorrem normalmente a morte e envelhecimento de cementócitos, devido à rápida redução no acesso a substâncias nutritivas, além de uma baixa capacidade em liberar metabólitos celulares. Também foi observado que com a idade, a formação cementária se torna essencialmente acelular, com áreas de reabsorção e aposição, provocando uma irregularidade aumentada na sua superfície (Severson *et al.*, 1978). Entretanto, características relacionadas a presença de proteínas não-colágenas como proteoglicanas e glicoseamoglicanas (i.e.- condroitina, fibromodulinas, lumicanas) não parecem ser afetadas pela idade (Ababneh *et al.*, 1999), apesar de alterações estruturais e quantitativas serem esperadas.

Osso Alveolar – Assim como todos os outros tecidos conjuntivos, o osso alveolar sofre mudanças com a idade. A superfície e inserção de fibras periodontais do osso alveolar se tornam irregulares e a placa cribiforme perde em espessura (Ive *et al.*, 1980). Além disso, o osso que inicialmente é formado por um trabeculado imaturo, se torna um osso lamelar denso, com um aumento no número de lamelas intersticiais (Severson *et al.*, 1978). Utilizando material de autópsia, Stahl *et al.* (1977) concluíram que a camada osteogênica do alvéolo possui um número menor de células e sugerem que ela tem menor capacidade de proliferação, porém, coberta por uma camada ativa de osteoblastos. O fator importante que sugere um menor capacidade regenerativa é o aumento signativo nas lacunas de Howship, que poderia diminuir a fonte de células necessárias para a neoformação óssea (Jäger, 1996). Entretanto a influência da idade sobre o processo alveolar ainda

gera muita discussão, pela grande variedade entre indivíduos e entre diferentes regiões dos maxilares (von Wowern, 2001).

Placa – Em relação a influência da idade na composição do biofilme dental, Kleinberg *et al.* (1971) observaram que em adolescentes ela possui uma menor quantidade de cálcio e fósforo, provavelmente pela diferença na concentração destes sais na saliva. Alguns estudos observaram um maior acúmulo de placa em indivíduos velhos, provavelmente devido a um maior índice de retrações gengivais e alterações fisiológicas na composição da saliva. Além disso, não houve diferenças na atividade de dextranos, sucrase e amilase. Entretanto, a atividade de levanos e contagem viável de microrganismos foi maior nos indivíduos jovens, sugerindo que a composição do biofilme dental é qualitativamente diferente entre jovens e idosos (Holm-Pedersen *et al.*, 1980).

Resposta do hospedeiro – O biofilme dental pode estar presente por anos antes que o epitélio juncional comece a migrar apicalmente. Além disso, o início e progressão da doença periodontal varia muito entre indivíduos, e existem algumas evidências que sugerem que estas diferenças também podem ocorrer com a idade. Num estudo de Matsson (1978) foi relatado que após indução de gengivite experimental, os níveis de exsudato e sangramento gengival eram maiores nos indivíduos velhos, mostrando que a inflamação dos tecidos periodontais se desenvolveu mais rapidamente neles e sugerindo uma resposta imunológica comprometida. Este fenômeno confirma as conclusões de Løe *et al.* (1978), de que se a doença periodontal está presente, a velocidade de sua destruição aumenta após os trinta anos. Entretanto Van der Velden *et al.* (1985) observaram que pacientes mais jovens com a mesma quantidade de comprometimento periodontal que pacientes mais velhos, são mais susceptíveis ao desenvolvimento da doença, e que um possível efeito da idade é sobreposto pelos diferentes níveis de susceptibilidade destes indivíduos.

2.4 INFLUÊNCIA DO ENVELHECIMENTO NO REPARO DOS TECIDOS PERIODONTAIS

Estudos utilizando animais velhos mostraram um menor reparo nos tecidos periodontais, principalmente no tecido conjuntivo (Tonna & Stahl, 1973). Em outro estudo realizado em humanos avaliando a cicatrização de biópsias da região vestibular da gengiva, foi demonstrado que a cicatrização era mais rápida em jovens, e que nos velhos o tecido gengival não regenerava completamente (Holm-Pedersen & Løe, 1971). Já Abbas *et al.* (1984), observaram que após tratamento cirúrgico em pacientes de diferentes idades, com a mesma quantidade de destruição

periodontal, o tempo de cicatrização foi maior nos jovens devido a maior susceptibilidade ao desenvolvimento da doença, ou seja, o efeito da idade foi novamente sobreposto pela susceptibilidade à doença. Recentemente, Engeland *et al.* (2006), avaliaram a influência da idade e do sexo na cicatrização da mucosa oral. Foram avaliados 212 pacientes entre 18 e 88 anos, após a criação de uma ferida de 3,5mm de diâmetro por 1,5mm de profundidade. Após 2 dias as feridas dos pacientes jovens (até 35 anos), já era menor do que entre os velhos (acima de 55 anos). Entre 5 e 7 dias, o número de pacientes completamente cicatrizados também foi superior entre os jovens, independentemente do sexo dos pacientes.

Alguns estudos *in vitro* vêm tentando compreender quais os mecanismos que estariam envolvidos na influência da idade sobre o reparo dos tecidos periodontais. Goseki *et al.* (1996), avaliaram em CLPD, a influência do envelhecimento *in vitro* sobre a produção de fosfatase alcalina, catepsina e colágeno, que tem papel importante no reparo dos tecidos periodontais. Os autores observaram que a atividade de fosfatase alcalina e secreção de colágeno reduziram significativamente com o envelhecimento, sugerindo um comportamento catabólico do ligamento periodontal, que pode influenciar negativamente durante o reparo destes tecidos.

A caracterização da expressão fenotípica de fibroblastos gengivais obtidos de doadores idosos foi avaliada por Solmi *et al.* (1996), em células obtidas de indivíduos periodontalmente saudáveis e com periodontite. O potencial de proliferação, área celular e adesão dos fibroblastos gengivais não foi alterado pela presença de doença periodontal e idade, provavelmente porque o ambiente destas células é continuamente humidificado pela saliva, que sempre contém fatores de crescimento, inclusive na senescência.

A capacidade de proliferação de CLPD obtidas de doadores idosos também foi avaliada por Nishimura *et al.* (1997), por meio de citometria de fluxo. Além disso, também foram avaliadas a capacidade de replicação destas células e a expressão de c-fos que é um fator essencial para proliferação celular. Os autores observaram que nas células dos idosos, a proliferação e replicação estava diminuída, e que não havia a expressão de c-fos, sugerindo que o ligamento periodontal mais fibrótico de idosos, pode ser a razão para uma menor capacidade de reparo, e que isto pode ocorrer devido a um acúmulo progressivo de células senis nestes tecidos.

Na tentativa de compreender como o envelhecimento celular pode afetar o reparo do tecidos periodontais, Abiko *et al.* (1998) realizaram uma série de ensaios *in vitro*. Primeiramente

fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal foram envelhecidos *in vitro* com subcultivações, depois foram isoladas células de pacientes com Síndrome de Down e de pacientes idosos e por último foram obtidas células osteoblásticas da calvária de ratos. As células foram tratadas com lipopolissacarídeos e forças cíclicas. Os resultados demonstraram que as células envelhecidas produziram uma maior quantidade de mediadores como PGE- 2, IL-1 β e 6, e sugeriram que a idade pode ser um fator importante durante a progressão e reparo da doença periodontal. Mayahara *et al.* (2007) confirmaram estes resultados mostrando que culturas primárias de células do PDL de idosos, expressam mais COX-2 e produzem mais PGE₂ quando submetidas a compressão, com o ponto de conversão por volta de 35 anos de idade.

A produção de osteocalcina, uma proteína óssea importante para manutenção dos tecidos periodontais, por células do ligamento periodontal senis foi avaliada por Sawa *et al.* (2000). Os resultados mostraram que a produção da proteína era diminuída nestas células, e que em células jovens ela estava aumentada quando as células eram estimuladas, sugerindo um envolvimento na sua atividade motórica.

As proteínas ricas em cisteína (SPARC) têm um papel importante durante os processos de reparo e mineralização. Já a osteoprotegerina (OPG) está associada com a inibição de maturação, atividade e sobrevivência de osteoclastos. Shiba *et al.* (2000) avaliaram a expressão e a habilidade proliferativa destas proteínas em CLPD obtidas de idosos. Os resultados demonstraram que os níveis de SPARC aumentaram com a idade, enquanto os de OPG permaneceram inalterados. Os autores concluíram que estas alterações podem estar relacionadas ao metabolismo do ligamento periodontal e influenciar seu reparo através de uma menor proliferação destas células.

As CLPD osteogênicas também sofrem senescência, independentemente da idade do doador. Num estudo de Sawa *et al.* (2004), avaliaram a produção de fosfatase alcalina por células senis e observaram que existe uma redução na expressão desta proteína, podendo alterar sua habilidade de induzir calcificação.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Estabelecer uma cultura primária de CLPD isoladas de doadores jovens e idosos;
2. Avaliar comparativamente o comportamento e expressão gênica de CLPD obtidas de doadores idosos e jovens;
3. Avaliar comparativamente o comportamento e expressão gênica de CLPD obtidas de doadores idosos e jovens frente ao tratamento com bFGF na concentração de 10ng/ml.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

Para este estudo foram selecionados 9 indivíduos periodontalmente saudáveis, em tratamento nas clínicas de graduação e pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP e no Centro de Especialidades Odontológicas da Prefeitura Municipal de Piracicaba. De acordo com os critérios de inclusão estabelecidos participaram do estudo pacientes dentados ou parcialmente edêntulos (com pelo menos 14 dentes naturais), desde de que não apresentassem evidências de modificadores sistêmicos da doença periodontal (osteoporose, diabetes e tabagismo) e tenham tomado antibióticos, antiinflamatórios ou terapia hormonal. Foram excluídas ainda da amostra mulheres grávidas ou lactantes. Foram ainda excluídos os pacientes que não estivessem de acordo com o consentimento formal para a participação na pesquisa, após a explicação dos riscos e benefícios por indivíduo não envolvido na mesma. (Resolução nº 196 de outubro de 1996 e o Código de Ética Profissional Odontológico - CFO 179/93. A Tabela 1 ilustra as características demográficas dos voluntários incluídos no estudo.

Os indivíduos selecionados foram submetidos a anamnese, exame clínico, periodontal e radiográfico, e categorizados nos seguintes grupos experimentais: A – inclusos (composto por células extraídas de terceiros molares inclusos de 3 voluntários entre 18 e 30 anos de idade), B – jovens (composto por células extraídas de pré-molares completamente erupcionados e em função com extração indicada por motivos ortodônticos de 3 voluntários entre 15 e 20 anos de idade) e C – idosos (composto por células extraídas de dentes completamente erupcionados e em função com extração indicada por motivos protéticos de 3 voluntários acima de 60 anos de idade), D – grupo A submetido ao tratamento com 10ng/ml de bFGF, E – grupo B submetido ao tratamento com 10ng/ml de bFGF e F – grupo C submetido ao tratamento com 10ng/ml de bFGF . Para todos os ensaios foi utilizada uma mesma linhagem celular obtida de um elemento dentário de cada paciente.

Tabela 1 - Características demográficas do grupo de voluntários a partir dos quais culturas primárias de células do ligamento periodontal foram estabelecidas e utilizadas em todos os ensaios

PACIENTE	GÊNERO	IDADE	GRUPO
L.F.P.	feminino	20	A – inclusos
T.F.Q	masculino	18	A – inclusos
M.C.O	masculino	19	A – inclusos
A.P	feminino	20	B – jovens
C.W.	feminino	15	B – jovens
B.F.J.	masculino	19	B – jovens
M.C.D.	feminino	61	C – idosos
M.P.A.	masculino	73	C – idosos
S.E.A.	masculino	64	C – idosos

4.2 CULTURAS PRIMÁRIAS DE CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL

A cultura primária de CLPD foi obtida tendo como base a técnica descrita por Somerman *et al.* (1988). Imediatamente após a extração, os dentes foram acondicionados em um tubo tipo Falcon (15 ml) contendo 5 ml de meio de biópsia [Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), soro fetal bovino (FBS) a 10%, 250µg/ml de sulfato de gentamicina, 5µg/ml de anfotericina B, 100µg/ml de estreptomicina e 100U/ml de penicilina (Gibco BRL, life technologies, Rockville, MD, USA)]. Em seguida os dentes foram lavados cinco vezes no meio de biópsia, e sobre uma placa de petri esterelizada (100X20mm), o ligamento periodontal do terço médio foi removido gentilmente com uma cureta tendo sua extremidade de corte romba para evitar a remoção de lascas de cimento e dentina. O tecido foi cortado em pequenos pedaços e transferidos para um prato de cultura de células de 60X15 mm (contendo 1ml de meio de biópsia). O tecido foi então incubado em estufa umidificada a 37°C em atmosfera saturada em 5% de CO₂. No dia seguinte, o meio de biópsia foi trocado por 1ml de um meio de cultura padrão composto por DMEM, FBS a 10%, 100g/ml de estreptomicina e 100U/ml de penicilina.

Após as células atingirem confluência, o que ocorria entre 15 e 20 dias após o início do experimento, o meio de cultura era removido, as células resuspensas em uma solução de Tripsina 0,25% e EDTA 2,21mM (Gibco BRL, life technologies, Rockville, MD, USA) e transferidas para frascos de cultura T-75 para que ocorresse a expansão destas em cultura (primeira passagem celular). A troca do meio de cultura ocorreu a cada 3 dias, com a adição de 10ml de meio de cultura padrão. Após a expansão nos frascos as células eram novamente resuspensas em tripsina e congeladas a -70°C para posterior utilização nos experimentos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e utilizando células entre a segunda e quinta passagens.

4.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR

As células foram semeadas em triplicata em placas de cultura celular de 35mm a uma densidade de 2×10^4 células por poço em meio contendo DMEM, FBS a 10%, 100µg/ml de estreptomicina e 100U/ml de penicilina (Gibco BRL, life technologies, Rockville, MD, USA), sendo então incubadas em estufa umidificada a 37°C em atmosfera saturada em 5% de CO₂ por 24 horas. O meio foi então removido e as células lavadas com tampão fosfato salino (PBS - Gibco BRL, life technologies, Rockville, MD, USA), e foi então adicionado DMEM contendo apenas 100µg/ml de estreptomicina e 100U/ml de penicilina e sem a adição de FBS por 48 horas ("cell starvation"). Este período é necessário para que todas as células entrem em quiescência (fase do ciclo celular em que não há mitose), e também para que não ocorra um efeito residual do FBS a 10% utilizado para semear as células, já que existe uma grande quantidade de fatores de crescimento nele que podem se sobrepor aos efeitos do bFGF avaliados no ensaio. O meio foi então removido (dia 0) e as células tratadas com meio contendo DMEM, FBS a 1% (a baixa concentração de FBS é necessária para que possíveis efeitos do bFGF não sejam mascarados), 100µg/ml de estreptomicina e 100U/ml de penicilina com ou sem a adição de bFGF (10ng/ml), sendo o meio trocado a cada três dias (Figuras 1 e 2). Nos dias 2, 4 e 8, o meio de cultura foi removido, as células resuspensas com 1ml de uma solução de Tripsina 0,25% e EDTA 2,21mM, incubadas a 37°C por 5 minutos, sendo 1ml de meio de cultura com FBS adicionados ao prato de cultura após este período (o meio com FBS é utilizado para neutralizar o efeito da tripsina sobre as células). O número de células e a viabilidade celular foram obtidos respectivamente por meio da utilização de um hemocítômetro e da técnica de azul de tripiano.

Brevemente, quantidades iguais de amostra e de azul de tripano foram adicionadas a um tubo de ensaio e homogeneizados por 5 minutos. Em seguida uma alíquota de 6µl foi levada ao hemocítmetro e o número de células era contado. As células sem coloração eram consideradas viáveis e as que apresentavam coloração azul eram consideradas não-viáveis (a membrana celular de células não-viáveis está rompida permitindo a entrada do corante dentro da célula). O número de células obtido era então utilizado para calcular o número total de células viáveis e não-viáveis da amostra.

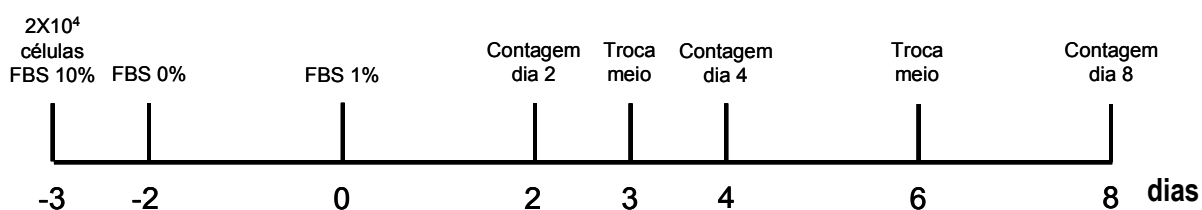


Figura 1 - Delineamento experimental do ensaio de proliferação e viabilidade celular

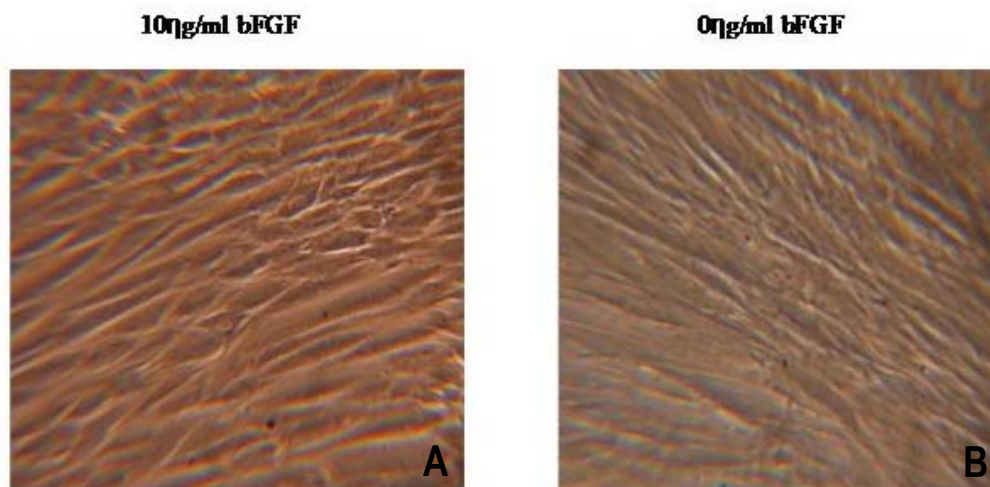


Figura 2 - Fotomicrografia de células do ligamento periodontal. As células foram semeadas, passaram por 2 dias de privação de FBS para se tornarem quiescentes, e só então eram tratadas (A) ou não (B) com bFGF (10ng/ml). (Magnificação: 10X)

4.4 ENSAIO DE MINERALIZAÇÃO

As células foram semeadas em quadriplicata em placas de 20 poços a uma densidade de 2×10^4 células por poço em meio contendo DMEM, FBS a 10%, 100 μ g/ml de estreptomicina e 100U/ml de penicilina, sendo então incubadas em estufa umidificada a 37°C em atmosfera saturada em 5% de CO₂. Antes das células entrarem em confluência o meio foi removido e as células lavadas em PBS, com a adição de DMEM contendo apenas 100 μ g/ml de estreptomicina e 100U/ml de penicilina e sem a adição de FBS, e incubadas por 48 horas, como descrito anteriormente. O meio foi então trocado (dia 0) e as células cultivadas por 28 dias em DMEM contendo a) FBS a 1%, b) FBS a 5%, c) FBS 5% e FGF (10ng/ml), d) FBS 5% e suplemento para mineralização (50 μ g/ml de ácido ascórbico e 10mM de β -glicerol fosfato) e e) FBS 5% , FGF (10ng/ml) e suplemento para mineralização (50 μ g/ml de ácido ascórbico e 10mM de β -glicerol fosfato). O meio era trocado a cada três dias (Figura 3). A fim de se determinar a formação de nódulos minerais foi realizado o ensaio Von Kossa como descrito em Bancroft & Stevens (1990). O meio de cultura foi removido, a placa lavada com tampão fosfato salino (PBS - Gibco BRL, life technologies, Rockville, MD, USA) em temperatura ambiente e as células fixadas com etanol 100% (1ml por poço) por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida as células foram re-hidratadas em concentrações decrescentes de etanol (100% até 50%, 5 minutos cada), e lavadas em água destilada por duas vezes. Depois foram lavadas em uma solução de AgNO₃ 5%, e incubadas a 37°C no escuro por 1 hora. As células foram lavadas quatro vezes em água destilada e expostas à luz até que o mineral escureça (aproximadamente 24 horas). Em paralelo, a fim de se quantificar o padrão de formação de minerais, a técnica de coloração por alizarina vermelha (Sigma, St Louis, MO, USA) foi utilizada. As células foram lavadas com PBS e fixadas em etanol 70% gelado por pelo menos 1 hora. O etanol foi aspirado e as células lavadas com água para remover o etanol remanescente. A cada poço foi adicionada 1ml de uma solução de alizarina vermelha (40Mm - pH 4,2) em temperatura ambiente por 10 minutos sob agitação, as células foram então lavadas por cinco vezes com água a fim de remover a solução de alizarina vermelha, e 1ml de PBS será adicionado a cada poço por 15 minutos sob agitação a fim de reduzir coloração não específica. A placa foi então fotografada antes do procedimento de descoloração dos nódulos para a análise quantitativa. Para promover a descoloração dos nódulos, foi adicionado 1ml de uma solução de cloreto de cetilperidina a 10% (pH 7,0) por 15 minutos e as alíquotas desta solução submetidas a análise em um leitor de placas

utilizando-se uma curva padrão de diferentes diluições da solução de alizarina como referência para determinação da concentração das amostras num comprimento de onda de 562nm. O ensaio de mineralização foi realizado em dois tempos distintos com resultados similares.

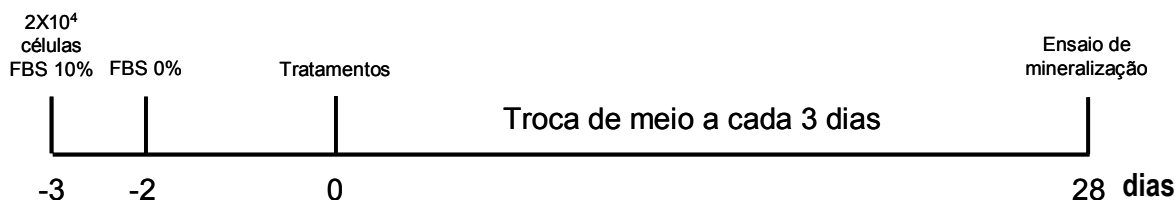


Figura 3 - Delineamento experimental do ensaio de mineralização

4.5 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE RNAm POR MEIO DE PCRq

4.5.1 Extração de RNA

As células foram semeadas em triplicata em placas de cultura celular (60mm) a uma densidade de 5×10^4 células por placa em meio contendo DMEM, FBS a 10%, 100µg/ml de estreptomicina e 100U/ml de penicilina, sendo então incubadas em estufa umidificada a 37°C em atmosfera saturada em 5% de CO₂ até atingirem sub-confluência. O meio foi então removido e as células lavadas com PBS, e foi então adicionado DMEM contendo apenas 100µg/ml de estreptomicina e 100U/ml de penicilina e sem a adição de FBS por 48 horas como descrito anteriormente. O meio foi removido, e as células tratadas com DMEM, FBS 1% (a baixa concentração de FBS é necessária para que possíveis efeitos do bFGF não sejam mascarados), 50µg/ml de ácido ascórbico com ou sem bFGF (10ng/ml) por 48 horas (Figura 4). A extração de RNA total foi realizada com o uso do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, o meio de cultura foi aspirado (armazenado a -20°C para posterior análise dos níveis de proteína total – item 4.5) e as células lavadas com PBS em temperatura ambiente. Um mililitro do reagente Trizol® foi adicionado a cada prato de cultura sendo seu o conteúdo (células + reagente Trizol®) transferido para um tubo de polipropileno e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. A cada tubo de polipropileno foi adicionado 0,2ml de clorofórmio (Merck, Frankfurt, Alemanha) sendo estes agitados cuidadosamente em “vortex”, incubados por 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugado a 9500rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado 0,5ml de isopropanol (Merck,

Frankfurt, Alemanha), sofrendo agitação em “vortex” e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente. Novamente os tubos foram centrifugados a 9500rpm por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado em etanol 75% gelado e seco a temperatura ambiente, com o tubo invertido sobre um papel de filtro. As amostras de RNA foram suspensas em água MiliQ livre de Rnase e então armazenadas a -70°C. Uma alíquota de 1µg (diluição 1:100) foi utilizada para a obtenção da concentração de RNA das amostras por meio de um espectrofotômetro. A integridade do RNA de todas as amostras foi então checada (Figura 5).

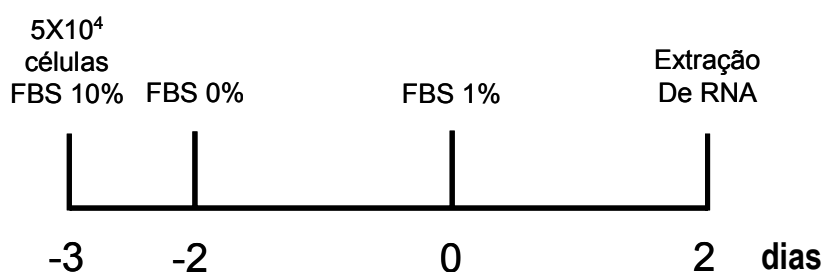


Figura 4 - Delineamento experimental da extração de RNA

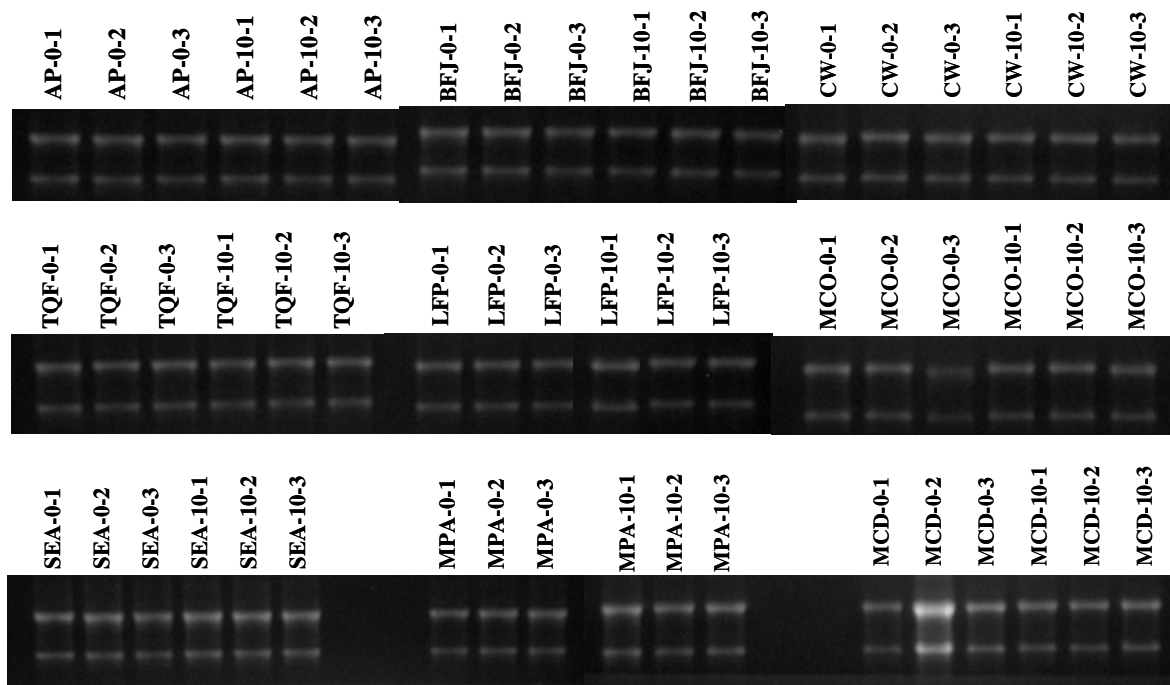


Figura 5 - Imagem ilustrativa do gel de eletroforese que comprova a integridade do RNA total de todas as amostras. A corrida era sempre realizada previamente à síntese de DNA complementar (cDNA)

4.5.2 Síntese de cDNA

O RNA total foi tratado para a eliminação de qualquer resíduo de DNA na amostra (DNA-free™, Ambion Inc. Austin, TX, USA), e 1µg da amostra foi utilizado para a síntese do DNA complementar (cDNA). Para isto, as reações foram realizadas utilizando-se o kit “first-strand cDNA synthesis (Roche Diagnostic Co., Indianapolis, IN, USA), seguindo as recomendações do fabricante para um volume final de 20µl. Os reagentes utilizados e suas respectivas concentrações foram: solução tampão (1x), MgCl₂ (5mM), mistura de deoxinucleotídeos (1mM), “primers” randomizados - p[dN]6 (3,2µg), inibidor de Rnase (50U), e transcriptase reversa – AMV (20U).

4.5.3 Desenho dos “Primers”

Os “primers” para GAPDH (gene de referência) colágenos tipo I e III, MMP-2 e 8, TIMP-1 e 2, PDGF-1, BMP-3, bFGF, FGFR1, OPG, RANKL, IL-1, IL-4, IL-6 e IL-8 foram desenhados com o auxílio de um programa desenvolvido especificamente para desenhar “primers” para o LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) (Tabela 2). Todos os “primers” foram verificados em relação a sua especificidade verificando a curva de Melting, e utilizando-se sempre controles positivos e negativos.

4.5.4 Otimização das reações

A eficiência das reações para cada “primer” foi otimizada anteriormente ao início das reações propriamente ditas. Concentrações variando 0,25 a 1µM de cada “primer” foram utilizadas para se determinar em quais condições a reação teria a melhor eficiência e maior especificidade. Condições essas sugeridas pelo fabricante do equipamento.

4.5.5 Reações de PCRq

As reações de “real-time” PCR foram realizadas com o sistema LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), utilizando-se o kit “FastStart DNA Master Plus SYBR Green I (Roche Diagnostic Co.)”. O perfil das reações foi determinado seguindo a fórmula sugerida pelo fabricante do equipamento. Para cada uma das “corridas”, a água foi utilizada como controle negativo, e o produto das reações foi quantificado utilizando o programa do próprio fabricante (LightCycler Relative Quantification Software - Roche Diagnostics GmbH). GAPDH foi utilizado como

o gene de referência (normalização dos valores) por ser expresso por todos os tipos celulares e não ter sua expressão influenciada pela idade dos pacientes. Todas as amostras foram processadas em triplicata em dois tempos distintos com resultados semelhantes.

4.6 ENSAIO PARA PROTEÍNA TOTAL SECRETADA

Os meios de cultura obtidos a partir do experimento descrito acima (Item 4.4, extração de RNA) e armazenados a -20°C foram utilizados para a quantificação dos níveis de proteína total secretada utilizando-se o sistema “Protein assay” (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Brevemente, foram preparadas 5 diluições da solução padrão (globulina bovina) para a obtenção da curva padrão. Em seguida, a cada poço de um microprato foram adicionados 10µl da solução padrão e suas diluições, e das amostras dos meios de cultura coletados previamente. Foram então adicionados 200µl do reagente previamente preparado de acordo com as recomendações do fabricante. O microprato foi gentilmente agitado por 5 segundos e após 15 minutos as absorbâncias obtidas por meio de um leitor de micropratos utilizando-se um comprimento de onda de 595nm. As amostras foram processadas em triplicata em dois tempos distintos com resultados semelhantes.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Uma vez obtidos os dados das triplicatas realizadas para todos os ensaios realizados, médias representativas de cada população foram submetidas a uma análise estatística usando um nível de significância de 5%. Para análise intragrupo dos dados dos ensaios de proliferação foi utilizado o teste paramétrico ANOVA de medidas repetidas, e quando detectada diferença estatística, o teste paramétrico de Tukey foi utilizado para detectar a diferença. Já na análise intergrupo dos dados de proliferação celular, e para os dados de proteína total, mineralização e expressão gênica foi utilizado o teste paramétrico ANOVA dois critérios, e quando detectada diferença estatística, o teste paramétrico de Tukey foi utilizado para detectar a diferença. Para o ensaio de viabilidade celular, na análise intragrupo foi utilizado o teste não-paramétrico de Friedman, e para a análise intergrupo o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Tabela 2 - Seqüência dos primers já desenhados e as respectivas Tm's. Gapdh: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; MMP: metaloproteinase; TIMP: inibidor tecidual de metaloproteinases; OPG: Osteoprotegerina; RANKL: Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand; IL: Interleucina; FGFR: receptor para FGF; bFGF: Fator de crescimento básico de fibroblastos; BMP: Proteína óssea morfogenética; PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

Gene	Primer	Tm (°C)
Gapdh	F- GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	53,6
	R- GAAGATGGTGATGGGATTTC	51,4
Colágeno I	F- CCCTGGTGCTACTGGTT	60,1
	R- ACCACGCTGTCCAGCAATA	60,4
Colágeno III	F- CCTGGTGGTAAAGGAGAAAGAG	59,9
	R- GACCAGGAAGACCACGAG	60,2
BMP-3	F- TGGCTGTCTAAAGATATCACTCAATTC	60,0
	R- GCGGCATCATTTGGCATATAC	60,0
PDGF-1	F- GGGAAGGCCTAGGGAGT	60,6
	R- ACATAGTAGGTTCAGGAATGTAACAC	59,9
bFGF	F- AACATCTCCTAACTTGTTAAATGTCC	60,0
	R- ATCCGGTGCTTCCACGA	59,7
FGFR1	F- GGTCTCTGAGTATGAGCTTCC	59,6
	R- CCACTTTGGTCACACGG	59,7
MMP-2	F- CGACCGCGACAAGAAGTA	60,2
	R- GCACACCACATCTTCCGTCA	60,4
MMP-8	F- CAGTTTCCATTCATCTTCCAAGG	59,9
	R- CCCATCACCGTCGAGTC	60,2
TIMP-1	F- GGGTTCCAAGCCTTAGGG	60,1
	R- GCAGGTAGTGATGTGCAAGA	59,9
TIMP-2	F- AGCTTGCAGGAGGAATCG	60,7
	R- ACAAGCCCGGATAAAGCAAA	60,3
OPG	F- CAAAGTAAACGCAGAGAGTGTAGA	59,9
	R- GAAGGTGAGGTTAGCATGTCC	59,6
RANKL	F- CGACATCCCATCTGGTTCC	56,5
	R- GCTGGTTTTAGTGACGTACACC	56,0
IL-1 β	F- CTTCTTCGACACATGGGATAAC	60,3
	R- TTTGGGATCTACACTCTCCAGC	60,6
IL-4	F- GTTGACCGTAACAGACATCTTTG	60,2
	R- CGAGCCGTTTCAGGAATC	59,9
IL-6	F- CTAGAGTACCTCCAGAACAGATTGA	60,2
	R- TCAGCAGGCTGGCATT	60,9
IL-8	F- GCCAAGAGAATATCCGAACTTTAAT	59,6
	R- CTGGCTAGCAGACTAGGG	59,8

5 RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO DE CULTURAS PRIMÁRIAS DE CLPD

Culturas primárias de CLPD foram obtidas com sucesso em aproximadamente 50% das biópsias. Nos casos de insucesso, os problemas ocorriam principalmente devido a instabilidade dos fragmentos de ligamento periodontal no prato de cultura de células. Nos casos de sucesso, as primeiras CLPD migravam para fora da biópsia entre 5 e 10 dias, e entre 15 e 20 dias já atingiam confluência e estavam prontas para fazer a primeira passagem. Analizadas sob um microscópio óptico, elas apresentavam uma morfologia de fibroblastos, com aspecto achatado e com prolongamentos citoplasmáticos alongados (Figura 6).

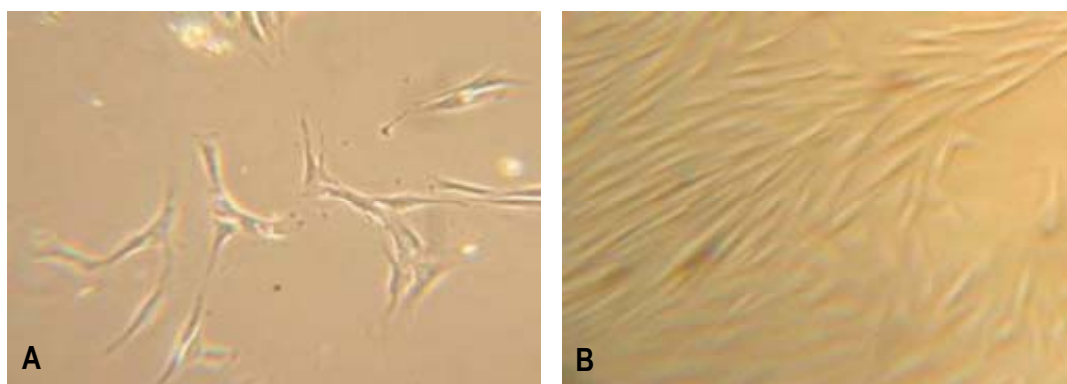


Figura 6 - Cultura de células derivadas do ligamento periodontal. (A) Um dia após serem semeadas mostrando seu aspecto alongado e com algumas expansões citoplasmáticas. (B) Aproximadamente 20 dias em cultura, atingindo confluência que variava de acordo com a idade do doador e tratamento. (Magnificação: A=20X, B=10X)

5.2 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO E EXPRESSÃO GÊNICA DE CLPD OBTIDAS DE DOADORES JOVENS E IDOSOS FRENTE AO TRATAMENTO COM bFGF (10ng/ml)

5.2.1 Proliferação e viabilidade celular

Com o intuito de investigar a influência do fator idade na proliferação e viabilidade celular de CLPD frente ao tratamento com bFGF, o número de células foi obtido utilizando-se a técnica do hemocítômetro, aos 2, 4 e 8 dias após as células serem semeadas. Também foi avaliada a proporção de células viáveis através do número de células que incorporavam azul de tripano. Com relação a proliferação celular, pudemos observar que na análise intragrupo, a idade diminuiu a taxa proliferativa, havendo um aumento significativo na proliferação celular aos 4 e 8 dias para os grupos A (inclusos) e B (jovens) ($P < 0,05$), e somente aos 8 dias para o grupo C (idosos) ($P < 0,05$). Após o tratamento com bFGF, apesar de aumentar a taxa proliferativa numericamente em todos os grupos experimentais, o padrão de resposta se manteve com maiores taxas proliferativas aos 4 e 8 dias para os grupos D e E (inclusos e jovens) ($P < 0,05$), enquanto que o grupo F (idosos) teve sua taxa proliferativa aumentada 4 dias ($P < 0,05$), o que não ocorreu sem a presença do fator de crescimento (grupo C) ($P > 0,05$). Na análise intergrupo, aos 0 e 2 dias o número de células foi similar entre todos os grupos experimentais ($P > 0,05$). Aos 4 e 8 dias, a proliferação celular foi maior no grupo B ($P < 0,01$) quando comparados aos grupos A e C que por sua vez não apresentaram taxas proliferativas diferentes ($P > 0,05$). Observou-se ainda que o aumento nas taxas proliferativas causado pela presença do bFGF foi apenas numérico quando comparados ao grupo de mesma idade sem o fator de crescimento para as células jovens e controle ($P > 0,05$). Entretanto elas foram maiores nas células jovens tratadas com bFGF (grupo E) quando comparadas aos outros grupos ($P < 0,05$), e também nas células jovens sem bFGF (grupo B) quando comparadas aos outros grupos ($P < 0,05$), com exceção das células controle com bFGF (grupo D) ($P > 0,05$). Já as células controle sem bFGF (grupo A) e as células de idosos com e sem bFGF (grupos C e F) mostraram taxas proliferativas similares aos 4 e 8 dias ($P > 0,05$). Por fim, o fator idade e o tratamento com 10ng/ml de bFGF não influenciaram a viabilidade celular em nenhum dos grupos experimentais ($P > 0,05$) (Figuras 7 e 8).

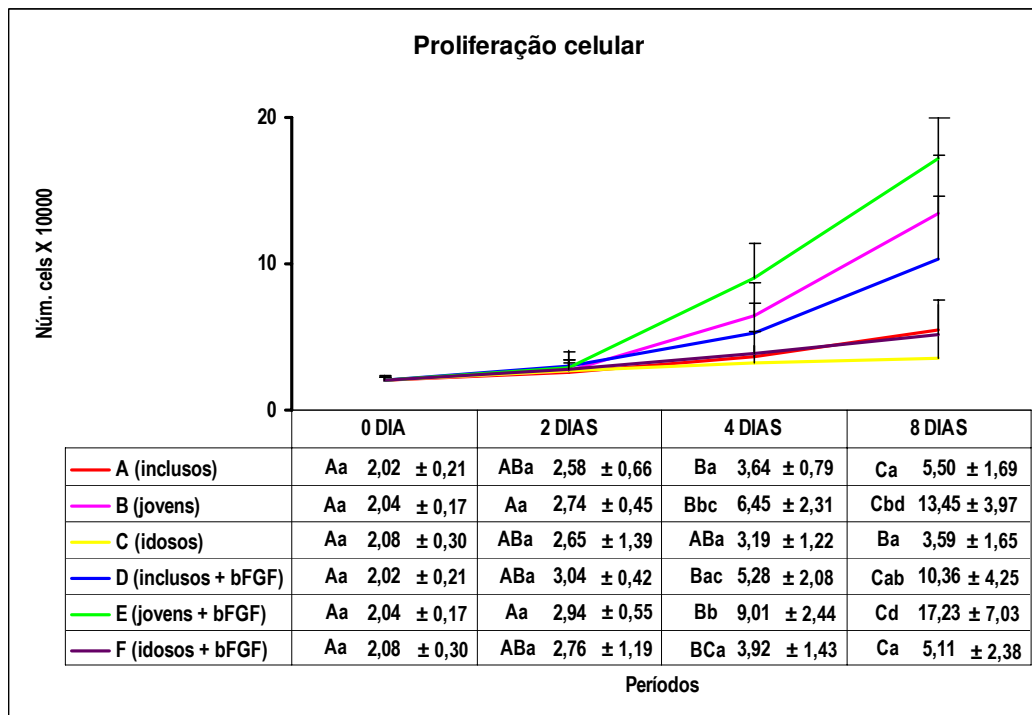


Figura 7 - Média e desvio padrão do número de células em todos os períodos e grupos experimentais. As células foram incubadas, tratadas ou não com bFGF, e contadas aos 2, 4 e 8 dias. A) inclusos; B) jovens; C) idosos; D) controle com bFGF; E) jovens com bFGF e F) idosos com bFGF. (Células tratadas com FBS 1% e bFGF 10ng/ml). As letras maiúsculas indicam a análise intragrupo e devem ser comparadas em linha, enquanto que as letras minúsculas indicam a análise intergrupo e devem ser comparadas em colunas (Anova e Tukey, $\alpha=0,05$). Os resultados mostram uma maior e mais rápida proliferação celular nas células jovens e que o tratamento com bFGF aumentou as taxas proliferativas após 4 dias, com excessão das células obtidas de idosos (grupo F)

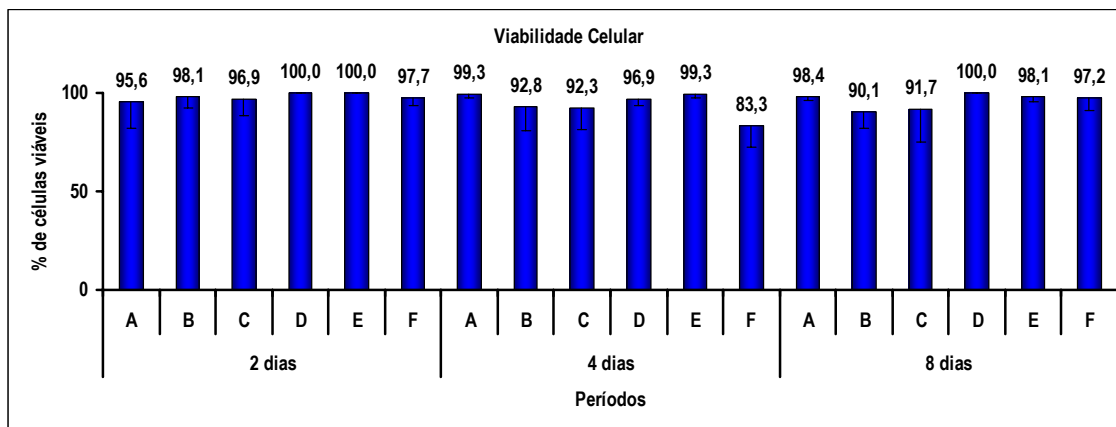


Figura 8 - Média e desvio padrão da % de células viáveis em todos os períodos e grupos experimentais. As células foram incubadas em FBS 1% por 2,4 e 8 dias e tratadas ou não com bFGF. A) inclusos; B) jovens; C) idosos; D) controle com bFGF; E) jovens com bFGF e F) idosos com bFGF. Células tratadas com FBS 1% e bFGF 10ng/ml. Os resultados demonstram que a idade e o tratamento com bFGF não influenciaram a viabilidade celular em nenhum dos grupos experimentais (Friedman e Kruskal-Wallis, $\alpha=0,05$)

5.2.2 Proteína total secretada

Para avaliar a quantidade total de proteína produzida pelas células, o meio de cultura utilizado para a avaliação da expressão gênica em todos os grupos experimentais foi removido, ou seja, as células estavam em cultura por 48 horas. A quantidade total de proteína presente no meio foi então medida pelo método de Bradford, que consiste na utilização de uma solução acídica que muda de cor ao se ligar com proteínas. Em nosso estudo, observou-se que a quantidade total de proteína produzida não foi influenciada pelo fator idade e nem pelo tratamento com bFGF em nenhum dos grupos experimentais ($P>0,05$) (Figura 9).

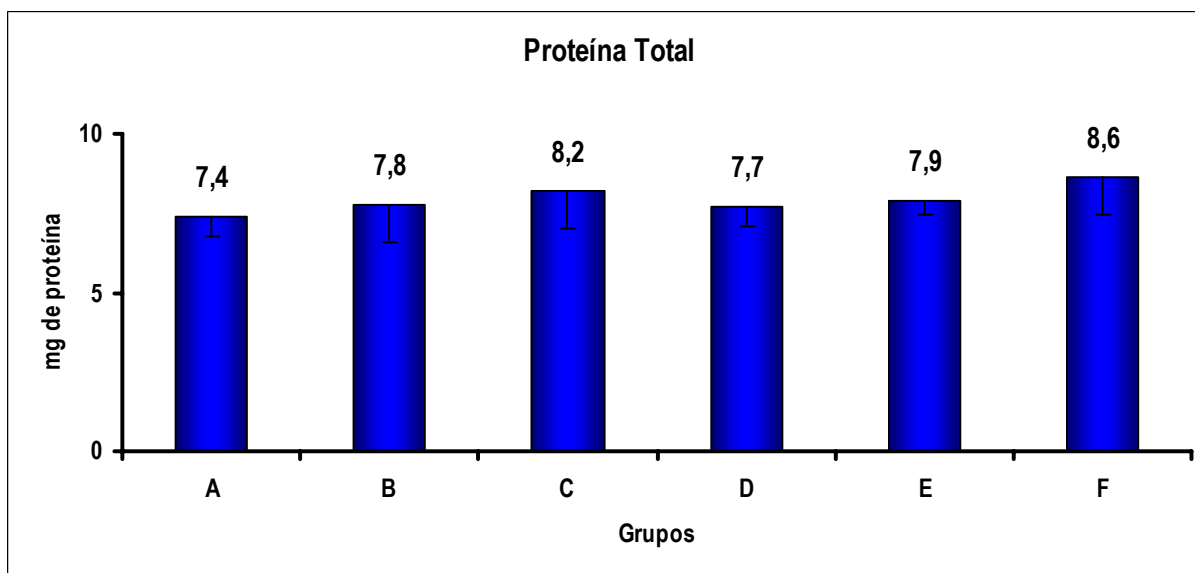


Figura 9 - Média e desvio padrão da quantidade total de proteína produzida pelas linhagens celulares dos grupos experimentais, após 48 horas de incubação com ou sem bFGF. A) controle; B) jovens; C) idosos; D) controle com bFGF; E) jovens com bFGF e F) idosos com bFGF. Células tratadas com FBS 5% e bFGF 10ng/ml. Não houve influência do fator idade e do tratamnto com bFGF na viabilidade celular em nenhum dos grupos experimentais (Anova, $\alpha=0,05$)

5.2.3 Mineralização

Para avaliar o potencial de formação de nódulos minerais pelas CLPD nós realizamos o ensaio utilizando o corante alizarina vermelha, que nos permitiu quantificar a formação de nódulos minerais medindo a absorbância liberada pelos nódulos corados. Posteriormente nós utilizamos o ensaio de von Kossa, que nos permitiu localizar os depósitos de fosfato, avaliando seu tamanho e extensão. Nosso resultados confirmaram a necessidade de suplementar o meio de cultura das

células com meio específico para mineralização (50µg/ml de ácido ascórbico e 10mM de β-glicerol fosfato) para que as CLPD apresentassem a capacidade de formar os nódulos minerais ($P<0,05$). Pudemos observar ainda, o fator idade influenciou na formação de nódulos minerais, sendo que as células jovens formaram nódulos em maior número, extensão e tamanho quando comparados com as células de inclusos ($P<0,05$), e com as células de idosos ($P<0,05$), que mostraram apenas indícios da formação de nódulos minerais. Pudemos observar ainda, que o tratamento com bFGF (10ng/ml) inibiu completamente a formação de nódulos minerais em todas as linhagens celulares, ficando estas similares as células sem suplemento para mineralização ($P>0,05$), e com menor formação de nódulos minerais do que as células jovens com suplemento para mineralização ($P<0,05$) (Figuras 10 e 11).

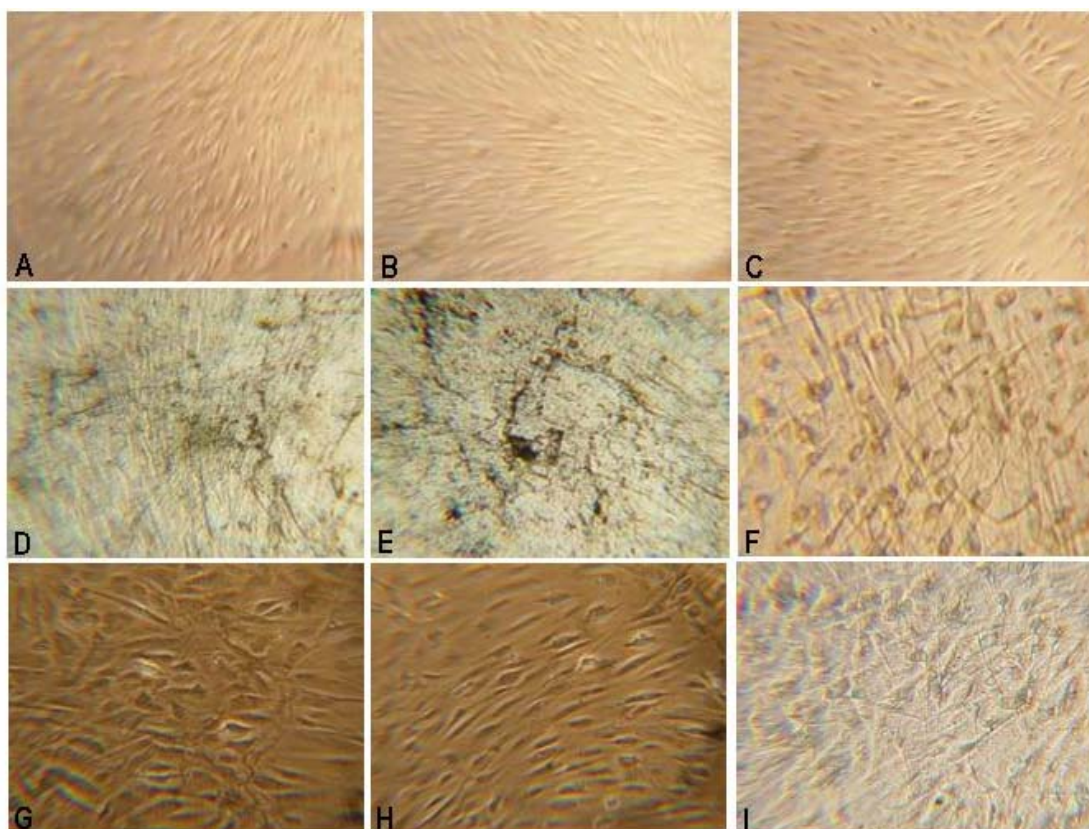


Figura 10 - Fotomicrografias das CLPD coradas pelo método von Kossa, após 28 dias de incubação com e sem bFGF. A) inclusos; B) jovens; C) idosos; D) inclusos com mineralização; E) jovens com mineralização, F) idosos com mineralização, G) controle com mineralização e bFGF, H) jovens com mineralização e bFGF e I) idosos com mineralização e bFGF. (Células tratadas com FBS 5%; mineralização = 50µg/ml de ácido ascórbico e 10mM de β-glicerol fosfato e bFGF = 10ng/ml). Os resultados demonstram que o fator idade reduziu a formação de nódulos minerais e que o tratamento com bFGF inibiu esta formação independentemente da idade do doador. (Magnificação: 10X)

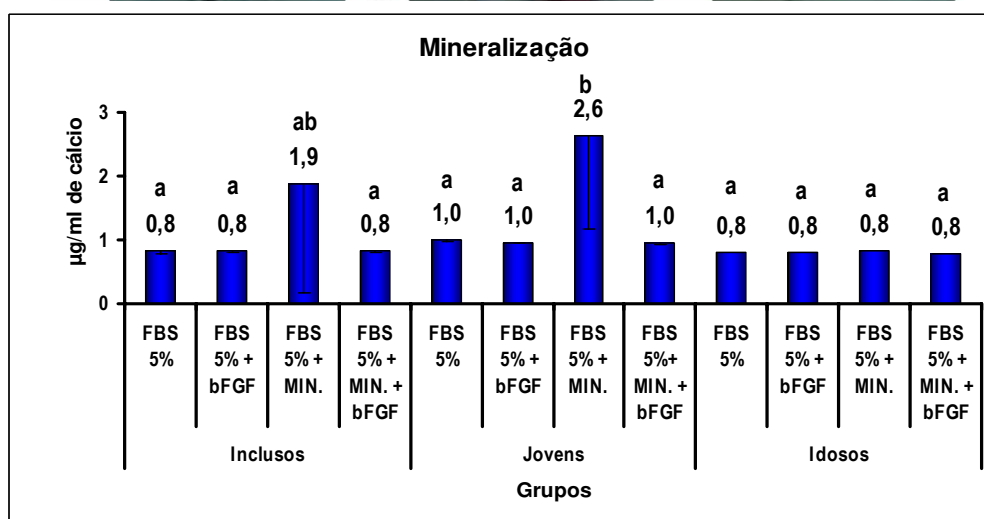
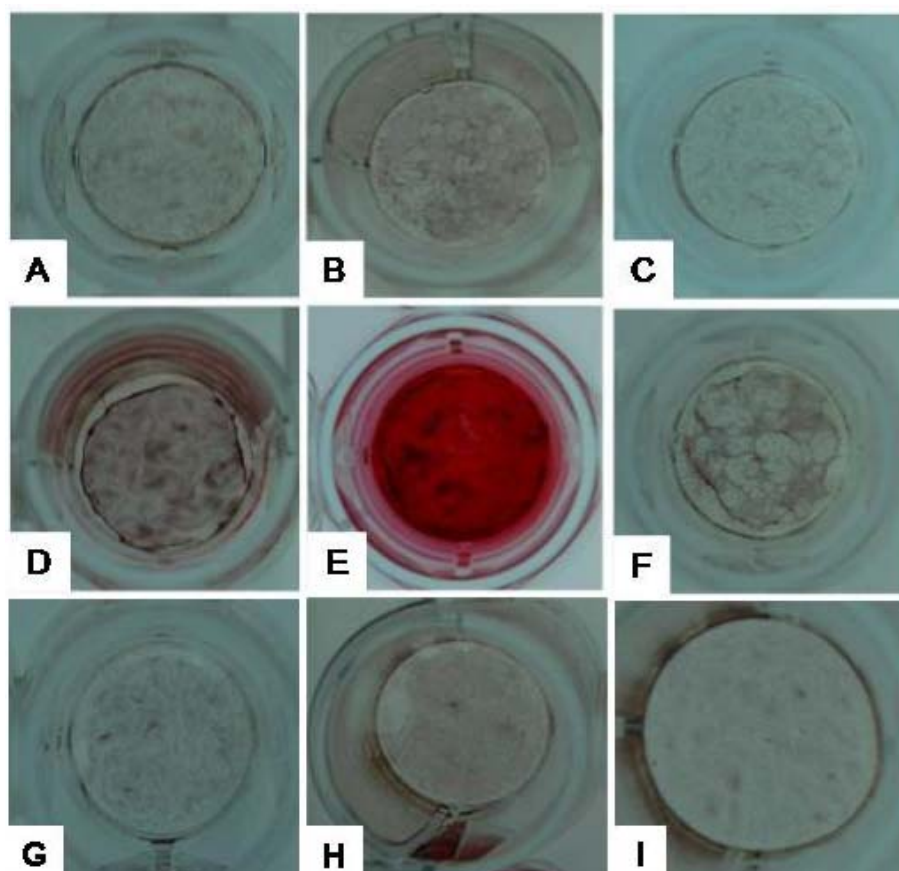


Figura 11 - Fotografias dos poços corados por alizarina vermelha, e média e desvio padrão da quantificação de cálcio corado por alizarina vermelha das linhagens celulares dos grupos experimentais, após 28 dias de incubação com e sem bFGF. A) inclusos; B) jovens; C) idosos; D) inclusos com mineralização; E) jovens com mineralização; F) idosos com mineralização; G) inclusos com mineralização e bFGF; H) jovens com mineralização e bFGF e I) idosos com mineralização e bFGF. (Células tratadas com FBS 5%; mineralização = 50µg/ml de ácido ascórbico e 10mM de β-glicerol fosfato e bFGF = 10ng/ml). Os resultados demonstram que o fator idade reduziu a formação de nódulos minerais e que o bFGF inibiu a formação de nódulos minerais independentemente da idade do doador. As médias são seguidas de diferentes letras que significam diferença estatística (Anova e Tukey, $\alpha=0,05$)

5.2.4 Expressão gênica

Com o intuito de avaliar a influência do fator idade na expressão gênica de CLPD submetidas ao tratamento com 10ng/ml de bFGF, os níveis de RNAm foram quantificados de forma relativa, utilizando a expressão do gene Gapdh como referência, por meio de PCR quantitativo em tempo real. Observou-se que o fator idade (C) diminuiu os níveis de RNAm para colágeno I e IL-4 quando comparado aos grupos de inclusos (A) e jovens (B) ($P < 0,05$); e RANKL e IL-1 β quando comparado somente ao grupo de inclusos (A) ($P < 0,05$). Por outro lado houve um aumento nos níveis de RNAm dos genes FGFR1, MMP-8, TIMP-1, OPG e IL-6 quando comparado aos grupos de inclusos (A) e jovens (B) ($P < 0,05$); e IL-1 β quando comparados somente ao grupo de jovens (B) ($P < 0,05$) (Figuras 12-14). Após o tratamento com bFGF, observou-se uma diminuição nos níveis de RNAm de colágeno tipo I e III nas células de inclusos e de jovens quando comparados aos níveis basais ($P < 0,05$), enquanto que nas células de idosos os níveis de RNAm ficaram similares ($P > 0,05$). Com relação a expressão dos fatores de crescimento, os níveis de BMP-3 eram similares entre os grupos nos níveis basais ($P > 0,05$), entretanto após o tratamento com bFGF, ocorreu um aumento nos níveis do fator nas células de inclusos e jovens tratadas com bFGF quando comparadas aos outros grupos ($P < 0,05$). Já os níveis de RNAm de bFGF e de seu maior receptor FGFR1, foram diminuídos em todos os grupos experimentais após o tratamento com bFGF ($P < 0,05$), enquanto que os níveis de PDGF-1 não foram afetados ($P > 0,05$). Com relação a expressão de genes relacionados a degradação de matriz extracelular, o tratamento com bFGF levou a uma diminuição nos níveis de RNAm de MMP-2 entre as células de inclusos e de idosos ($P < 0,05$), e de MMP-8 somente entre as células de idosos ($P < 0,05$). Este aumento nos níveis de MMP's foi acompanhado de um aumento nos níveis de um de seus maiores inibidores TIMP-1 e uma diminuição nos níveis de TIMP-2 ($P < 0,05$). Outra importante observação, foi a ausência de uma grande influência do bFGF na expressão dos fatores responsáveis pelo controle de diferenciação osteoclástica RANKL e OPG. Observou-se apenas uma diminuição nos níveis de OPG entre as células de inclusos ($P < 0,05$), enquanto que nos outros grupos os níveis basais se mantiveram similares aos níveis após o tratamento com bFGF ($P > 0,05$). Por fim, pudemos observar que o tratamento com bFGF diminuiu os níveis de RNAm do mediador anti-inflamatório IL-4 nas células controle, e do mediador pró-inflamatórios IL-1 β em todos os grupos experimentais proporcionalmente aos níveis basais ($P < 0,05$),

enquanto que os níveis de IL-6 diminuíram nas células de idosos ($P<0,05$), e os de IL-8 aumentaram nas células de idosos ($P<0,05$) (Figuras 12-16).

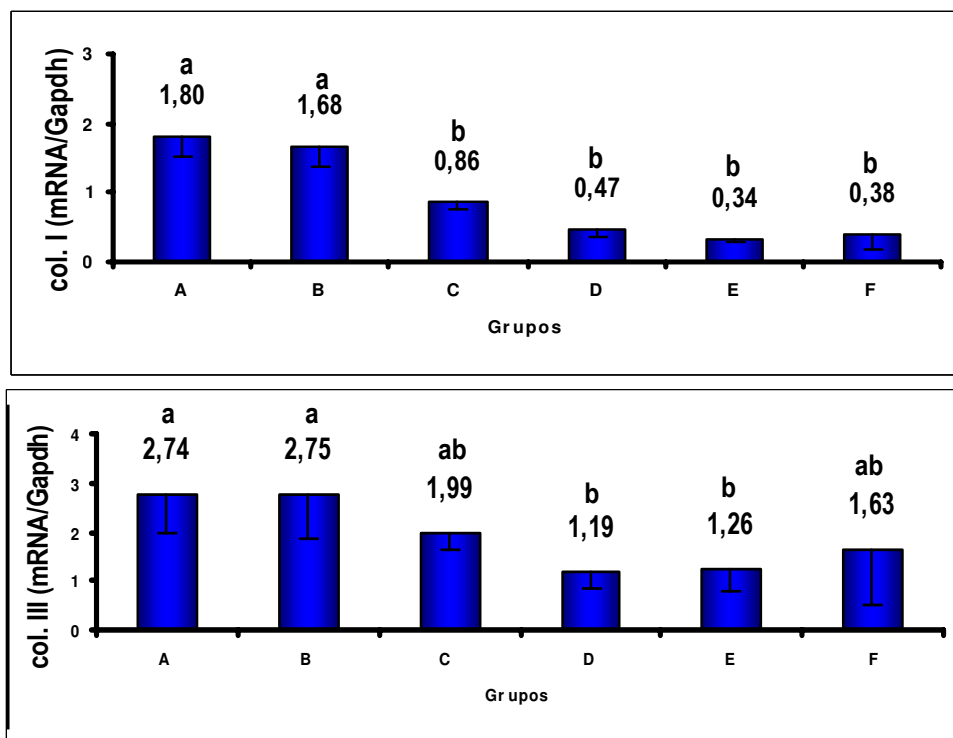


Figura 12 - Média e desvio padrão dos níveis de RNAm (RNAm/GAPDH) de colágeno. As CLPD foram incubadas por 48 horas com FBS 1%, 50 μ g/ml de ácido ascórbico e a presença ou não de 10ng/ml de bFGF. Os resultados demonstram que o fator idade diminuiu os níveis de RNAm de colágeno tipo I e que o tratamento com o fator de crescimento diminuiu os níveis de RNAm de colágeno em todos os grupos experimentais. Médias com diferentes letras significam diferença estatística (Anova e Tukey, $\alpha=0,05$)

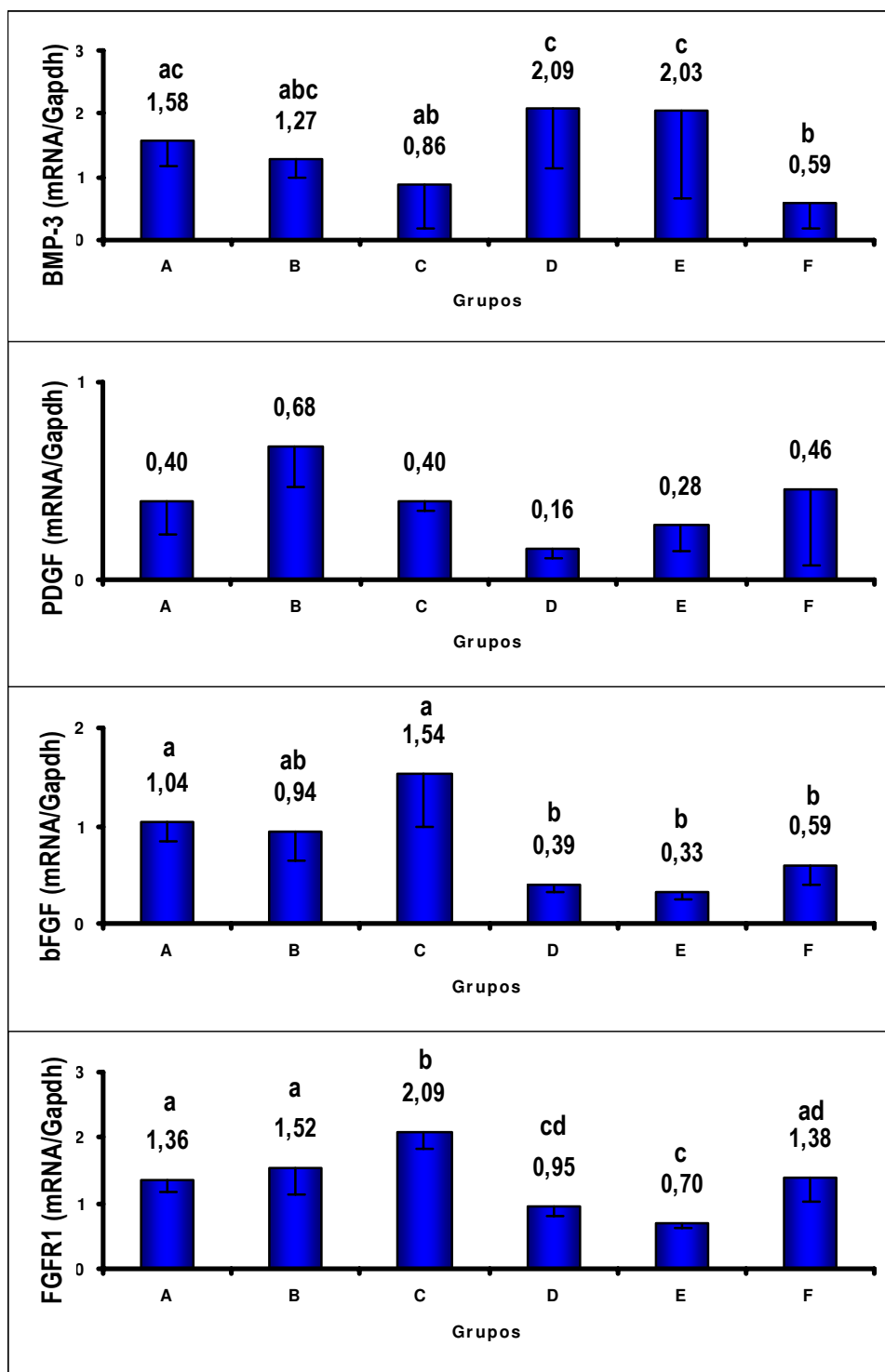


Figura 13 - Média e desvio padrão dos níveis de RNAm (RNAm/GAPDH) de fatores de crescimento. As CLPD foram incubadas por 48 horas com FBS 1%, 50µg/ml de ácido ascórbico e a presença ou não de 10ng/ml de bFGF. Os resultados demonstram que a idade aumentou os níveis de RNAm de FGFR1 e que o bFGF aumentou os níveis de BMP-3 nas células jovens e diminuiu os níveis de bFGF e FGFR1 em todos os grupos experimentais. Médias com diferentes letras significam diferença estatística (Anova e Tukey, $\alpha=0,05$)

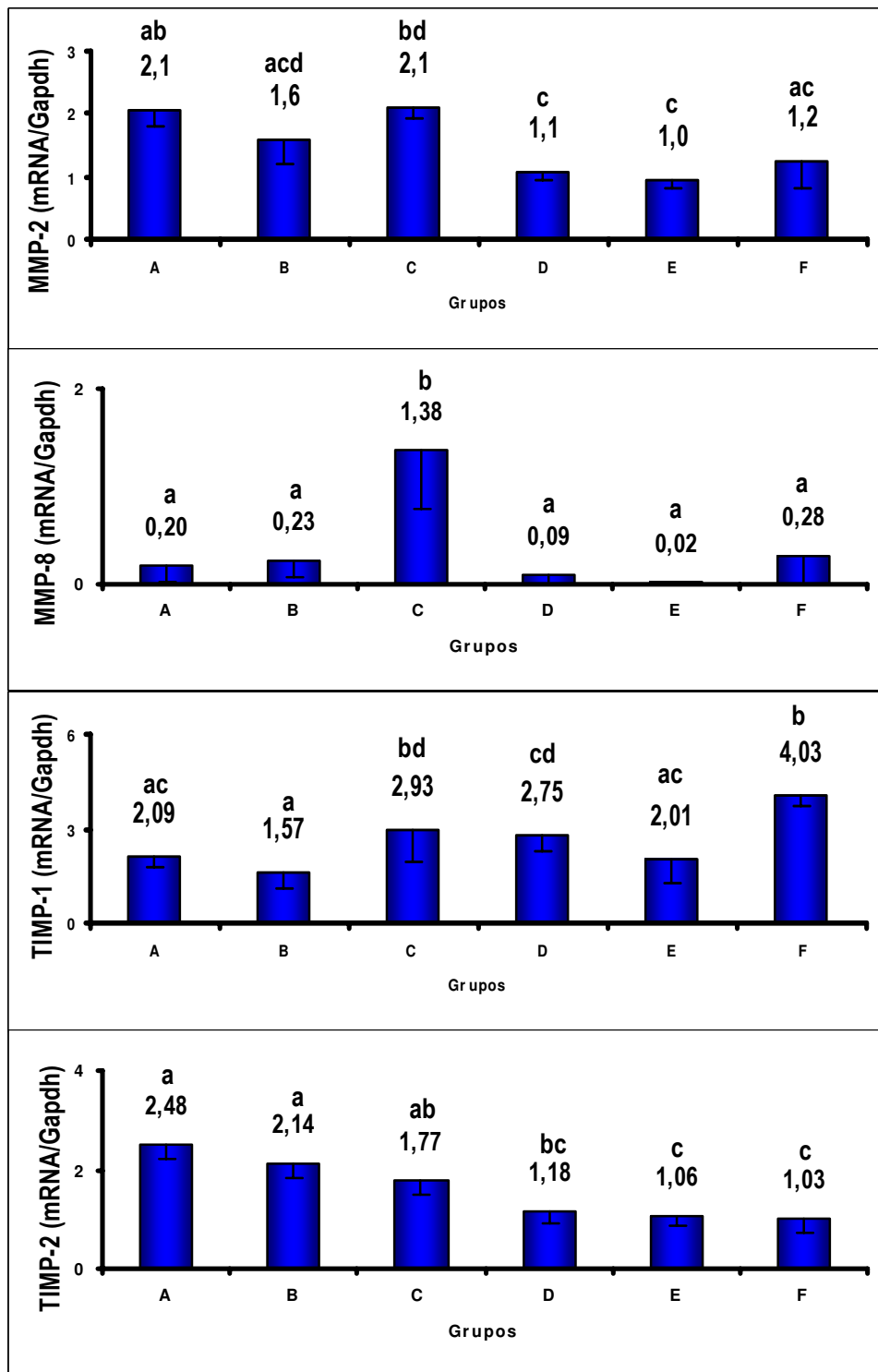


Figura 14 - Média e desvio padrão dos níveis de RNAm (RNAm/GAPDH) de fatores de degradação da matriz extracelular. As CLPD foram incubadas por 48 horas com FBS 1%, 50µg/ml de ácido ascórbico e a presença ou não de 10ng/ml de bFGF. Os resultados demonstram que a idade aumentou os níveis de RNAm para MMP-8 e TIMP-1, e que o bFGF diminuiu os níveis de RNAm de MMP-2 e 8 e TIMP-2 e aumentou os níveis de TIMP-1. Médias com diferentes letras significam diferença estatística (Anova e Tukey, $\alpha=0,05$)

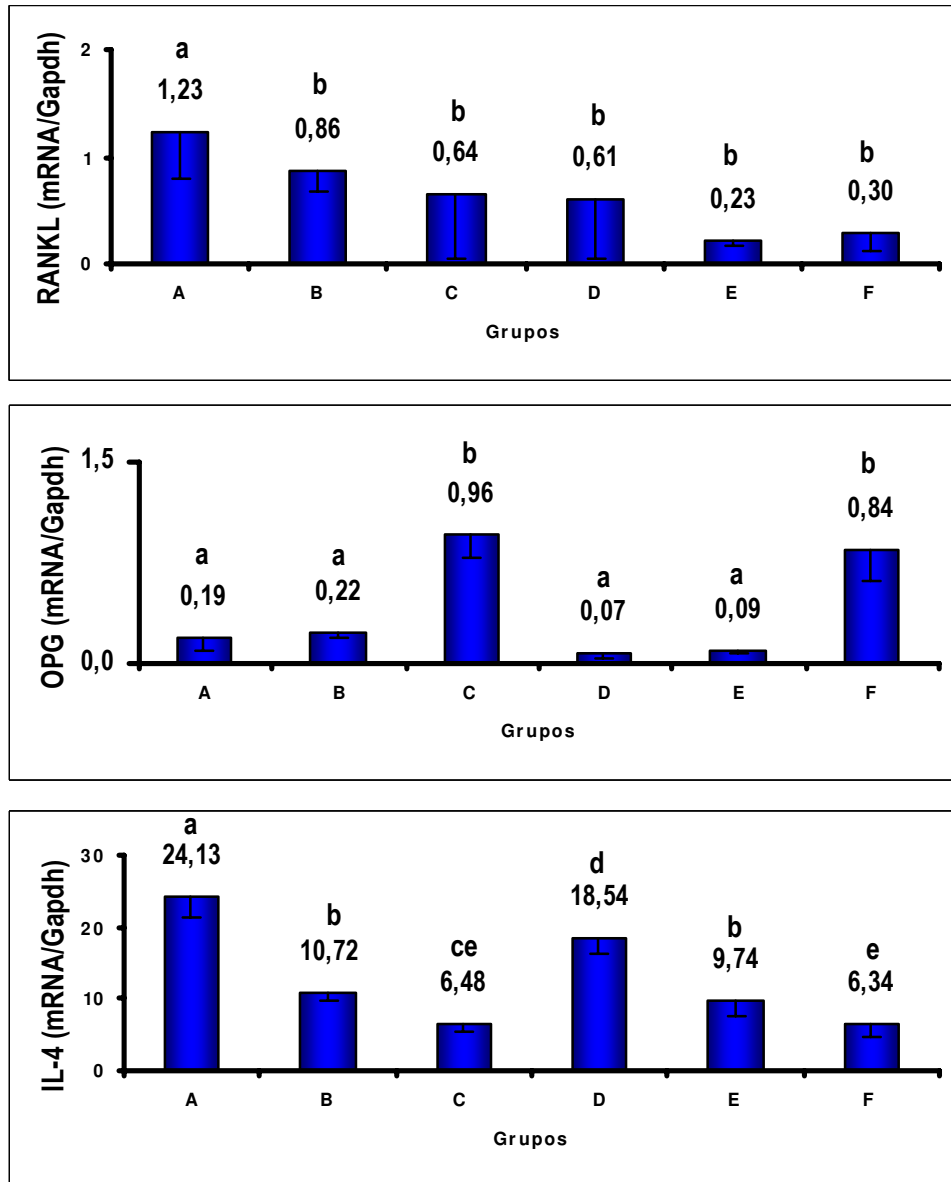


Figura 15 - Média e desvio padrão dos níveis de RNAm (RNAm/GAPDH) de fatores de regulação da osteoclastogênese e anti-inflamatórios. As CLPD foram incubadas por 48 horas com FBS 1%, 50µg/ml de ácido ascórbico e a presença ou não de 10ng/ml de bFGF. Os resultados demonstram a idade aumentou os níveis de RNAm de OPG e diminuiu os níveis de IL-4, e que bFGF não induziu alterações significativas nos níveis de RANKL e OPG, enquanto que os níveis do mediador anti-inflamatório IL-4 foram diminuídos proporcionalmente aos níveis basais em todos os grupos experimentais. Médias com diferentes letras significam diferença estatística (Anova e Tukey, $\alpha=0,05$)

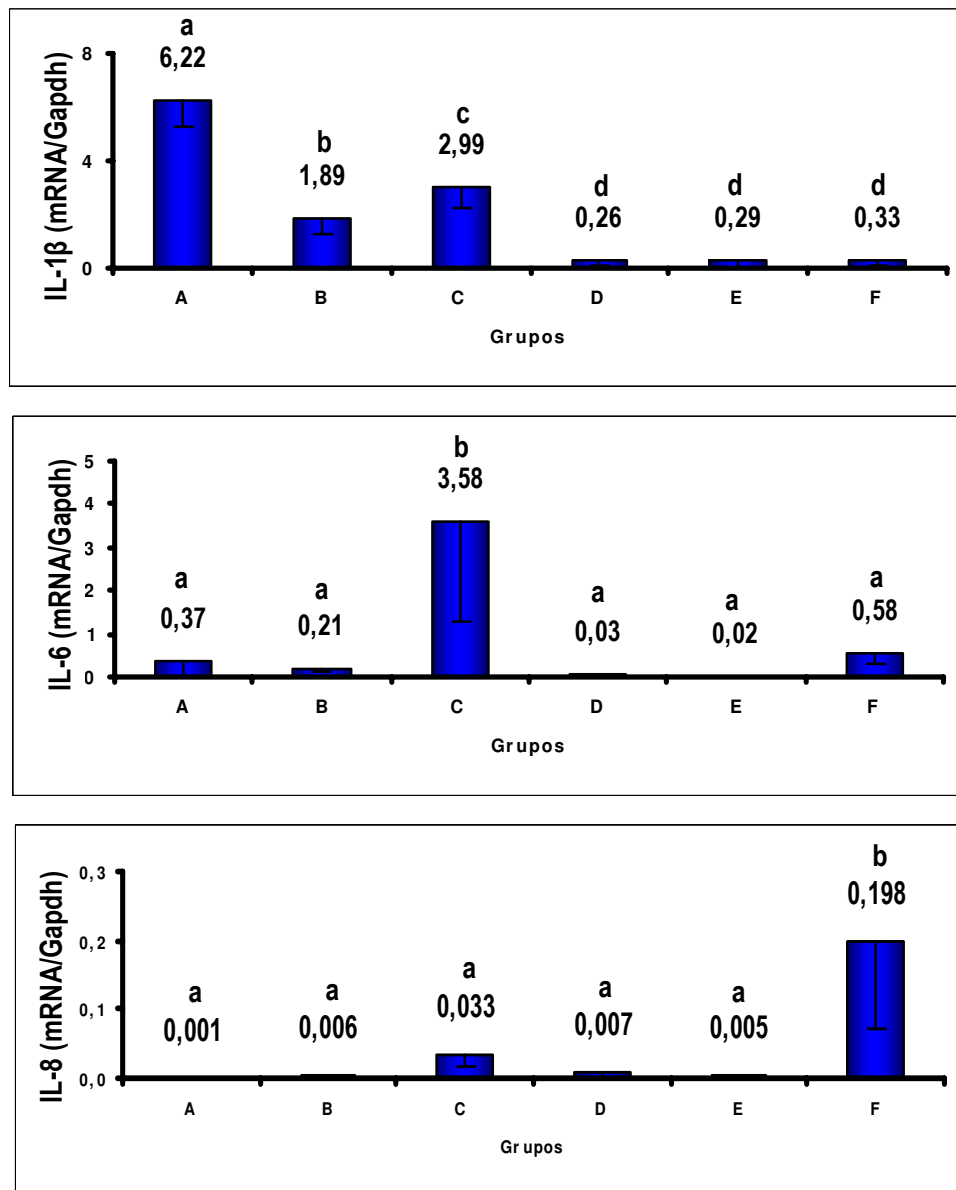


Figura 16 - Média e desvio padrão dos níveis de RNAm (RNAm/GAPDH) de pró-inflamatórios. As CLPD foram incubadas por 48 horas com FBS 1%, 50µg/ml de ácido ascórbico e a presença ou não de 10ng/ml de bFGF. Os resultados demonstram que a idade aumentou os níveis de IL-1β e 6, e que o bFGF induziu uma diminuição significativa nos níveis dos mediadores pró-inflamatório IL-1β em todos os grupos, e IL-6 nas células de idosos. Médias com diferentes letras significam diferença estatística (Anova e Tukey, $\alpha=0,05$)

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência que o fator idade pode exercer sobre o comportamento de células do ligamento periodontal (CLPD), e quais alterações o tratamento com fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF) pode induzir nestas populações celulares. Em linhas gerais, nós pudemos observar que o fator idade diminui a taxa proliferativa e a formação de nódulos minerais em CLPD. Além disso, a idade parece modular o padrão de expressão gênica das CLPD para um estado mais catabólico, com uma diminuição nos níveis de RNAm para fatores produtores de matriz extracelular e um aumento nos níveis de RNAm para fatores degradadores de matriz orgânica e pró-inflamatórios. Já o tratamento com bFGF aumenta a taxa proliferativa das células, mesmo que de forma mais lenta nas linhagens celulares de idosos. Além disso, de forma indireta, parece reduzir a expressão de fatores pró-inflamatórios e de degradação da matriz causando um feedback negativo que reduz sua própria expressão e de seus receptores. Por outro lado, ele parece diminuir os níveis de RNAm de colágeno, além de inibir a formação de nódulos minerais, sugerindo haver um retardo na formação de matriz e subsequentemente, de diferenciação celular para um fenótipo capaz de produzir tecidos mineralizados.

6.1 OBTENÇÃO DE CULTURAS PRIMÁRIAS DE CLPD DE DOADORES JOVENS E IDOSOS

Nossos índices de sucesso ($\approx 50\%$) no estabelecimento de culturas primárias de CLPD pela técnica de explante, o tempo necessário para confluência e primeira passagem, além das características morfológicas fibroblásticas das células, estão de acordo com o protocolo estabelecido por Somerman *et al.* (1988). A maioria dos casos de insucesso ocorria devido a falta de estabilidade dos fragmentos de ligamento periodontal no fundo do prato de cultura, o que impossibilitava a aderência e migração das células a partir dos tecidos. Outras técnicas de isolamento que submetem a biópsia de ligamento periodontal a digestão por enzimas como a colagenase e dispase (Seo *et al.*, 2004) são utilizadas com altos índices de sucesso, entretanto mais estudos são necessários para melhor discriminar se diferentes técnicas de isolamento influenciam no comportamento das CLPD.

A limitada capacidade de replicação de fibroblastos obtidos de variados tecidos vêm sendo amplamente utilizada como modelo para o envelhecimento biológico (Hayflick, 1965). O envelhecimento *in vitro*, preenche a descrição de senescência celular, pois a capacidade de proliferação celular é gradualmente perdida com as subcultivações ou passagens, assim como ocorre com células obtidas de doadores idosos, sugerindo um paralelo entre as duas situações. Sendo assim, este modelo se tornou atraente, pois provoca alterações que podem representar a senescência celular, com a vantagem de proporcionar o controle de variáveis experimentais com mais facilidade. Entretanto a relevância dos achados obtidos em inúmeros estudos que utilizaram o envelhecimento *in vitro* é controversa. A grande questão é se as alterações que observamos *in vitro* duplicam com fidelidade os acontecimentos que ocorrem *in situ*. A modulação da expressão de alguns genes *in vitro*, parece produzir um fenótipo celular alterado independentemente da proliferação, podendo sugerir que células em cultura são incapazes de atingir sua “real” diferenciação ou comportamento, provavelmente devido a ausência de sinalizadores no meio, ou incapacidade de processar estes sinais. Além disso, foi demonstrado que em fibroblastos da derme, o envelhecimento *in vitro* não se correlacionou necessariamente com a idade dos doadores quando a saúde dos pacientes foi controlada (Cristófaló *et al.*, 2004). Ou seja, não existe fundamentação comprovada da relação entre o envelhecimento *in vivo* e *in vitro*, e apesar das inúmeras relevantes informações que este modelo trouxe acerca dos mecanismos biológicos do envelhecimento, sua utilização pode produzir resultados questionáveis. Tendo em vista a significativa importância do ponto de vista clínico do melhor entendimento dos fenômenos que ocorrem nos tecidos periodontais em função da idade do paciente, o presente trabalho se propôs com sucesso a obter e comparar CLPD obtidas de doadores jovens (15-20 anos) com idosos (acima de 60 anos). Não se observaram diferenças em relação ao estabelecimento de cultura em função da idade do paciente.

6.2 INFLUÊNCIA DO FATOR IDADE NA PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR DE CLPD

A proliferação das CLPD é considerada um fator importante para a regeneração periodontal, pela sua capacidade de se diferenciar nos diferentes tecidos periodontais (McCulloch & Melcher, 1983; Ten Cate, 1989). No presente trabalho, a idade diminuiu a taxa de proliferação celular. Os resultados obtidos corroboram com outros trabalhos que observaram este mesmo efeito deletério do fator idade na proliferação de CLPD (Nishimura *et al.*, 1997; Shiba *et al.*, 2000). Essa

diminuição na capacidade proliferativa parece ocorrer devido á um menor número de células em ciclo de divisão celular e não por uma duração prolongada de cada fase do ciclo. O fator de transcrição c-fos é essencial para proliferação celular, pois estimula a célula a sair da fase G1 do ciclo celular e entrar na fase S de duplicação celular. Ele pertence a família do AP-1, que inclui os c-Fos (c-Fos, Fos B, FRA-1, Fra-2) e c-Jun (c-Jun, Jun B and Jun D). Esses fatores são ativados após a ativação de cascatas de sinalização intracelular, formando heterodímeros. A união Jun–Fos aos sítios AP-1 na região promotora/reguladora de genes estimula a proliferação e diferenciação celular (Karin, 1994). Células senescentes apresentam ausência ou grande diminuição na expressão do c-fos, o que também ocorre em CLPD de idosos diminuindo sua capacidade proliferativa (Nishimura *et al.*, 1997).

Se por um lado, a senilidade celular impede a sua proliferação através da sua incapacidade de passar a fase G1 do ciclo celular e entrar em divisão celular, este mesmo mecanismo parece proteger as células de sofrer apoptose ou simplesmente morte celular, como demonstrado pela ausência de efeito da idade na viabilidade celular em nosso trabalho. O tratamento de fibroblastos senis com H₂O₂, conhecido como um grande indutor de apoptose celular por meio de danos causados ao DNA, parece não ter efeito em células senis principalmente em culturas que possuíam um grande número de células fora do ciclo celular, ou seja com baixo metabolismo (Sasaki *et al.*, 2001). Outro mecanismo de resistência a apoptose observada em células senis está relacionado a inibição de fatores pró-apoptóticos muito importantes como as caspases, e a elevação na expressão de fatores anti-apoptóticos como o Bcl-2. As caspases são proteases da família das cisteínas, que atuam na fase final da morte celular mediando a proteólise de proteínas celulares. Sua ativação ocorre por meio de autocatálise e/ou granzimas, que na mitocôndria, ocorrem em processos dependentes de ATP (ou seja, metabolismo celular) (Cohen, 1997). Já a proteína Bcl-2 foi originalmente relacionada a oncogênese, entretanto sua principal função parece estar relacionada ao bloqueio da apoptose celular. Ela pertence a uma família de proteínas reguladoras de apoptose, que através da proporção de Bcl's pró e anti-apoptóticas, são determinantes para a susceptibilidade das células a morte celular programada (Oltvai *et al.*, 1993). De forma geral, estudos *in vitro* (Sasaki *et al.*, 2001; Marcotte *et al.*, 2004) demonstraram que fibroblastos senis (envelhecimento *in vitro*) mantêm seu arsenal de suporte aos mecanismos moleculares de viabilidade celular por meio da constante produção de Bcl-2, bem como, com a

inibição na produção de proteínas essenciais para a apoptose como a caspaze, criando um cenário de duas vias que as permite sobreviver a vários tipos de agressão.

6.3 INFLUÊNCIA DO FATOR IDADE NA MINERALIZAÇÃO DE CLPD

As CLPD sintetizam e mantêm uma série de matrizes de tecido conjuntivo, além de terem potencial para diferenciar-se em cementoblastos e osteoblastos, ou seja, possuem propriedades osteoblásticas incluindo a secreção de fosfatase alcalina e a capacidade de formar nódulos minerais em condições apropriadas (McCulloch & Melcher, 1983; Ten Cate, 1989; Nohutcu *et al.*, 1997). Os resultados de nosso trabalho confirmam que as CLPD são capazes de produzir nódulos minerais *in vitro*, e que este fenômeno ocorre mesmo na ausência de dexametazona, considerada um potente estimulador de diferenciação osteoblástica, corroborando com os resultados obtidos por Nohutcu *et al.* (1997). Por outro lado, o fator idade diminuiu esta capacidade de mineralização. A formação de nódulos minerais ocorre após a fase inicial de proliferação celular, que após atingirem confluência, começam a produzir matriz colágena que depois dará suporte para a maturação das células com fenótipo osteoblástico. Isto ficou bem caracterizado quando neste mesmo trabalho, Nohutcu *et al.* (1997) demonstraram que há uma intensa expressão de colágeno I nos primeiros dias de proliferação, até aproximadamente o vigésimo dia, quando começam a aparecer os primeiros nódulos minerais e a expressão de colágeno I cai significativamente. Os resultados do presente estudo nos permitem sugerir então, que a menor capacidade de produção de nódulos minerais *in vitro* pelas CLPD obtidas de idosos pode estar relacionada a sua menor taxa de proliferação, que a impossibilita ou adia a criação das condições necessárias para a mineralização. A idade pode levar ainda, à uma diminuição na qualidade da matriz colágena, pois o colágeno, uma proteína altamente estável e de grande duração, tende a criar ligações não-enzimáticas com o tempo, principalmente com a glicose. Em tecidos não-mineralizados como o ligamento periodontal, essas ligações podem alterar as propriedades da matriz formada pelo tecido, diminuindo sua capacidade de mineralização (Knott & Bailey, 1998). Aliado á essas alterações, está o fato de que o presente trabalho mostrou claramente que os níveis basais de colágeno tipo I e III, ambos importantes no processo de formação de nódulos minerais estão mais baixos no grupo de células obtidas de doadores idosos.

6.4 INFLUÊNCIA DO FATOR IDADE NOS NÍVEIS DE RNAm PARA COLÁGENO E FATORES DE CRESCIMENTO DE CLPD

A maturação da matriz extracelular é essencial para a diferenciação celular. Neste sentido, outra observação importante em nosso trabalho foi a diminuição na expressão de colágeno tipo I e III em função da idade. O colágeno, principalmente o do tipo I, é a principal proteína da matriz extracelular do ligamento periodontal, e a diminuição na sua expressão em CLPD de idosos já havia sido sugerida com modelos de envelhecimento *in vitro* e *in vivo* (Goseki *et al.*, 1996; Takatsu *et al.*, 1999). Isto pode afetar a integridade estrutural do tecido e suas importantes funções na homeostase e regeneração do periodonto. Este declínio nos níveis de RNAm pode ser explicado em grande parte por um mecanismo que também ocorre com o envelhecimento em vários tecidos e genes, a hipermetilação. A metilação de citosina está intimamente ligada a supressão de expressão gênica, e o inverso, a demetilação, estimula a sua expressão (Takatsu *et al.*, 1999). A expressão de colágeno também é modulada por este mecanismo, e foi demonstrado em culturas primárias de CLPD de jovens e idosos, que o gene COL1A1, responsável pela futura produção de colágeno, se torna hipermetilado com a idade (Ohi *et al.*, 2006).

Nossos resultados demonstraram ainda uma tendência numérica a haver menores níveis de BMP-3 e PDGF-1 nas células idosas quando comparadas com as células jovens, não ocorrendo um efeito claro da idade sobre a expressão destes fatores de crescimento. As informações com relação ao papel da BMP-3 sobre a mineralização de tecidos são controversas até o momento. Apesar de terem sido originalmente identificadas pela sua habilidade de formar osso após implantação em animais (Reddi & Cunningham, 1993), ela é a BMP mais abundante em tecido ósseo desmineralizado, atingindo até 65% do total (Wozney & Rosen, 1994). Além disso, Daluiski *et al.* (2001) observaram que a BMP-3 bloqueia a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos, sendo que sua ausência (animais knock out), pode levar à uma produção 2X maior de osso trabecular, podendo ser considerada um marcador negativo de densidade óssea. Por esse motivo, especula-se que no periodonto, a BMP-3 pode ser um regulador negativo de mineralização, importante na manutenção do ligamento periodontal (Popowics *et al.*, 2005), entretanto mais estudos são necessários para elucidar a relação entre a BMP-3, o fator idade e a biologia do periodonto. Já o PDGF, mais extensamente investigado, pode estimular células envolvidas no reparo periodontal (Lynch *et al.*, 1991), aumentando a regeneração do periodonto principalmente nos estágios iniciais

de cicatrização, através do aumento na neoformação óssea (Cooke *et al.*, 2006). Entretanto, o fator idade pode diminuir este efeito, com a diminuição na expressão do fator de crescimento e de seus receptores PDGF- α e PDGF- β , como já demonstrado *in vitro* em feridas criadas em animais idosos (Ashcroft *et al.*, 1997d).

Um aspecto interessante observado em nosso estudo foi o aumento nos níveis de bFGF e FGFR1 nas células obtidas de doadores idosos. Além de possuir importantes funções na angiogênese e proliferação celular durante o processo de reparo, o bFGF possui efeitos negativos na síntese de colágeno, sugerindo que a diferenciação precoce de CLPD progenitoras em células formadoras de tecido mineralizado, não é essencial para o reparo dos tecidos mineralizados do periodonto. Baseado nestes resultados podemos especular que o bFGF por meio do retardo na formação de uma matriz extracelular madura e apropriada para a diferenciação celular e deposição mineral, permite indiretamente que mais células indierenciadas do ligamento periodontal, que compõe apenas uma pequena porção de todas as subpopulações de CLPD, migrem e se diferenciem em cementoblastos e osteoblastos. De fato já foi demonstrado que existe uma maior número de células indierenciadas e defeitos ósseos tratados com bFGF criados em cães (Murakami *et al.*, 2003) e que células indierenciadas expressam mais bFGF do que células diferenciadas (Takayama *et al.*, 2001).

6.5 INFLUÊNCIA DO FATOR IDADE NOS NÍVEIS DE RNAm PARA FATORES DE DEGRADAÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR DE CLPD

O ligamento periodontal possui uma grande capacidade de formação de componentes da matriz extracelular, entretanto por outro lado também possui a habilidade de degradar quase todos os seus componentes. Dentre as proteases importantes neste processo, as MMP's, uma família de proteases dependentes de zinco e cálcio, podem degradar e/ou remodelar a matriz durante processos fisiológicos e patológicos, por meio da quebra de fibrilas colágenas em sítios específicos (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). A ativação de MMP's é regulada pelas TIMP's, que são capazes de inibir sua ação de forma não específica, e que geralmente é secretada de forma balanceada com as MMP's durante processos fisiológicos (Baker *et al.*, 2002). Entretanto, em muitas doenças, os níveis de MMP são elevados sem o aumento simultâneo da produção de TIMP's levando a destruição tecidual. Este mecanismo também é importante na renovação fisiológica dos

tecidos periodontais, e as MMP's parecem estar envolvidas na destruição de tecidos na doença periodontal (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). No presente estudo, o fator idade produziu um aumento significativo nos níveis de RNAm de MMP-8, uma colagenase intimamente relacionada a neutrófilos e a destruição de matriz. Nossos dados corroboram com outros estudos que demonstraram um aumento na expressão de MMP's em condrócitos e fibroblastos do miocárdio, estando envolvidas em doenças que afetam tipicamente idosos, como doenças cardiovasculares e artroses (Bae *et al.*, 2003; Lindsey *et al.*, 2005). Assim como na doença periodontal, estas doenças estão relacionadas a alterações importantes no metabolismo da matriz extracelular, caracterizadas por mudanças importantes na solubilidade de colágeno, que refletem mudanças bioquímicas na principal proteína da matriz. Com a idade, a quantidade de colágeno solúvel aumenta, e de colágeno não-solúvel diminui, acompanhado de uma maior expressão de MMP's por fibroblastos (Lindsey *et al.*, 2005). Estas mudanças sugerem um aumento no estímulo a degradação de matriz com a idade. No entanto, em nosso estudo o aumento na expressão de MMP-8 foi acompanhado por um aumento na expressão de TIMP-1, provavelmente na tentativa de manter a homeostase tecidual.

6.6 INFLUÊNCIA DO FATOR IDADE NOS NÍVEIS DE RNAm PARA FATORES DE REGULAÇÃO DE OSTEOCLASTOGÊNESE DE CLPD

Como a reabsorção óssea alveolar é um importante aspecto envolvido na regulação do metabolismo ósseo, nós também avaliamos a expressão de fatores envolvidos na diferenciação e ativação de osteoclastos. O RANKL, seu receptor RANK, e o receptor antagonista OPG, são reguladores chaves deste processo. O balanço entre RANKL/OPG pode determinar a velocidade da reabsorção óssea em várias doenças do osso incluindo a progressão da doença periodontal (Garlet *et al.*, 2006). Com a idade, a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças ósseas aumenta, principalmente entre mulheres na menopausa. Um aumento na proporção de RANKL/OPG foi relatado em pacientes idosos apresentando patologias como a artrite óssea e polimialgia reumática (Pulsatelli *et al.*, 2004). Entretanto em pacientes idosos saudáveis, os níveis séricos de OPG parecem se tornar elevados assim como demonstrado no presente estudo e relatado por outros (Mazziotti *et al.*, 2006). O aumento nos níveis de OPG pode ser uma tentativa de resposta do organismo como proteção ao catabolismo ósseo que muitas vezes acomete os idosos. No caso dos tecidos periodontais, não existem informações que esclareçam o papel do RANKL e OPG no

metabolismo ósseo em função da idade. Entretanto, nossos resultados sugerem que em pacientes idosos sistemicamente saudáveis, a elevação nos níveis de RNAm para OPG pode estar relacionada á uma tentativa de manutenção da estrutura óssea, uma vez que embora não tenhamos observado um efeito direto sobre RANKL, o sistema como um todo parece adquirir características mais catabólicas com o aumento da idade do doador. Como exemplo, Liu *et al.* (2006) demonstraram um efeito direto da IL-6 em osteoclastos, e no presente estudo, os níveis de OPG podem estar justamente servindo como uma resposta ao aumento dos níveis de RNAm para IL-6.

6.7 INFLUÊNCIA DO FATOR IDADE NOS NÍVEIS DE RNAm PARA MEDIADORES INFLAMATÓRIOS DE CLPD

A importância da resposta imuno-inflamatória do hospedeiro frente a agressão provocada aos tecidos periodontais pelo biofilme dental, vem sendo amplamente sustentada pela literatura. Sabe-se hoje que a resposta imunológica na doença periodontal é regulada pelo balanço entre citocinas T helper (Th)1 and Th2. Mediadores pró-inflamatórios como as interleucinas 1 e 6, são reguladores positivos da osteoclastogenese e da expressão de MMP's e caracterizam a resposta pró-inflamatória Th1. Por outro lado elas também podem exercer o efeito inverso, por meio das interleucinas 4 e 10 por exemplo, que por sua vez caracterizam a resposta anti-inflamatória Th2 (Gemmel & Seymour, 2004). Um desequilíbrio entre elas pode ser um fator importante na homeostase dos tecidos periodontais (Garlet *et al.*, 2006). A elevada expressão de mediadores pró-inflamatórios em CLPD de idosos estimuladas com LPS ou com algum tipo de força mecânica (compressão ou alongamento), já foi demonstrada, havendo um aumento na expressão de IL-1 β , IL-6, COX-2 e PGE2, tanto em estudos que utilizaram o modelo de envelhecimento *in vitro*, quanto os que obtiveram as células de doadores idosos (Abiko *et al.*, 1998; Mayahara *et al.*, 2007). No presente estudo observou-se um aumento nos níveis basais de RNAm para importantes citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , 6 e 8) além da redução nos níveis basais de IL-4, uma das mais potentes interleucinas anti-inflamatórias. De forma geral estes resultados demonstram que com o passar do tempo, as CLPD além de se tornarem mais catabólicas, expressam maiores quantidades de fatores pró-inflamatórios e menores quantidades de fatores anti-inflamatórios. De fato um estado inflamatório crônico relacionado ao envelhecimento foi sugerido por Franceschi *et al.* (2000), como sendo determinante para a evolução do envelhecimento nos seres humanos, e denominado

“Inflammaging”. Neste conceito, o envelhecimento do sistema imuno-inflamatório (SI) não ocorre de forma desordenada, mas sim leva a restrições evolutivas importantes. O conceito defende a hipótese de que o SI foi provavelmente programado para ser efetivo durante a fase reprodutiva da espécie, que entre nossos ancestrais coincidia com a expectativa de vida, por volta de 35 anos. Nos dias de hoje, com a expectativa de vida atingindo 80 anos, o SI tem que enfrentar muitos anos de desafio antigênico, causando um stress inflamatório crônico, que pode ter um grande impacto em nossa sobrevivência e fragilidade. A característica mais importante do SI senescente é o seu preenchimento com células imunológicas de memória, criadas como consequência a exposição à vários antígenos. Essa exposição contínua pode levar a infecções clínicas e sub-clínicas, conduzindo a um estado inflamatório crônico peculiar a idosos, que é prejudicial a longevidade. Podem ocorrer ainda danos teciduais, que levam a doenças como diabetes, neurodegeneração e aterosclerose, todas com patogênese relacionada a inflamação (De Martinis *et al.*, 2005). Sendo assim, a qualidade e quantidade de carga antigênica pode ser um fator determinante na imunosenescência e longevidade do indivíduo. Nossos resultados nos permitem especular que este mecanismo também ocorra nos limites das estruturas periodontais. Após muitos anos de desafio antigênico, os tecidos periodontais, especialmente o ligamento periodontal, parecem adquirir um perfil inflamatório subclínico mais elevado, que apesar de se manter sob controle com um bom controle de biofilme, pode se constituir num aspecto de extrema relevância em relação não só ao controle do processo inflamatório periodontal, como também na expectativa do potencial de recuperação/regeneração frente a terapia.

6.8 INFLUÊNCIA DO bFGF NA PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR DE CLPD DE JOVENS E IDOSOS

O fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) é um membro da família dos fatores ligados a heparina, sendo um potente fator mitogênico e quimiotático (Thomas & Gallego, 1986; Baird & Walicke, 1989), importante na cicatrização de feridas pelo estímulo a proliferação, angiogênese e síntese protéica através de receptores do tipo heparina (Gospodarowicz *et al.*, 1986; Globus *et al.*, 1989). No presente estudo, o tratamento das CLPD com 10ng/ml de bFGF estimulou a proliferação em células jovens, porém em células de idosos, este estímulo ocorreu tardiamente e de forma muito mais branda. A concentração de bFGF utilizada em nosso estudo foi baseada no

trabalho de Takayama *et al.* (1997), que demonstraram que o bFGF pode aumentar a proliferação de CLPD de forma dose-dependente atingindo um “plateau” com 10ng/ml. Em concentrações maiores, o número de CLPD ligadas ao bFGF ficou saturado. Como o bFGF pode se ligar também a componentes da matriz extracelular, concentrações muito altas do fator podem levar ao acúmulo dos mesmos na matriz, alterando o microambiente e por algum mecanismo não identificado, inibir a proliferação das CLPD.

O bFGF ativa a fosforilação de inúmeras proteínas sinalizadoras, dentre elas Grb2, Crk e Ras/Raf. Alguns estudos demonstraram que o bFGF pode ativar a cascata Ras/MAPK (mitogen-activated protein kinase) contribuindo para a proliferação celular (La Vallee *et al.*, 1998; Ong *et al.*, 2001). A interação dos receptores do FGF com o Ras estimulam as células a passarem da fase G0/G1 para a fase S sendo associadas com a progressão do ciclo celular (Stachowiak *et al.*, 1997). Sendo assim, é interessante observar que o bFGF pode compensar, mesmo que parcialmente, os efeitos deletérios que a idade exerce sobre a proliferação de CLPD, por meio do mesmo mecanismo, o ciclo celular. Entretanto, este efeito parcial de fatores mitogênicos sobre células senis pode estar ligado a falhas na transmissão de sinalizadores intracelulares. Esta hipótese possui suporte no fato de que células senis infectadas por vírus, possuem a capacidade de duplicar seu DNA, ou seja, apesar da ausência de replicação de DNA sob o estímulo de fatores de crescimento, seu maquinário parece estar intacto. Essas falhas devem estar ligadas a vários fatores que ocorrem após a ativação dos receptores de fatores de crescimento, como a síntese de fosfolipídeos, mobilização de cálcio, associação entre proteínas complexas e ativação de proteínas kinases (Cristófaló *et al.*, 2004). Por fim, no presente estudo os achados de que o bFGF na concentração de 10ng/ml não afetou a viabilidade celular em nenhum dos grupos experimentais nos permite afirmar que a concentração usada está abaixo da concentração tóxica, confirmando os achados de Takayama *et al.* (1997).

6.9 INFLUÊNCIA DO bFGF NA MINERALIZAÇÃO E NÍVEIS DE RNAm PARA COLÁGENO EM CLPD DE JOVENS E IDOSOS

A aplicação tópica de bFGF pode acelerar o processo de regeneração periodontal *in vivo*, provavelmente devido a criação de um microambiente que favoreça a diferenciação de CLPD e formação de tecidos mineralizados do periodonto (Takayama *et al.*, 2001), entretanto esta relação ainda não é bem compreendida. Um aspecto importante na modulação de CLPD pelo bFGF

demonstrado em nosso estudo, e que parece contradizer a comprovada importância do fator para a regeneração periodontal, é a diminuição que ele causa nos níveis de colágeno e na capacidade de mineralização das células. Esses resultados sugerem que talvez não seja necessário estimular a diferenciação das células progenitoras do ligamento diretamente, e que o bFGF pode aumentar o número de células imaturas multipotentes, que desempenham papel central na regeneração periodontal nos primeiros estágios de cicatrização (Takayama *et al.*, 1997). Yamada *et al.* (2006) na tentativa de elucidar mecanismos que envolvam o processo de mineralização em culturas de CLPD, observaram que o tratamento com bFGF-2 inibiu significativamente a expressão de PLAP-1 e fosfatase alcalina, genes intensamente expressos durante a diferenciação de CLPD em células formadoras de tecido mineralizado, além de inibir a formação de nódulos minerais, como observado em nosso estudo. Sendo assim, a supressão de genes importantes para a mineralização pode ser importante principalmente nos primeiros estágios da cicatrização, retardando a diferenciação celular, e permitindo a formação e maturação de uma matriz extracelular apropriada para a subsequente deposição de mineral (Takayama *et al.*, 1997; Yamada *et al.*, 2006).

6.10 INFLUÊNCIA DO bFGF NA EXPRESSÃO GÊNICA DE CLPD DE JOVENS E IDOSOS

A última observação, e possivelmente mais intrigante de nosso trabalho, foi que o tratamento com bFGF inibiu a expressão de genes degradadores de matriz e pró-inflamatórios. Nossos resultados não estão de acordo com os achados da literatura que demonstram de forma geral, que apesar de o bFGF ser altamente mitogênico e angiogênico, ele possui a capacidade de estimular a degradação de matriz extracelular pela expressão de MMP's, como por exemplo em células endoteliais, fibroblastos e CLPD (Lo & Hurta, 2002; Pintucci *et al.*, 2003; Shimazu & Morishita, 2003). Além disso, ele parece estar relacionado a um aumento na recrutação de leucócitos (Zittermann & Issekutz, 2006), e na expressão de marcadores inflamatórios (Rahimi *et al.*, 2005), tendo sido relacionado com o desenvolvimento de artrite reumatóide (Malemud, 2007), uma doença auto-imune caracterizada por um desequilíbrio inflamatório similar ao das doenças periodontais. Entretanto, um aspecto interessante de nossos resultados, foi que o tratamento com bFGF diminuiu de forma significativa a expressão do próprio bFGF e de um dos seus principais receptores o FGFR1. Sendo assim, acreditamos que a administração de bFGF pode ter causado um feedback negativo pelo excesso de fator disponível no meio, levando a uma diminuição da

expressão endógena do fator de crescimento e de seu receptor, e consequentemente, a diminuição na expressão dos genes degradadores de matriz de pró-inflamatórios. Takayama *et al.* (1998) avaliando a expressão de receptores de FGF em CLPD, observaram que elas são capazes de expressar os receptores FGFR1 e 2, e que seu número varia entre 2000 e 120000 por células. Além disso, foi observado que sua expressão varia durante o curso da cultura celular atingindo seu máximo quando as células atingiam confluência, sugerindo uma inibição de sua expressão por contato celular. Este fenômeno também pode ter ocorrido em nosso estudo, já que o bFGF só foi administrado quando as células já estavam confluentes. Outra hipótese interessante já demonstrada em células musculares e vasculares (Chang *et al.*, 2006), é que a administração de bFGF estimula a expressão da proteína tirosina fosfatase (PTB-1B). Como o FGF é um fator de crescimento que atua por meio de receptores tirosina kinase, a PTB-1B possui a capacidade de fosforilar estes receptores, competindo com próprio fator de crescimento, e assim funcionando como um mecanismo de feedback negativo que atenua suas funções.

7 CONCLUSÃO

Dentro dos limites do estudo, podemos concluir que: i) foi possível estabelecer culturas primárias de células do ligamento periodontal obtidas de pacientes jovens e idosos, ii) a idade pode modular propriedades importantes das CLPD, diminuindo seu potencial de regeneração de estruturas minerais além de exacerbar características pró-inflamatórias e de degradação da matriz extracelular e iii) o tratamento com 10ng/ml de bFGF induz alterações similares no comportamento de CLPD independentemente da idade do doador.

REFERÊNCIAS*

Ababneh KT, Hall RC, Embery G. The proteoglycans of human cementum: immunohistochemical localization in healthy, periodontally involved and ageing teeth. *J Periodontal Res.* 1999; 34(2):87-96.

Abbas F, van der Velden U, Hart AA. Relation between wound healing after surgery and susceptibility to periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1984; 11(4):221-9.

Abiko Y, Shimizu N, Yamaguchi M, Suzuki H, Takiguchi H. Effect of aging on functional changes of periodontal tissue cells. *Ann Periodontol.* 1998; 3(1):350-69.

Albini A, Pontz B, Pulz M, Allavena G, Mensing H, Muller PK. Decline of fibroblast chemotaxis with age of donor and cell passage number. *Coll Relat Res.* 1988; 8(1):23-37.

Anversa P, Olivetti G. Cellular basis of physiological and pathological myocardial growth. In: Page E, editor. *Handbook of physiology: The cardiovascular system.* New York: Oxford University Press; 2002. p.75-144.

Ashcroft GS, Dodsworth J, van Boxtel E, Tarnuzzer RW, Horan MA, Schultz GS *et al.* Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF-beta1 levels. *Nat Med.* 1997a; 3(11):1209-15.

Ashcroft GS, Horan MA, Herrick SE, Tarnuzzer RW, Schultz GS, Ferguson MW. Age-related differences in the temporal and spatial regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) in normal skin and acute cutaneous wounds of healthy humans. *Cell Tissue Res.* 1997b; 290(3):581-91.

Ashcroft GS, Herrick SE, Tarnuzzer RW, Horan MA, Schultz GS, Ferguson MW. Human ageing impairs injury-induced in vivo expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP)-1 and -2 proteins and RNAm. *J Pathol.* 1997c; 183(2):169-76.

Ashcroft GS, Horan MA, Ferguson MW. The effects of ageing on wound healing: immunolocalisation of growth factors and their receptors in a murine incisional model. *J Anat.* 1997d; 190 (Pt 3):351-65.

Ashcroft GS, Mills SJ, Ashworth JJ. Ageing and wound healing. *Biogerontology.* 2002; 3(6):337-45.

Ashcroft GS, Horan MA, Ferguson MW. Aging alters the inflammatory and endothelial cell adhesion molecule profiles during human cutaneous wound healing. *Lab Invest.* 1998; 78(1):47-58.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Atkinson PJ. Structural aspects of ageing bone. *Gerontology*. 1969; 15(2):171-3.

Bae JW, Takahashi I, Sasano Y, Onodera K, Mitani H, Kagayama M *et al*. Age-related changes in gene expression patterns of matrix metalloproteinases and their collagenous substrates in mandibular condylar cartilage in rats. *J Anat*. 2003; 203(2):235-41.

Baird A, Walicke PA. Fibroblast growth factors. *Br Med Bull*. 1989; 45(2):438-52.

Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*. 2002; 115(19):3719-27.

Bancroft J, Stevens A. Theory and practice of histological techniques. 5. ed. Chicago: Churchill Livingstone; 1990.

Bauer EA, Silverman N, Busiek DF, Kronberger A, Deuel TF. Diminished response of Werner's syndrome fibroblasts to growth factors PDGF and FGF. *Science*. 1986; 234(4781):1240-3.

Bayne JW. From life to death--the struggle between chemistry and biology during aging: the Maillard reaction as an amplifier of genomic damage. *Biogerontology*. 2000; 1(3):235-46.

Benatti BB, Neto JB, Casati MZ, Sallum EA, Sallum AW, Nociti FH Jr. Periodontal healing may be affected by aging: a histologic study in rats. *J Periodontal Res*. 2006; 41(4):329-33.

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A *et al*. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993; 4(2):197-250.

Blom S, Holmstrup P, Dabelsteen E. A comparison of the effect of epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, and fibroblast growth factor on rat periodontal ligament fibroblast-like cells' DNA synthesis and morphology. *J Periodontol*. 1994; 65(5):373-8.

Brewer G. Messenger RNA decay during aging and development. *Ageing Res Rev*. 2002; 1(4):607-25.

Bruce SA, Deamond SF. Longitudinal study of *in vivo* wound repair and *in vitro* cellular senescence of dermal fibroblasts. *Exp Gerontol*. 1991; 26(1):17-27.

Brunk UT, Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med*. 2002; 33(5):611-9.

Butcher SK, Chahal H, Nayak L, Sinclair A, Henriquez NV, Sapey E *et al*. Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans. *J Leukoc Biol*. 2001; 70(6):881-6.

Caffesse RG, Quinones CR. Polypeptide growth factors and attachment proteins in periodontal wound healing and regeneration. *Periodontol* 2000. 1993; (1):69-79.

Campisi J. Senescent cells, tumor suppression and organismal aging: good citizens bad neighbors. *Cell*. 2005; 120(4):513-22.

Carvalho-Filho ET, Alencar YMG. Teorias do envelhecimento. In: Netto MP, Carvalho-Filho ET, editores. *Geriatrics: Fundamentos, Clínica e Terapêutica*. São Paulo: Atheneu; 1994.p.1-8.

Chan GK, Duque G. Age-related bone loss: old bone, new facts. *Gerontology*. 2002; 48(2):62-71.

Cohen BJ, Danon D, Roth GS. Wound repair in mice as influenced by age and antimacrophage serum. *J Gerontol*. 1987; 42(3):295-301.

Cooke JW, Sarment DP, Whitesman LA, Miller SE, Jin Q, Lynch SE *et al*. Effect of rhPDGF-BB delivery on mediators of periodontal wound repair. *Tissue Eng*. 2006; 12(6):1441-50.

Chang Y, Ceacareanu B, Zhuang D, Zhang C, Pu Q, Ceacareanu AC *et al*. Counter-regulatory function of protein tyrosine phosphatase 1B in platelet-derived growth factor- or fibroblast growth factor-induced motility and proliferation of cultured smooth muscle cells and in neointima formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26(3):501-7.

Cohen SB, Crawley JB, Kahan MC, Feldmann M, Foxwell BM. Interleukin-10 rescues T cells from apoptotic cell death: association with an upregulation of Bcl-2. *Immunology*. 1997; 2(1):1-5.

Cree MG, Newcomer BR, Katsanos CS, Sheffield-Moore M, Chinkes D, Aarsland A *et al*. Intramuscular and liver triglycerides are increased in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(8):3864-71.

Cristofalo VJ, Lorenzini A, Allen RG, Torres C, Tresini M. Replicative senescence: a critical review. *Mech Ageing Dev*. 2004; 125(10/11):827-48.

Daluiski A, Engstrand T, Bahamonde ME, Gamer LW, Agius E, Stevenson SL *et al*. Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat Genet*. 2001; 27(4): 84–8.

De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflamm-ageing and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Lett*. 2005; 579(10):2035-9.

Edge Jr, Millard FJ, Reid L, Simon G. The radiographic appearances of the chest in persons of advanced age. *Br J Radiol*. 1964; 37:769-74.

Engeland CG, Bosch JA, Cacioppo JT, Marucha PT. Mucosal wound healing: the roles of age and sex. *Arch Surg*. 2006; 141(12):1193-7

Ermini M. Ageing changes in mammalian skeletal muscle: biochemical studies. *Gerontology*. 1976; 22(4):301-16.

Escoffier C, de Rigal J, Rochefort A, Vasselet R, Leveque JL, Agache PG. Age-related mechanical properties of human skin: an in vivo study. *J Invest Dermatol.* 1989; 93(3):353-7.

Ferrara N, Gerber HP. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol.* 2001; 106(4):148-56.

Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E *et al.* Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 908:244-54.

Fulop T, Larbi A, Douziech N, Levesque I, Varin A, Herbein G. Cytokine receptor signalling and aging. *Mech Ageing Dev.* 2006; 127(6):526-37.

Garcia GG, Miller RA. Single-cell analyses reveal two defects in peptide-specific activation of naïve T cells from aged mice. *J Immunol.* 2001; 166(5):3151-7.

Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ *et al.* Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21(1):12-20.

Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2004; 35(2): 21-41.

Globus RK, Plouet J, Gospodarowicz D. Cultured bovine bone cells synthesize basic fibroblast growth factor and store it in their extracellular matrix. *Endocrinology.* 1989; 124(3):1539-47.

Gniadecka M, Gniadecki R, Serup J, Sondergaard J. Ultrasound structure and digital image analysis of the subepidermal low echogenic band in aged human skin: diurnal changes and interindividual variability. *J Invest Dermatol.* 1994; 102(3):362-5.

Goseki T, Shimizu N, Iwasawa T, Takiguchi H, Abiko Y. Effects of *in vitro* cellular aging on alkaline phosphatase, cathepsin activities and collagen secretion of human periodontal ligament derived cells. *Mech Ageing Dev.* 1996; 91(3):171-83.

Gospodarowicz D, Massoglia S, Cheng J, Fujii DK. Effect of retina-derived basic and acidic fibroblast growth factor and lipoproteins on the proliferation of retina-derived capillary endothelial cells. *Exp Eye Res.* 1986; 43(3):459-76.

Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol.* 2003; 13(5):264-9.

Haim G, Baumgartel R. Age-related changes in the periodontium. *Dtsch Zahnarztl Z.* 1968; 23(3):340-4.

Halasz NA. Dehiscence of laparotomy wounds. *Am J Surg.* 1968; 116(2):210-4.

Hardman MJ, Waite A, Zeef L, Burow M, Nakayama T, Ashcroft GS. Macrophage migration inhibitory factor: a central regulator of wound healing. *Am J Pathol*. 2005; 167(6):1561-74.

Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1965; 37(3):614-36.

Herndon LA, Schmeissner PJ, Dudaronek JM, Brown PA, Listner KM, Sakano Y *et al*. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C.elegans*. *Nature*. 2002; 419(6909):808-14.

Herrick S, Ashcroft G, Ireland G, Horan M, McCollum C, Ferguson M. Up-regulation of elastase in acute wounds of healthy aged humans and chronic venous leg ulcers are associated with matrix degradation. *Lab Invest*. 1997; 77(3):281-8.

Holm-Pedersen P, Folke LE, Gawronski TH. Composition and metabolic activity of dental plaque from healthy young and elderly individuals. *J Dent Res*. 1980; 59(5):771-6.

Holm-Pedersen P, Loe H. Wound healing in the gingiva of young and old individuals. *Scand J Dent Res*. 1971; 79(1):40-53.

Hughes VA, Roubenoff R, Wood M, Frontera WR, Evans WJ, Fiatarone Singh MA. Anthropometric assessment of 10-y changes in body composition in the elderly. *Am J Clin Nutr*. 2004; 80(2):475-82.

Hull MT, Warfel KA. Age-related changes in the cutaneous basal lamina: scanning electron microscopic study. *J Invest Dermatol*. 1983; 81(4):378-80.

Iiyama M, Shimada Y, Kita T, Ito H. Effect of aging on macrophage adherence to extracellular matrix proteins. *Mech Ageing Dev*. 1992; 66(2):149-58.

Ive JC, Shapiro PA, Ivey JL. Age-related changes in the periodontium of pigtail monkeys. *J Periodontal Res*. 1980; 15(4):420-8.

Jacob-Filho W, Souza RR. Anatomia e Fisiologia do Envelhecimento. In: Netto MP, Carvalho-Filho ET, editores. *Geriatrics: Fundamentos, Clínica e Terapêutica*. São Paulo: Atheneu. 1994. p.31-40.

Jager A. Histomorphometric study of age-related changes in remodelling activity of human desmodontal bone. *J Anat*. 1996; 189 (Pt 2):257-64.

Janssens JP, Pache JC, Nicod LP. Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur Respir J*. 1999; 13(1):197-205.

Ju YJ, Lee KH, Park JE, Yi YS, Yun MY, Ham YH *et al*. Decreased expression of DNA repair proteins Ku70 and Mre11 is associated with aging and may contribute to the cellular senescence. *Exp Mol Med*. 2006; 38(6):686-93.

Karin M. Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcription factors. *Curr Opin Cell Biol.* 1994; (6):415–24.

Karring T, L  e H. The effect of age on mitotic activity in rat oral epithelium. *J Periodontal Res.* 1973; 8(3):164-70.

Khorramizadeh MR, Tredget EE, Telasky C, Shen Q, Ghahary A. Aging differentially modulates the expression of collagen and collagenase in dermal fibroblasts. *Mol Cell Biochem.* 1999; 194(1/2):99-108.

Kleinberg I, Chatterjee R, Kaminsky FS, Cross HG, Goldenberg DJ, Kaufman HW. Plaque formation and the effect of age. *J Periodontol.* 1971; 42(8):497-507.

Kloss FR, Gassner R. Bone and aging: effects on the maxillofacial skeleton. *Exp Gerontol.* 2006; 41(2):123-9.

Knott L, Bailey AJ. Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone.* 1998; 22(3):181-7.

Kondo H, Nomaguchi TA, Yonezawa Y. Effects of serum from human subjects of different ages on migration *in vitro* of human fibroblasts. *Mech Ageing Dev.* 1989; 47(1):25-37.

Korn RR. Aging and cell division. *Science.* 1975; 187:203-4.

Kornman KS, Robertson PB. Fundamental principles affecting the outcomes of therapy for osseous lesions. *Periodontol 2000.* 2000; 22(2):22-43.

Kramer RH, Fuh GM, Bensch KG, Karasek MA. Synthesis of extracellular matrix glycoproteins by cultured microvascular endothelial cells isolated from the dermis of neonatal and adult skin. *J Cell Physiol.* 1985; 123(1):1-9.

Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation.* 2003; 107(2):346-54.

LaVallee TM, Prudovsky IA, McMahon GA, Hu X, Maciag T. Activation of the MAP kinase pathway by FGF-1 correlates with cell proliferation induction while activation of the Src pathway correlates with migration. *Cell Biol.* 1998; 141(7):1647-58.

Lee W, McCulloch CA. Deregulation of collagen phagocytosis in aging human fibroblasts: effects of integrin expression and cell cycle. *Exp Cell Res.* 1997; 237(2):383-93.

Lexell J, Sjostrom M, Nordlund AS, Taylor CC. Growth and development of human muscle: a quantitative morphological study of whole vastus lateralis from childhood to adult age. *Muscle Nerve.* 1992; 15(3):404-9.

Lindsey ML, Goshorn DK, Squires CE, Escobar GP, Hendrick JW, Mingoia JT *et al.* Age-dependent changes in myocardial matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase profiles and fibroblast function. *Cardiovasc Res.* 2005; 66(2):410-9.

Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. Interactive effect of interleukin-6 and prostaglandin E2 on osteoclastogenesis via the OPG/RANKL/RANK system. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1068:225-33.

Lo J, Hurta RA. Over-expression of K-FGF or bFGF results in altered expression of matrix metalloproteinases: correlations with malignant progression and cellular invasion. *Cell Biol Int.* 2002; 26(4):319-25.

Löe H, Anerud A, Boysen H, Smith M. The natural history of periodontal disease in man. The rate of periodontal destruction before 40 years of age. *J Periodontol.* 1978; 49(12):607-20.

Lynch SE, de Castilla GR, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH, Reddy MS *et al.* The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol.* 1991; 62(7):458-68.

Malemud CJ. Growth hormone, VEGF and FGF: involvement in rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta.* 2007; 375(1/2):10-9.

Mammone T, Gan D, Foyouzi-Youssefi R. Apoptotic cell death increases with senescence in normal human dermal fibroblast cultures. *Cell Biol Int.* 2006; 30(11):903-9.

Marcotte R, Lacelle C, Wang E. Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3. *Mech Ageing Dev.* 2004; 125(10/11):777-83.

Matsson L. Development of gingivitis in pre-school children and young adults. A comparative experimental study. *J Clin Periodontol.* 1978; 5(1):24-34.

Mayahara K, Yasuko K, Takimoto K, Suzuki N, Mitsui N, Shimizu N. Aging stimulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E₂ production in human periodontal ligament cells after the application of compressive force. *J Periodont Res.* 2007; 42(1):8-14.

Mazziotti G, Amato G, Sorvillo F, Piscopo M, Rizzo MR, Lalli E *et al.* Increased serum osteoprotegerin values in long-lived subjects: different effects of inflammation and bone metabolism. *Eur J Endocrinol.* 2006; 154(3):373-7.

McCulloch CA, Melcher AH. Cell migration in the periodontal ligament of mice. *J Periodontal Res.* 1983; 18(4):339-52.

Mochizuki K, Yamaguchi M, Abiko Y. Enhancement of LPS-stimulated plasminogen activator production in aged gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 1999; 34(5):251-60.

Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K *et al.* Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. J Periodontal Res. 2003; 38(1):97-103.

Muggleton-Harris AL, Reisert PS, Burghoff RL. *In vitro* characterization of response to stimulus (wounding) with regard to ageing in human skin fibroblasts. Mech Ageing Dev. 1982; 19(1):37-43.

Myhre LG, Kessler WV. Body density and potassium 40 measurements of body composition as related to age. J Appl Physiol. 1966; 21(4):1251-5.

Nishimura F, Terranova VP, Braithwaite M, Orman R, Ohyama H, Mineshiba J *et al.* Comparison of *in vitro* proliferative capacity of human periodontal ligament cells in juvenile and aged donors. Oral Dis. 1997; 3(3):162-6.

Nohutcu RM, McCauley LK, Koh AJ, Somerman MJ. Expression of extracellular matrix proteins in human periodontal ligament cells during mineralization *in vitro*. J Periodontol. 1997; 68(4):320-7.

Oehmke MJ, Schramm CR, Knolle E, Frickey N, Bernhart T, Oehmke HJ. Age-dependent changes of the periodontal ligament in rats. Microsc Res Tech. 2004; 63(4):198-202.

Ogura N, Shibata Y, Kamino Y, Matsuda U, Hayakawa M, Oikawa T *et al.* Stimulation of interleukin-6 production of periodontal ligament cells by Porphyromonas endodontalis lipopolysaccharide. Biochem Med Metab Biol. 1994; 53(2):130-6.

Ohi T, Uehara Y, Takatsu M, Watanabe M, Ono T. Hypermethylation of CpGs in the promoter of the COL1A1 gene in the aged periodontal ligament. J Dent Res. 2006; 85(3):245-50.

Okamura H, Yamaguchi M, Abiko Y. Enhancement of lipopolysaccharide-stimulated PGE2 and IL-1beta production in gingival fibroblast cells from old rats. Exp Gerontol. 1999; 34(3):379-92.

Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell. 1993; 74(4):609-19.

Ong SH, Hadari YR, Gotoh N, Guy GR, Schlessinger J, Lax I. Stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by fibroblast growth factor receptors is mediated by coordinated recruitment of multiple docking proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98(11):6074-9.

Papic M, Glickman I. Keratinization of the human gingiva in the menstrual cycle and menopause. Oral Surg Oral Med Oral Path. 1950; 42(3):504-51.

Paunio K. The age change of acid mucopolysaccharides in the periodontal membrane of man. J Periodontal Res. 1969; 45(4):32-3.

Pawelec G, Hirokawa K, Fulop T. Altered T cell signalling in ageing. Mech Ageing Dev. 2001; 122(14):1613-37.

Pienta KJ, Coffey DS. Characterization of the subtypes of cell motility in ageing human skin fibroblasts. *Mech Ageing Dev.* 1990; 56(2):99-105.

Pieraggi MT, Bouissou H, Angelier C, Uhart D, Magnol JP, Kokolo J. Le fibroblast. *Ann Pathol.* 1985; 5(2):65-76.

Pintucci G, Yu PJ, Sharony R, Baumann FG, Saponara F, Frasca A *et al.* Induction of stromelysin-1 (MMP-3) by fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in FGF-2-/- microvascular endothelial cells requires prolonged activation of extracellular signal-regulated kinases-1 and -2 (ERK-1/2). *J Cell Biochem.* 2003; 9(5):1015-25.

Popowics T, Foster BL, Swanson EC, Fong H, Somerman MJ. Defining the roots of cementum formation. *Cells Tissues Organs.* 2005; 181(3/4):248-57.

Polkey MI, Harris ML, Hughes PD, Hamnegard CH, Lyons D, Green M *et al.* The contractile properties of the elderly human diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 155(5):1560-4.

Proctor DN, Joyner MJ. Skeletal muscle mass and the reduction of VO₂max in trained older subjects. *J Appl Physiol.* 1997; 82(5):1411-5.

Pulsatelli L, Dolzani P, Silvestri T, Caraceni P, Facchini A, Ravaglia G *et al.* Soluble receptor activator of nuclear factor- κ B Ligand (sRANKL)/osteoprotegerin balance in ageing and age-associated diseases. *Biogerontology.* 2004;5(2):119-27.

Qiu S, Rao DS, Palnitkar S, Parfitt AM. Age and distance from the surface but not menopause reduce osteocyte density in human cancellous bone. *Bone.* 2002; 31(2):313-8.

Rahimi F, Hsu K, Endoh Y, Geczy CL. FGF-2, IL-1 β and TGF- β regulate fibroblast expression of S100A8. *FEBS J.* 2005; 272(11):2811-27.

Reddi AH, Cunningham NS. Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *J Bone Miner Res.* 1993; 8(12):499-502.

Reed MJ, Edelberg JM. Impaired angiogenesis in the aged. *Sci Aging Knowledge Environ.* 2004; 18(7):7-15.

Reed MJ, Ferara NS, Vernon RB. Impaired migration, integrin function, and actin cytoskeletal organization in dermal fibroblasts from a subset of aged human donors. *Mech Ageing Dev.* 2001; 122(11):1203-20.

Riggs BL, Melton LJ 3rd, Robb RA, Camp JJ, Atkinson EJ, Peterson JM *et al.* Population-based study of age and sex differences in bone volumetric density, size, geometry, and structure at different skeletal sites. *J Bone Miner Res.* 2004; 19(12):1945-54.

Robbins S. Tissue repair and regeneration. In: Kumar V, Fausto N, Abbas A. Pathologic Basis of Disease. Philadelphia :W.B. Sanders; 1999. p.89-112.

Ryan EJ, Toto PD, Gargiulo AW. Aging in human attached gingival epithelium. J Dent Res. 1974; 53(1):74-6.

Sasaki M, Kumazaki T, Takano H, Nishiyama M, Mitsui Y. Senescent cells are resistant to death despite low Bcl-2 level. Mech Ageing Dev. 2001; 122(15):1695-706.

Sashima M, Satoh M, Suzuki A. Age-related development of the long-junctional epithelium in the senescence-accelerated mouse. J Dent Res. 1991; 70(11):1462-6.

Sawa Y, Phillips A, Hollard J, Yoshida S, Braithwaite MW. Impairment of osteocalcin production in senescent periodontal ligament fibroblasts. Tissue Cell. 2000; 32(2):198-204.

Sawa Y, Yamaoka Y, Kuroshima S, Yoshida S. Reduction of alkaline phosphatase activity in aged human osteogenic periodontal ligament fibroblasts exhibiting short telomeres. Cell Tissue Res. 2004; 315(3):331-7.

Schlessinger D, Van Zant G. Does functional depletion of stem cells drive aging? Mech Ageing Dev. 2001; 122(14):1537-53.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J *et al.* Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet. 2004; 364(9429):149-55.

Severson JA, Moffett BC, Kokich V, Selipsky H. A histologic study of age changes in the adult human periodontal joint (ligament). J Periodontol. 1978; 49(4):189-200.

Shiba H, Nakanishi K, Sakata M, Fujita T, Uchida Y, Kurihara H. Effects of ageing on proliferative ability, and the expressions of secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC) and osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human periodontal ligament cells. Mech Ageing Dev. 2000; 117(1/3):69-77.

Shimazu A, Morishita M. Basic fibroblast growth factor induces the expression of matrix metalloproteinase-3 in human periodontal ligament cells through the MEK2 mitogen-activated protein kinase pathway. J Periodontal Res. 2003; 38(2):122-9.

Shklar G. The effects of aging upon oral mucosa. J Invest Dermatol. 1966; 47(2):115-20.

Sims MR, Leppard PI, Sampson WJ, Dreyer CW. Microvascular luminal volume changes in aged mouse periodontal ligament. J Dent Res. 1996; 75(7):1503-11.

Silverman EM, Silverman AG. Granulocyte adherence in the elderly. Am J Clin Pathol. 1977; 67(1):49-52.

Solmi R, Tietz C, Zucchini C, Gualandi G, Pagnaloni A, Talassi O *et al.* *In vitro* study of gingival fibroblasts from normal and inflamed tissue: age-related responsiveness. *Mech Ageing Dev.* 1996; 92(1):31-41.

Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts *in vitro*. *J Dent Res.* 1988 ; 67(1):66-70.

Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 928:22-38.

Stahl SS, Tonna EA. H3-proline study of aging periodontal ligament matrix formation: comparison between matrices adjacent to either cemental or bone surfaces. *J Periodontal Res.* 1977; 12(4):318-22.

Stachowiak EK, Maher PA, Tucholski J, Mordechai E, Joy A, Moffett J *et al.* Nuclear accumulation of fibroblast growth factor receptors in human glial cells--association with cell proliferation. *Oncogene.* 1997; 14(18):2201-11.

Swift ME, Burns AL, Gray KL, DiPietro LA. Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *J Invest Dermatol.* 2001; 117(5):1027-35.

Takatsu M, Uyeno S, Komura J, Watanabe M, Ono T. Age-dependent alterations in RNAm level and promoter methylation of collagen $\alpha 1(I)$ gene in human periodontal ligament. *Mech Ageing Dev.* 1999; 110(1/2):37-48

Takayama S, Murakami S, Miki Y, Ikezawa K, Tasaka S, Terashima A *et al.* Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 1997; 32: 667–75.

Takayama S, Murakami S, Nozaki T, Ikezawa K, Miki Y, Asano T *et al.* Expression of receptors for basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 1998; 33(6):315-22.

Takayama S, Murakami S, Shimabukuro Y, Kitamura M, Okada H. Periodontal Regeneration by FGF-2 (bFGF) in primate models. *J Dent Res.* 2001; 80(12):2075-9.

Ten Cate AR. The fibroblast and its products. In: Ten Cate AR. *Oral histology: development, structure and function.* Toronto: C.V.Mosby; 1989. p.90-105.

Thomas KA, Giménez-Gallego G. Fibroblast growth factors: broad spectrum mitogens with potent angiogenic activity. *Trends Biochem Sci.* 1986; 5(11): 81-6.

Tolino MA, Wilkin JK. Aging and cutaneous vascular thermoregulation responses. *J Invest Dermatol.* 1988; 90(3):613.

Tonna EA, Stahl SS. A (3H)-thymidine autoradiographic study of cell proliferative activity of injured parodontal tissues of 5-week-old mice. Arch Oral Biol. 1973; 18(5):617-27.

Toto PD, Borg M. Effect of age changes on the premitotic index in the periodontium of mice. J Dent Res. 1968; 47(3):70-3.

Tschudi MR, Luscher TF. Age and hypertension differently affect coronary contractions to endothelin-1, serotonin, and angiotensins. Circulation. 1995; 91(9):2415-22.

Van de Kerkhof PC, Van Bergen B, Spruijt K, Kuiper JP. Age-related changes in wound healing. Clin Exp Dermatol. 1994; 19(5):369-74.

Van der Velden U, Abbas F, Hart AA. Experimental gingivitis in relation to susceptibility to periodontal disease.(I) Clinical observations. J Clin Periodontol. 1985; 12(1):61-8.

Van der Velden U. Effect of age on the periodontium. J Clin Periodontol. 1984; 11(5):281-94.

Von Wowern N. General and oral aspects of osteoporosis: a review. Clin Oral Investig. 2001; 5(2):71-82.

Waller JM, Maibach HI. Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure. Skin Res Technol. 2006; 12(3):145-54.

Wakikawa A, Utsuyama M, Hirokawa K. Altered expression of various receptors on T cells in young and old mice after mitogenic stimulation: a flow cytometric analysis. Mech Ageing Dev. 1997; 94(3):113-22.

Wentz FM, Maier AW, Orban B. Age changes and sex differences in the clinically normal gingiva. J Periodontol. 1952; 23(2):13-25.

Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic proteins. In: Mundy GR, Martin TJ. Physiology and Pharmacology of Bone. Berlin: Springer-Verlag, 1993. p.725-48.

Yamada S, Ozawa Y, Tomoeda M, Matoba R, Matsubara K, Murakami S. Regulation of PLAP-1 expression in periodontal ligament cells. J Dent Res. 2006; 85(5):447-51.

Yin D, Chen K. The essential mechanisms of aging: Irreparable damage accumulation of biochemical side-reactions. Exp Gerontol. 2005; 40(6):455-65.

Zavala WD, Cavicchia JC. Deterioration of the Langerhans cell network of the human gingival epithelium with aging. Arch Oral Biol. 2006; 51(12):1150-5.

Zittermann SI, Issekutz AC. Basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF-2) potentiates leukocyte recruitment to inflammation by enhancing endothelial adhesion molecule expression. *Am J Pathol.* 2006; 168(3):835-46.

ANEXO

Figura 17 - Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

CEP/FOP - Sistema On-Line

Processos

[Menu Principal](#) [Encerrar Sessão](#)

Protocolo nº 198/2004

Título: **Influência do fator idade na modulação da resposta de células do ligamento periodontal induzida pelo fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF)**

Pesquisador Responsável: **BRUNO BRAGA BENATTI**

Demais Pesquisadores: **FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JUNIOR.**

Área: **PERIODONTIA**

Faculdade: **FOP**

Instituição: **UNICAMP**

[Clique aqui para ver o Parecer](#) [Clique aqui para ver a Avaliação dos Itens do Protocolo](#)

HISTÓRICO:

Data	Tramite	Retorno	Parecer
23/02/2005	ARQUIVAMENTO DO PROTOCOLO	23/02/2005	APROVADO
17/02/2005	EMISSION DO CERTIFICADO	17/02/2005	APROVADO
16/02/2005	AVALIAÇÃO PELO COMITÊ	16/02/2005	APROVADO
25/01/2005	AVALIAÇÃO PELA COORDENADORIA	25/01/2005	APROVADO
19/01/2005	AVALIAÇÃO PELO RELATOR	21/01/2005	APROVADO
14/12/2004	MANIFESTAÇÃO DO PESQUISADOR	19/01/2005	PENDÊNCIAS LEVES
03/12/2004	AVALIAÇÃO PELA COORDENADORIA	03/12/2004	PENDÊNCIAS LEVES
22/11/2004	AVALIAÇÃO PELO RELATOR	30/11/2004	PENDÊNCIAS LEVES

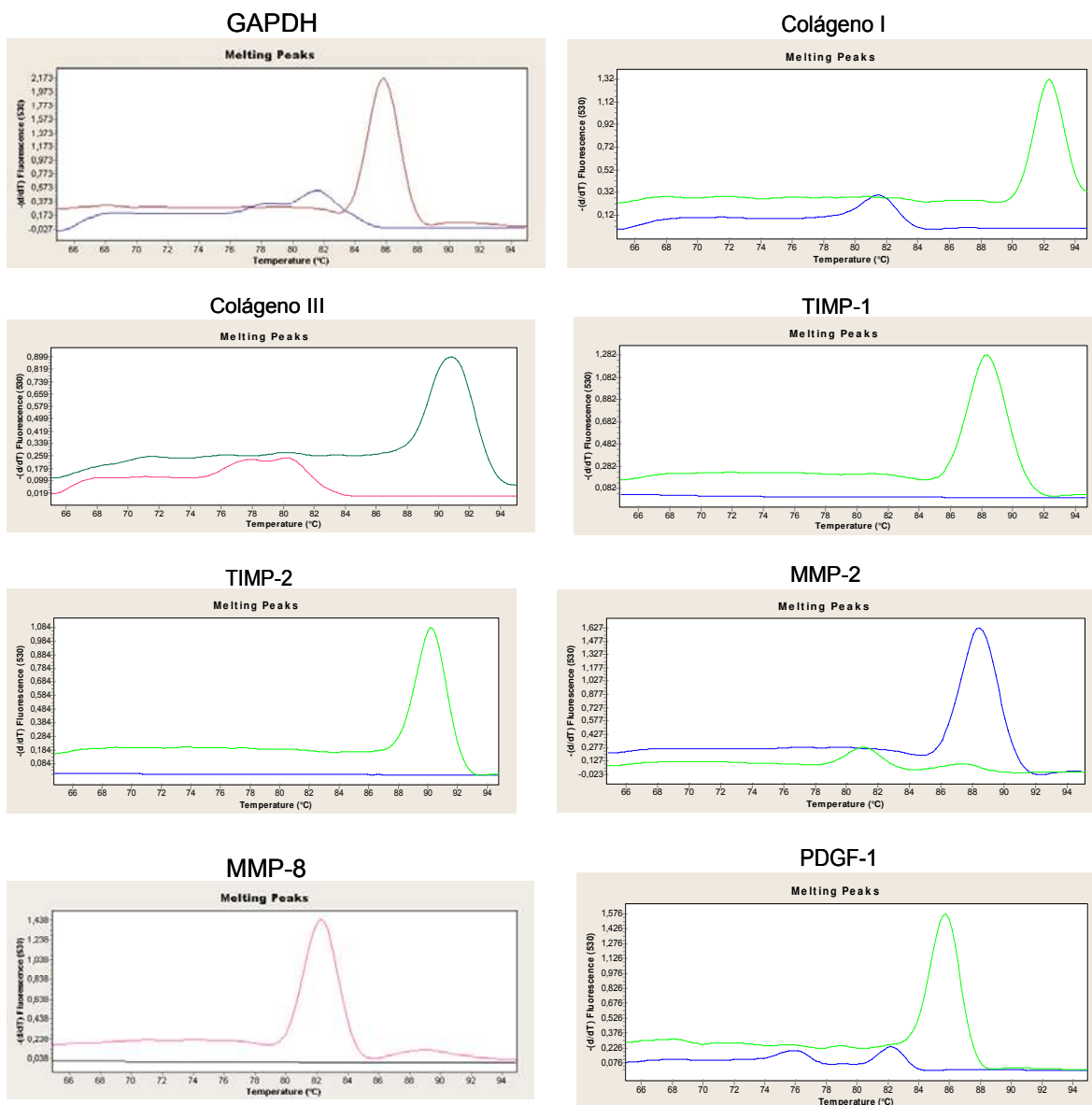
[Processos](#) [Menu Principal](#) [Encerrar Sessão](#)

Informática/FOP

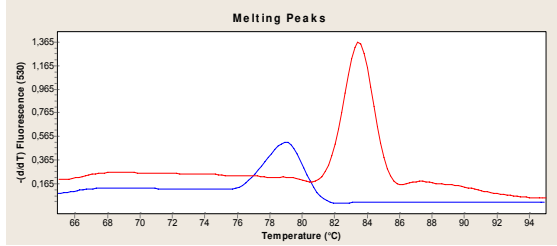
26/04/2007 - 14:40

APÊNDICE

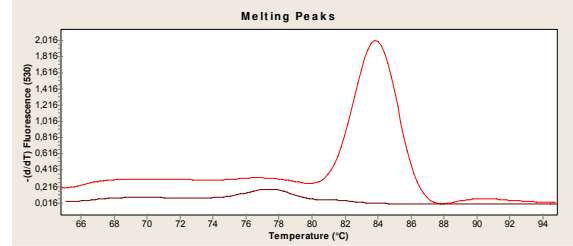
Figura 18 - Gráficos ilustrativos das curvas de melting referentes aos genes avaliados. Os gráficos ilustram as melhores condições obtidas para cada gene e o seu respectivo controle negativo (água livre de nucleotídeos).



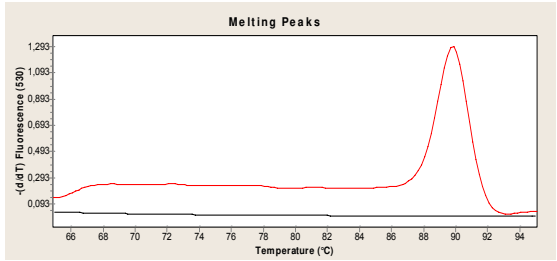
RANKL



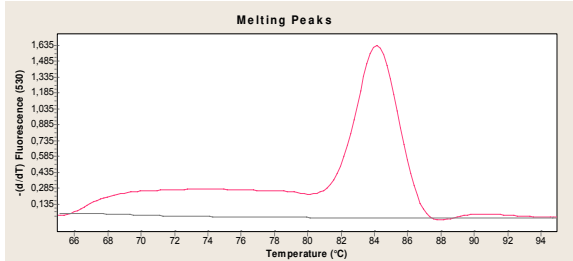
OPG



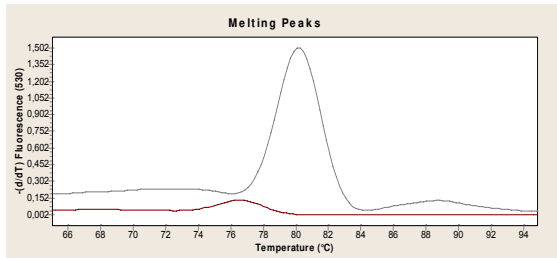
IL-4



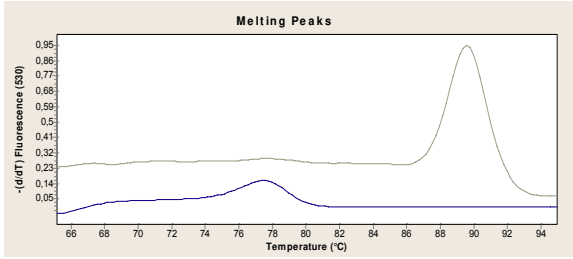
IL-6



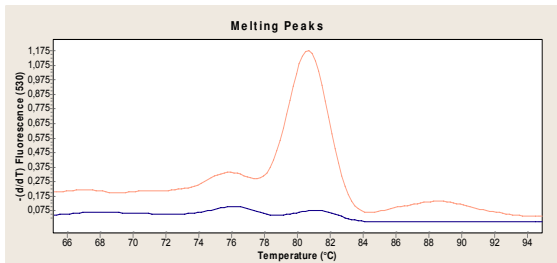
IL-8



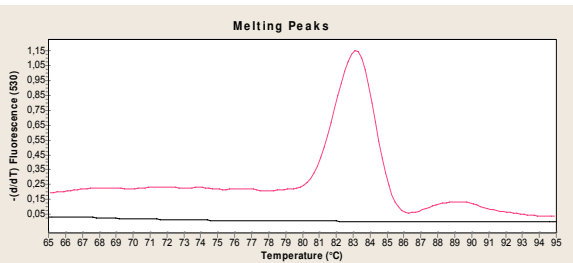
FGFR1



bFGF



BMP-3



IL-1 β

