



Cristiane Ribeiro Salmon

Cirurgiã-Dentista  
Especialista em Periodontia  
Mestre em Biologia Buco-Dental



**EXPRESSÃO DE COLÁGENO TIPO I, MMP-2, MMP-8, MMP-14 E  
TIMPS NO LIGAMENTO PERIODONTAL DE INCISIVOS DE RATOS  
EM CONDIÇÕES FUNCIONAIS NORMAL E ALTERADAS.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Biologia Buco-Dental, Área de Histologia e Embriologia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes

Piracicaba  
2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8<sup>a</sup>. / 6159

Sa35e Salmon, Cristiane Ribeiro.  
Expressão de colágeno tipo I, MMP-2, MMP-8, MMP-14 e TIMPs no ligamento periodontal de incisivos de ratos em condições funcionais normal e alteradas. / Cristiane Ribeiro Salmon. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2008.

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

1. Expressão gênica. 2. Metaloproteinase. 3. Periodonto. 4. Hibridização *in situ*. 5. Reação em cadeia de polimerase. I. Novaes, Pedro Duarte. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Expression of type I collagen, MMP-2, MMP-8, MMP-14 and TIMPs in the periodontal ligament of rat incisors in normal and altered functional conditions

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Gene expression. 2. Metalloproteinase. 3. Periodontium. 4. *In situ* hybridization. 5. Polymerase Chain Reaction

Área de Concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Antônio Wilson de Almeida, José Merzel, Pedro Duarte Novaes, Sérgio Roberto Peres Line, Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

Data da Defesa: 26-02-2008

Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 26 de Fevereiro de 2008, considerou a candidata CRISTIANE RIBEIRO SALMON aprovada.

---

PROF. DR. PEDRO DUARTE NOVAES

---

PROF. DR. ANTONIO WILSON DE ALMEIDA

---

PROFa. DRa. RAQUEL MANTUANELI SCAREL CAMINAGA

---

PROF. DR. SERGIO ROBERTO PERES LINE

---

PROF. DR. JOSÉ MERZEL

*Aos meus queridos pais, Adolfo e Nadyr, e ao meu irmão Douglas, que mesmo à distância me apoiaram com carinho e amor em todos os momentos, dedico este trabalho.*

### ***Agradecimento especial***

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes por todos os ensinamentos, pela confiança em mim depositada e o apoio nos momentos difíceis. Agradeço pela condução deste trabalho e pela amizade.*

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP), na pessoa do seu diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, pela utilização de suas instalações.

Ao Prof. Dr. Mário Alexandre Coelho Sinhoreti, Coordenador Geral dos Cursos de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Fausto Bérzin, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da FOP/UNICAMP, por sua amizade e pela seriedade na condução do Curso.

Aos professores da área de Histologia da FOP-UNICAMP, Profa. Dra. Darcy de Oliveira Tosello e Prof. Sérgio Roberto Peres Line, pelos ensinamentos e agradável convívio.

Ao Prof. Dr. José Merzel, pelo exemplo como cientista, pelo inestimável apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Junior da área de Periodontia FOP-UNICAMP, pela grande colaboração na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Joy M. Richman da University of British Columbia em Vancouver, Canadá, pela colaboração na realização da técnica de hibridização *in situ*, pela recepção em seu laboratório e pelos ensinamentos.

Aos colegas do laboratório do departamento Oral Health Sciences, UBC, Vancouver, Katherine Fu, Gregory Handrigan, Marcela Butchova, Heather Szabo, Cheryl Whiting, Norihisa Higashihori e Arthur Sampaio pela amizade e agradável convivência no laboratório.

À Érica Alessandra Pinho Sinhoreti, Raquel Q. M. César Sacchi e Tatiane Cristina Gava, secretárias da Coordenadoria de Pós-Graduação da FOP-

UNICAMP, pelas orientações em todas as questões de burocracia durante o curso e pelo apoio.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da FOP-UNICAMP, especialmente, Marisi Aidar, Juliana Santos Neves, Alexandre Espírio Santo, Nádia Omar, José Rosa, Maria Cristina Godoy, Cristiane Borges, Daniel Saito, Liza Lima, Marcos Frozoni, Marcelo Rocha Marques, pelo companheirismo e pela amizade.

À Eliene Aparecida Orsini Narvaes, Maria Aparecida Varela, Ivani Odas Demétrio e Gustavo Narvaes Guimarães, funcionários do Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP, pelo auxílio técnico no laboratório de Histologia e divertido convívio.

À Suzete Regina Tobias Neder e Joelma Aparecida Machi, pela atenção junto à secretaria do Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão do auxílio à pesquisa (processo nº 04/15401-1) que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche (PDEE), que contribuiu de forma importante para a realização deste trabalho e pela oportunidade de aprendizado no exterior.

## RESUMO

O ligamento periodontal de incisivos de ratos é um tecido conjuntivo com a função de ancoragem, suporte do dente e provável papel na erupção dental. Esse tecido possui um alto grau de remodelação, cujo colágeno tipo I (Col-1) é um dos seus componentes principais. As metaloproteinasas (MMPs) são enzimas que estão presentes no ligamento periodontal e degradam quase todos os constituintes da matriz extracelular. Alterações nas condições funcionais do dente podem provocar mudanças no metabolismo das células do ligamento, modificando o balanço entre a síntese das proteínas da matriz extracelular e a degradação pelas MMPs. O objetivo desse estudo é quantificar a expressão de mRNA de Col-1, MMP-2, MMP-8, MMP-14, TIMP-1 e TIMP-2, identificar as células que expressam esses mRNAs e a localizar as proteínas no ligamento periodontal de incisivos de ratos submetidos a condições funcionais alteradas experimentalmente. Ratos Lewis machos foram utilizados, subdivididos em 4 grupos de acordo com as seguintes condições funcionais a que os incisivos inferiores foram submetidos por um período de 7 e 14 dias: normofuncional, hiperfuncional, hipofuncional e erupção contida. Os incisivos foram extraídos e o ligamento periodontal coletado por meio de leve raspagem de suas superfícies distal, lingual e mesial. Após a extração do RNA total e a síntese de cDNA, foi feita a quantificação relativa por PCR em Tempo Real. Para a localização do mRNA e das proteínas de interesse no ligamento periodontal foram utilizadas as técnicas de hibridização *in situ* e imunohistoquímica, utilizando-se 5 ratos para cada condição funcional e por período. Decorridos os tempos os animais foram sacrificados, tiveram as hemimandíbulas removidas, fixadas e processadas para a obtenção de cortes histológicos transversais. A análise da expressão gênica mostrou uma redução nos níveis de mRNA para o Col-1, MMPs e TIMPs em todos os grupos experimentais quando comparados ao normofuncional. Redução significativa foi encontrada nos grupos tratados por 7 dias, e houve aumento dos níveis de mRNA aos 14 dias para os genes estudados.

Aumento significativo nos níveis de mRNA ( $p < 0,05$ ) foi encontrado somente para MMP-2 no grupo hipofuncional por 7 dias. A redução ( $p < 0,05$ ) dos níveis de MMP-8 no grupo contido por 7 e 14 dias parece estar relacionada ao aumento do inibidor TIMP-1. As MMPs e TIMPs citadas foram localizadas no ligamento periodontal e os resultados sugerem que esses genes são expressos por fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos e osteoclastos. O Col-1 foi imunolocalizado no ligamento periodontal na região junto ao osso alveolar, enquanto a TIMP-2 estava mais concentrada na região adjacente ao dente. Os resultados sugerem que as alterações nas condições funcionais dos incisivos de rato provocam uma modificação no metabolismo do ligamento periodontal pelas mudanças nos níveis de expressão de Col-1, MMPs e TIMPs, ocorrendo picos de aumento ou redução da expressão com tendência de retorno à normalidade. O balanço entre a produção de Col-1, MMPs e TIMPS parece ter um importante papel no controle da taxa de erupção dos incisivos de ratos.

Palavras-chave: Ligamento periodontal, condições funcionais alteradas, expressão gênica, metaloproteinases, inibidores de metaloproteinases.

## ABSTRACT

Periodontal ligament is a connective tissue that provides anchorage and support to the tooth, and it has a probable role in the tooth eruption. The extracellular matrix consists predominantly of collagen type I (Col-1) and the turnover of collagen fibers is intense. Matrix metalloproteinases (MMPs) are members of a family of enzymes capable to degrade almost all components of the extracellular matrix. They are present in the periodontal ligament. It is supposed that tooth functional conditions alterations may promote changes in the metabolism of periodontal ligament cells, modifying the balance between the synthesis of extracellular matrix proteins and their degradation by MMPs. The aim of the present study is to quantify the levels of mRNA of Col-1, MMP-2, MMP-8, MMP-14, TIMP-1 and TIMP-2, identify the cells expressing these mRNA and locate these proteins in the periodontal ligament of rat incisors submitted to altered functional conditions. Lewis male rats were randomly assigned to 4 groups and their lower incisors were submitted to different functional conditions: normofunctional, hipofunctional, hiperfunctional and restraint, during 7 or 14 days. The teeth were extracted and the periodontal ligament was collected by gently scaling of the distal, lingual and mesial tooth surface. Total RNA was extracted and the synthesis of the cDNA was performed for Relative PCR Quantification. *In situ* hybridization and immunohistochemistry were performed to detect the cell expression and the proteins localization in the periodontal ligament. Five rats for each functional condition were sacrificed after 7 and 14 experimental days. The rat hemimandibles were removed for histological processing to obtain 3 $\mu$ m transversal sections. Analysis of the expression of Col-1, MMPs and TIMPs showed a down-regulation for all genes in the groups studied in relation to the normofunctional group. Significant down-regulation ( $p < 0,05$ ) was found in the groups treated during 7 days, and increased levels of mRNA was related to 14 days of treatment. Significant increased levels of mRNA ( $p < 0,05$ ) were found only for MMP-2 to the

hipofunctional group at 7 days. Reduction ( $p < 0,05$ ) of the levels of mRNA for MMP-8 in the restraint group at 7 and 14 days seems to be related to the increased levels of its inhibitor, TIMP-1. MMPs and TIMPs were found been expressed in the periodontal ligament by fibroblasts, cementoblasts, osteoblasts and osteoclasts. Col-1 was localized at the region adjacent to the alveolar bone, whereas TIMP-2 was concentrated adjacent to the tooth region of the periodontal ligament. The results obtained suggest that the alterations on the functional conditions of the rat incisors produce changes in the metabolism of the periodontal ligament tissue by changing the levels of COL-1, MMPs and TIMPs. Up-regulation peaks or down-regulation peaks seem to be conduced to the normal levels of expression along the experimental time. The balance between production of Col-1, MMPs and TIMPs may have an important role in the control of the eruption rate of rat incisors.

**Key Words:** Periodontal ligament, altered tooth function conditions, gene expression, metalloproteinases, metalloproteinase inhibitors.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<sup>35</sup> S-UTP	- Sulfur-35 Uridine triphosphate (uridina trifosfato marcado com <sup>35</sup> S)
cDNA	- DNA complementar
DEPC	- Diethylpyrocarbonate (dietilpirocarbonato)
DNaseI	- Deoxyribonuclease (deoxiribonuclease)
DTT	- Dithiothreitol (ditiotreitól ou reagente de Cleland)
EDTA	-Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
GAPDH	- glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)
LB	- Luria-Bertani (medio de cultura)
MMP	- Metaloproteinases de matriz
pb	- Pares de base
PBS	- Phosphate buffered saline (solução tampão fosfato)
PCR	- Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
qPCR	- Quantitative polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase quantitativa)
RNA	- Ribonucleic acid (ácido ribonucléico)
SSC	- Solução de cloreto de sódio e citrato de sódio
TIMP	-Tissue inhibitor of matrixmetaloproteinase (Inibidor de metaloproteinase de tecido)

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. PROPOSIÇÃO	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1. Modelo experimental	7
3.2. PCR em Tempo Real (qPCR)	8
3.2.1. Coleta das amostras	8
3.2.2. Extração de RNA total	9
3.2.3. Determinação da concentração, pureza e qualidade do material	10
3.2.4. Síntese de cDNA	11
3.2.5. Reações de PCR em Tempo Real	11
3.2.6. Análise estatística	14
3.3. Imunohistoquímica	14
3.3.1. Coleta e processamento das amostras	14
3.3.2. Reação Imunohistoquímica	15
3.4. Hibridização <i>in situ</i>	16
3.4.1. Coleta e processamento das amostras	16
3.4.2. Síntese das sondas de RNA marcadas com <sup>35</sup> S	16
3.4.3. Reação de Hibridização <i>in situ</i>	18
4. RESULTADOS	20
4.1. Análise da quantificação da expressão de Col-1, MMPs e TIMPs no ligamento periodontal por PCR em Tempo Real	21
4.2. Localização da expressão de Col-1, MMPs e TIMPs no ligamento periodontal	24
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXO	44

## 1 INTRODUÇÃO

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo fibroso que ocupa o espaço entre o dente e o seu alvéolo, ligando o cemento ao osso alveolar por meio de fibras colágenas, e tem a função principal de ancoragem e suporte dos dentes quando em condições funcionais.

Estudos mostram que o metabolismo de proteínas é alto e a renovação de fibras colágenas no ligamento periodontal é muito rápido (Carneiro & De Moraes, 1965; Sodek, 1977; Redlich *et al*, 2004). Devido a um provável papel do ligamento nos movimentos funcionais do dente, o mecanismo de remodelação do colágeno tem sido muito investigado.

O tecido periodontal dos incisivos de roedores apresenta duas partes distintas: 1) o ligamento periodontal, que é o tecido conjuntivo entre o cemento e o osso alveolar com fibras de Sharpey inserindo-se em ambos, e abrangem toda a face lingual, mesial e parte da face distal do dente; 2) o periodonto relacionado ao esmalte, ocupando toda a face labial e parte da face distal do dente (Matena, 1972).

O constante movimento eruptivo que ocorre nos incisivos de roedores, à medida que eles se desgastam, é acompanhado por uma intensa atividade de degradação do ligamento periodontal (células e matriz extracelular) logo abaixo do epitélio juncional. Como células da resposta inflamatória (neutrófilos e macrófagos) parecem não participar deste processo (Schellens *et al*, 1982), este é um interessante modelo para o estudo da expressão e regulação das metaloproteinases de matriz por fibroblastos do ligamento periodontal.

Nos incisivos de erupção e crescimento contínuos as condições funcionais podem ser facilmente alteradas, permitindo investigar as mudanças bioquímicas, estruturais e do metabolismo de seus tecidos em diferentes estados. Estudos bioquímicos têm mostrado que o desimpedimento (condição hipofuncional) aumenta o teor de proteínas não colágenas (Van Den Bos &

Tonino, 1984) e de glicosaminoglicanas sulfatadas, que com a contenção da erupção diminuiu drasticamente (Kirkhan *et al*, 1993). Em relação a estudos de morfologia quantitativa do ligamento, Barros (1995) num estudo morfométrico, verificou que o desimpedimento parece aumentar o volume relativo de substância amorfa interfibrilar (rica em proteoglicanas). Beertsen & Everts (1977), em incisivos de camundongos desimpedidos em relação a contralaterais impedidos, encontraram também uma diminuição de colágeno extracelular.

Outros autores também observaram que incisivos desimpedidos oferecem menor resistência à extração e ao deslocamento quando são utilizadas forças axiais para a movimentação do dente, em comparação aos dentes em condições normofuncionais (Moxham & Berkovitz, 1981; Chiba *et al*, 1981; Komatsu, 1988). Entretanto, não se sabe se essa alteração na resistência ao movimento pode ser derivada da alteração da quantidade, distribuição e composição das fibras de Sharpey do ligamento periodontal (Silva & Merzel, 2004) ou por mudanças na composição da matriz extracelular e/ou no seu processo de remodelação.

Pouco é conhecido sobre as mudanças na síntese e degradação dos principais componentes da matriz extracelular do ligamento periodontal de incisivos em condições funcionais alteradas, sendo que a remodelação da matriz extracelular nesse tecido pode ser regulada por meio do balanço entre a produção das moléculas da matriz extracelular e a degradação pelas metaloproteinases (Sahlberg *et al*, 1999).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) constituem uma família de endopeptidases zinco-dependentes que regulam a composição da matriz extracelular. Em conjunto as MMPs são capazes de degradar praticamente todos os componentes da matriz, participando de processos fisiológicos, como a remodelação tecidual e cicatrização, ou patológicos, como artrites, invasões tumorais, metástases e doenças periodontais (Birkedal-Hansen, 1993; Johnson *et al*, 1998).

As MMPs também estão presentes em plantas e seres invertebrados, e exibem similaridade estrutural e funcional. Apesar das similaridades, todos os membros desta família são codificados por genes distintos (Massova *et al*, 1998). Em humanos as MMPs são subdivididas nas classes das colagenases, gelatinases, estromelisininas e as MMPs de membrana celular (Matrisian, 1992; Emonard & Grimaud, 1990; Nagase & Woessner, 1999).

Recentes estudos têm encontrado metaloproteinases no ligamento periodontal de molares de ratos. Dentre elas, a MMP-2, MMP-8 e a MMP-14 (também chamada de MT1-MMP). A MMP-2 é uma gelatinase A que degrada especialmente o colágeno tipo IV e assim, regula a remodelação de membrana basal, além de degradar a gelatina (colágeno denaturado) depois da quebra das moléculas de colágeno em segmentos de  $\frac{1}{4}$  e  $\frac{3}{4}$  por outras colagenases (Sahlberg *et al*, 1999). Aimes *et al* (1995) demonstraram que a MMP-2 também é capaz de degradar o colágeno intersticial na ausência de colagenases. A MMP-2 foi identificada em tecido dental em desenvolvimento, em fibroblastos do ligamento periodontal, células do osso alveolar e do cimento durante a erupção dental em molares de ratos, sugerindo que essa metaloproteinase pode participar na renovação da matriz extracelular do dente e dos tecidos adjacentes (Tsubota *et al*, 2002).

A ativação da pro-MMP-2 ocorre na superfície celular e requer a formação de um complexo único envolvendo a MMP-14 e a TIMP-2 (Inibidor de metaloproteinase de tecido 2). Este complexo é formado pela ligação da TIMP-2 ao sítio catalítico da MMP-14 na superfície celular. A pro-MMP-2 secretada então se liga ao domínio C-terminal da TIMP-2 e é ativada por clivagem na superfície da membrana plasmática por uma segunda molécula de MMP-14 (Zucker *et al*, 2004). Um excesso de TIMP-2 previne o processo de ativação da MMP-2 pela inibição da segunda molécula de MMP-14 (Nagase *et al*, 2006).

A MMP-8, também chamada de colagenase de neutrófilo, é uma colagenase intersticial que cliva o colágeno nativo tipo I, II e III em fragmentos de

$\frac{1}{4}$  e  $\frac{3}{4}$  que posteriormente serão degradados por gelatinases como a MMP-2. A MMP-8 tem sido identificada em ratos e parece estar envolvida na remodelação de colágeno da matriz extracelular do osso durante o desenvolvimento embriogênico da mandíbula (Sasano *et al*, 2002). Segundo Takahashi *et al* (2003), a MMP-8 pode ter um importante papel na remodelação do ligamento periodontal e também na remodelação do osso alveolar durante o movimento eruptivo. Ela foi localizada em osteoblastos, osteócitos, fibroblastos, cementoblastos e cementócitos, e odontoblastos durante o desenvolvimento fisiológico do tecido periodontal, sendo co-localizada com a expressão de colágeno tipo I e III, e parece ter um papel importante na organização da matriz de colágeno no ligamento periodontal em formação e outros tecidos periodontais durante a erupção dental em ratos (Tsubota *et al*, 2002).

A MMP-14 tem sido considerada a mais importante metaloproteinase da superfície celular, envolvida na digestão da matriz pericelular e, direta ou indiretamente, está envolvida na via de ativação de pro-MMP-2. Atribui-se a ela numerosas funções incluindo a migração e invasão celular, e parece ter uma função no caminho intracelular de degradação do colágeno (Zucker *et al*, 2004). Ela tem sido encontrada em células do ligamento periodontal e parece ter um importante papel na remodelação periodontal. Segundo os estudos de Beertsen *et al* (2002, 2003), o retardamento do crescimento da raiz e a falha na erupção em dentes de camundongos deficientes em MMP-14, indicam uma importante participação dessa enzima no desenvolvimento do dente e na formação do osso alveolar.

Os inibidores de metaloproteinases (TIMPs) são uma família de moléculas consistindo de 184-194 aminoácidos que tem sido identificadas como inibidores naturais de MMPs. Atualmente, são conhecidos 4 diferentes membros da família TIMP que diferem individualmente na habilidade de inibição de MMPs. Recentes estudos tem demonstrado que as TIMPs também têm efeito sobre o

crescimento celular, apoptose e diferenciação, independente de sua capacidade inibitória para as MMPs (Baker et al, 2002).

As TIMPs também parecem ter um papel no desenvolvimento do tecido ósseo, cartilagem da mandíbula e no desenvolvimento dental (Sahlberg *et al*, 1999; Goldberg *et al*, 2003; Hatori *et al*, 2004; Yoshida, 2005; Takahashi *et al*, 2005, 2006). As TIMPs foram encontradas no ligamento periodontal sendo expressas por osteoblastos, osteócitos, cementoblastos, cementócitos e fibroblastos, durante a erupção de molares de ratos (Maruya *et al*, 2003) e durante o movimento ortodôntico (Takahashi *et al*, 2006). As TIMP-1 e TIMP-2 estão relacionadas a inibição da atividade da MMP-8, enquanto as MMP-2 e MMP-14 tem a atividade inibida pela TIMP-2.

A expressão de MMPs e TIMPs pelas células do ligamento periodontal tem sido mostradas em alguns estudos (Tsubota *et al*, 2002; Beertsen *et al*, 2002, 2003; Maruya *et al*, 2003; Takahashi *et al*, 2003, 2006;), porém essas observações são realizadas principalmente em molares e em dentes de crescimento limitado em desenvolvimento. Nenhuma identificação dessas enzimas foi feita em dentes de crescimento e erupção contínua e com condições funcionais alteradas, principalmente utilizando métodos mais sensíveis de identificação e quantificação dessas proteínas, como a técnica de Real Time PCR, associada a sua localização no tecido por meio de hibridização *in situ* e imunohistoquímica.

Pelo exposto acima este trabalho pretende contribuir com o melhor entendimento da expressão de genes que codificam proteínas importantes para a remodelação da matriz extracelular do ligamento periodontal de ratos submetidos a diferentes condições funcionais. A utilização de métodos quantitativos e de localização de colágeno tipo I e das principais enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular e seus inibidores, poderão oferecer dados importantes sobre o processo de remodelação desse tecido conjuntivo.

## **2 PROPOSIÇÃO**

Este estudo tem como objetivo quantificar a expressão de mRNA de colágeno tipo I, MMP-2, MMP-8, MMP-14, TIMP-1 e TIMP-2, identificar as células que expressam esses mRNAs e a localização das proteínas no ligamento periodontal de incisivos de ratos submetidos a diferentes condições funcionais alteradas experimentalmente.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. - MODELO EXPERIMENTAL

Ratos Lewis (uma espécie isogênica de ratos, ou seja, que possuem uma maior similaridade genética) machos pesando em média 350g, foram adquiridos do CEMIB-UNICAMP e mantidos em gaiolas no Biotério do Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP em condições controladas de luz (12 horas no claro e 12 horas no escuro) e temperatura (25-30° C), e alimentados com água e ração *ad libitum*, seguindo os Princípios Éticos de Experimentação Animal e o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética da FOP-UNICAMP (protocolo nº 659-10 – em Anexo).

Os ratos foram divididos em 4 grupos de acordo com as seguintes condições funcionais a que os incisivos inferiores foram submetidos:

- 1) Incisivos normofuncionais – condições funcionais normais;
- 2) Incisivos hiperfuncionais e hipofuncionais (Figura 1A) – após anestesia, os animais tiveram os incisivos inferiores esquerdos seccionados a cada 2 dias na altura da papila interdental com uma broca diamantada montada em alta rotação, e permanecendo fora de oclusão, foram considerados em condição hipofuncional. Nessas condições os incisivos têm a erupção acelerada, mas ficam livres de forças mastigatórias. Os incisivos direitos (contralaterais) permaneceram em oclusão, porém em sobrecarga por ocluírem com os dois incisivos superiores, e foram considerados em condições hiperfuncionais (Steigman et al, 1989);

- 3) Incisivos contidos (Figura 1B) – após anestesia os animais tiveram o incisivo esquerdo preso ao 1º molar inferior por meio de um fio de aço número 0,45 para impedir a sua erupção. Em uma das extremidades, o fio foi fixado a um orifício na face labial do dente, perfurado com uma broca Carbide ¼ (Sorensen,

KG, Brasil) e preenchido com resina fotopolimerizável (3M, USA), enquanto a outra extremidade envolveu o primeiro molar inferior esquerdo passando pela ameia interdental. Desta maneira os incisivos não erupcionaram, mas estavam sujeitos às cargas mastigatórias.

Os animais foram sacrificados após um período experimental de 7 e 14 dias de alteração das condições funcionais dos incisivos.

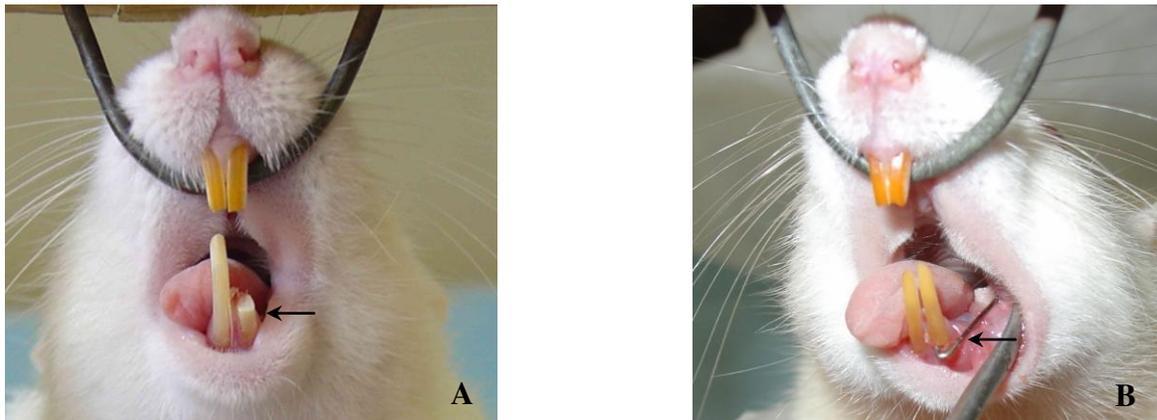


Figura 1 – Condições funcionais dos incisivos inferiores de ratos. A) incisivo esquerdo hipofuncional (seta) e incisivo direito hiperfuncional; B) incisivo esquerdo com contenção de fio de aço impedindo a erupção (seta).

### 3.2. – PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

#### 3.2.1. - Coleta das amostras

Cinquenta ratos para cada grupo experimental foram anestesiados com ketamina (Dopalen, Vetbrands, Brasil) 80mg/kg de peso do animal e cloridrato de xylasina (Rompum, Bayer, Brasil) 8mg/kg, e tiveram seus incisivos inferiores extraídos. Após a extração dos dentes os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. O ligamento periodontal dos incisivos foi coletado por meio de leve raspagem das superfícies lingual, mesial e distal utilizando-se uma cureta periodontal. As amostras de ligamento periodontal coletadas foram colocadas em tubos mantidos sobre gelo seco para a conservação da integridade do RNA e

depois foram armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Cada tubo continha o raspado de 10 dentes, portanto, para cada grupo experimental foram obtidos 5 “pools” de ligamento periodontal raspado de 10 dentes, como demonstrado na Figura 2.

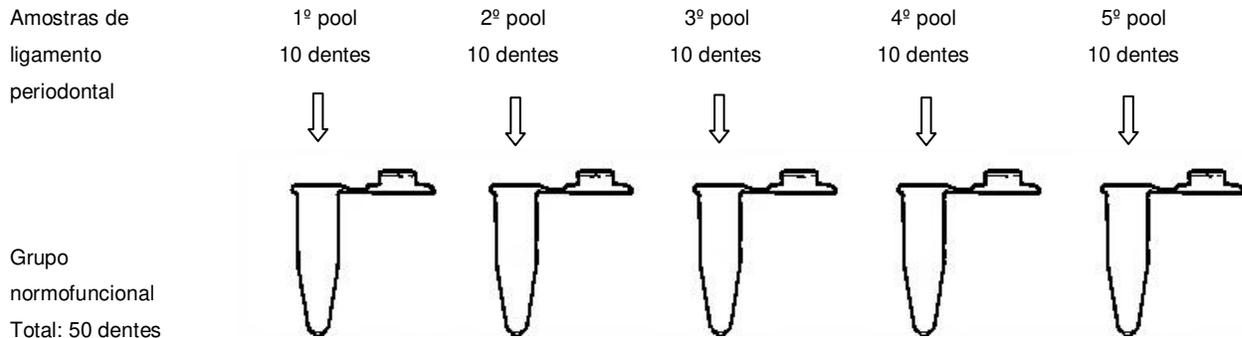


Figura 2 – Esquema de distribuição das amostras de ligamento periodontal coletas. A imagem de 5 tubos representa os 5 pools contendo o raspado de 10 dentes, para cada grupo experimental. Como exemplo foi utilizado o grupo normofuncional onde  $n=5$ .

Alguns incisivos extraídos foram incluídos em Paraplast e processados para a obtenção de cortes histológicos. Foram observadas a integridade e a morfologia do ligamento periodontal ligado ao dente após a extração e o remanescente de tecido após a raspagem para a coleta do mesmo.

### 3.2.2. - Extração do RNA total

Para a extração do RNA foi utilizado o método do fenol/clorofórmio como descrito: as amostras foram descongeladas sobre gelo e imersas em  $600\mu\text{l}$  de TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, USA) a  $4^{\circ}\text{C}$  e maceradas por punção com a utilização de seringa e uma agulha calibrosa. Após a homogeneização por 5 minutos foram adicionados  $120\mu\text{l}$  clorofórmio (Merck, Germany), seguido por

incubação por 5 minutos e centrifugação a 13000rpm a 4°C por 15 minutos. A fase aquosa contendo o RNA total foi coletada, transferida para outro tubo e incubada com 300µl de isopropanol (Merck, Germany) por 10 minutos para precipitação do RNA. Após centrifugação a 13000rpm a 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o pellet de RNA total adquirido foi lavado com 480µl de etanol 75% gelado (Merck, Germany) e centrifugado a 9000rpm a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi mantido em temperatura ambiente por cerca de 30 minutos para secagem. Em seguida, o material foi ressuspendido em 20µl de água tratada com DEPC (Invitrogen, USA) e os tubos contendo as amostras foram armazenados a -70°C. Cuidados extras no tratamento do material utilizado (lavagem em água com DEPC por 1 hora e posterior autoclavagem) foram tomados para a manutenção de um ambiente livre de RNase, assim como para a manipulação das amostras e do RNA extraído.

### ***3.2.3. - Determinação da concentração, pureza e qualidade do material***

Para determinação da concentração e pureza do material, foi realizada a leitura da densidade óptica das soluções de RNA total em espectrofotômetro para os comprimentos de onda de 260 e 280nm. O RNA foi considerado puro quando a razão entre as duas leituras ficou acima de 1.8.

Para a verificação da qualidade dos RNAs obtidos, 1µg de RNA de cada amostra foi separado em um gel de agarose a 1,2%, por meio de eletroforese a 70V constante, por 40 minutos, em tampão contendo 20mM de MOPS, 5mM de acetato de sódio e 1mM de EDTA. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado através do programa Image Máster VDS (Pharmacia Biotech, Israel). A qualidade do material foi determinada pela presença das bandas do RNA ribossômico, 28S e 18S (Figura 3).

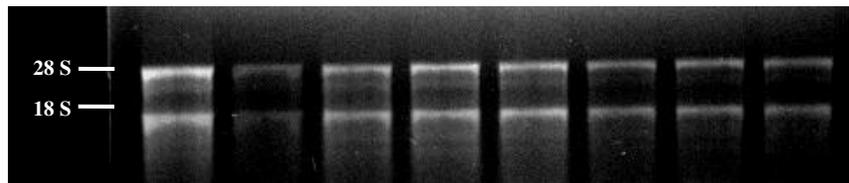


Figura 3 – Gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo para a verificação da integridade de amostras de RNA total extraídas de ligamento periodontal.

#### **3.2.4. - Síntese de cDNA**

As amostras de RNA extraídas, com comprovada qualidade e pureza, foram tratadas com 1U de DNase I (Invitrogen, USA) por 15 minutos em temperatura ambiente, para eliminar possíveis traços de DNA genômico contaminante. A síntese de cDNA foi feita a partir de 0,1µg de RNA total de cada amostra, utilizando-se o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA), seguindo as instruções do fabricante. Para a síntese de cDNA para a quantificação da MMP-8 foi usado Random Hexamers primer, enquanto para os outros genes estudados a transcrição reversa foi feita utilizando-se Oligo dT primer.

#### **3.2.5 – Reações de PCR em Tempo Real**

Para as reações de PCR em Tempo Real (qPCR) foi utilizado o sistema LightCycler® (Roche Diagnostics GmbH, Germany) do Laboratório de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Para a amplificação foram usados kits LightCycler - FastStart DNA Master<sup>plus</sup> SYBR Green I (Roche Diagnostic Co, USA) seguindo as recomendações do fabricante e os pares de primers específicos para cada gene de interesse. Os primers foram desenhados com o auxílio do programa LightCycler Design2 (Roche Diagnostics GmbH, Germany) e estão listados na Tabela 1.

Inicialmente, as reações de qPCR foram otimizadas testando-se diferentes concentrações de cDNA e dos primers, e as condições de amplificação. A eficiência e a especificidade dos primers foi verificada por meio das Curvas de Amplificação e de Melting como ilustrado nas Figuras 4 e 5 para o gene GAPDH. O produto das reações foi quantificado pelo programa do próprio fabricante (LightCycler Relative Quantification Software - Roche Diagnostics GmbH, Germany). O GAPDH foi utilizado como gene de referência para a normalização dos valores.

Tabela 1 – Oligonucleotideo primers usados para qPCR

Collagen type I alpha-1 de rato: produto de 162pb Primer forward Primer reverse	5'ATCCTGGGCCACAAGTCA3' 5'TTAGGCTAAGCGGTGCG3'
MMP2 de rato: produto de 138pb Primer forward Primer reverse	5'CGAGACCGCTATGTCC3' 5'CTTCCGGTCATCATCGTAGTT3'
MMP8 de rato: produto de 154pb Primer forward Primer reverse	5'GGTATTGGAGGAGATGCACA3' 5'CATAGTTTGGGTACATCAAGGC3'
MMP14 de rato: produto de 163pb Primer forward Primer reverse	5'CTGCCTGCATCCATCAAC3' 5'CTGCATCAATCTTGTCCGTG3'
TIMP1 de rato: produto de 157pb Primer forward Primer reverse	5'GCTTTCTGCAACTCGGAC3' 5'TGTAGGCGAACCGGAAAC3'
TIMP2 de rato: produto de 152pb Primer forward Primer reverse	5'TTGACATCGAGGACCCGT3' 5'ATCACACTAGCGTGAACCCA3'
GAPDH de rato: produto de 162pb Primer forward Primer reverse	5'GCCTTCTCTTGTGACAAAG3' 5'TGGTGATGGGTTTCCCG3'

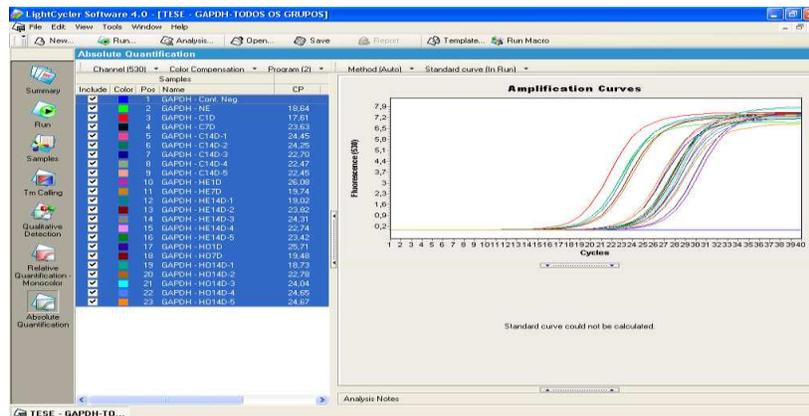


Figura 4 – Curva de amplificação de algumas amostras para o gene de referência Gapdh, evidenciando a eficiência da reação de PCR em Tempo Real.

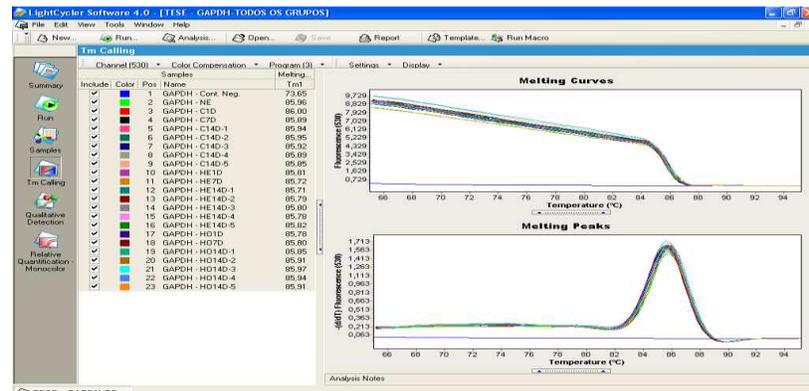


Figura 5 – Curva de Melting e Melting Peaks gerados da reação de amplificação por PCR em Tempo Real de algumas amostras, para o gene de referência Gapdh. A formação de um único pico para cada amostra evidencia a especificidade da reação.

Os cálculos para determinação dos níveis relativos de expressão dos genes foram feitos automaticamente pelo software LightCycler 4.0 (roche Molecular Biochemicals, Germany), utilizando o GAPDH como gene de referência nas amostras e o método do limiar do ciclo (Cp). Resumidamente, o valor de Cp é um número de ciclo fracional que é determinado da segunda derivada máxima (ponto de máxima aceleração) na curva de amplificação do PCR (fluorescência versus número do ciclo). Os valores de Cp foram usados para calcular a expressão do gene alvo, com normalização pelo GAPDH e então, comparados

com os valores obtidos para uma amostras alvo para controle interno (amostra de ligamento periodontal do normofuncional) para calcular o aumento de expressão.

### **3.2.6 – Análise estatística**

A análise dos dados gerados pela quantificação por PCR em Tempo Real foi feita utilizando o teste Kruskal Wallis para a comparação dos níveis de mRNA de Col1- $\alpha$ 1, MMP-2, MMP-14, MMP-8, TIMP-1 e TIMP-2, entre os grupos tratados e o normofuncional. Para a comparação entre os períodos de tratamento dentro de cada grupo foi utilizado o teste Mann-Whitney. Para os dois testes foi considerado o nível de significância de 5%.

## **3.3- IMUNOHISTOQUÍMICA**

### **3.3.1 – Coleta e processamento das amostras**

Foram utilizados 10 ratos para cada condição funcional, divididos em grupos de 5 animais segundo o período experimental de 7 e 14 dias. Após o experimento os animais foram sacrificados por meio de perfusão intracardíaca com uma solução fixadora de 4% paraformaldeído, 0,5% glutaraldeído e 0,2% ácido pícrico em tampão fosfato 0,1M pH 7,4. As hemimandíbulas foram dissecadas, armazenadas na mesma solução fixadora a 4°C por pelo menos 48 horas. As amostras para estudo foram delimitadas da região da crista óssea alveolar até a região imediatamente anterior ao 1º molar inferior, onde as hemimandíbulas foram cortadas transversalmente.

Após a fixação, as hemimandíbulas foram lavadas em tampão PBS, descalcificadas com EDTA a 10% em tampão fosfato 0,01M pH 7,4, incluídas em paraplast e seccionadas transversalmente para obtenção de cortes com 3  $\mu$ m de

espessura, coletados em lâminas previamente preparadas com organossilano (3 aminopropyltriethoxy-silano, Sigma, USA).

### **3.3.2 – Reação Imunohistoquímica**

Os cortes foram desparafinizados em xilol e hidratados em soluções de concentrações decrescentes de etanol. Para as reações de detecção da MMP-8, e TIMP-1 foi realizada a recuperação antigênica com incubação em ácido cítrico 0,01M pH6,0 a 60°C por 10 minutos e 30 minutos, respectivamente. A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada utilizando incubação em peróxido de hidrogênio 6% por 12 minutos em temperatura ambiente, seguido de lavagem em PBS. O bloqueio das proteínas inespecíficas no tecido foi feito por meio de incubação com BSA 3% em PBS a pH 7,4 por 30 minutos, seguindo lavagem com PBS. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados nas concentrações:

- 1) 1:500, Purified rabbit anti-type I collagen, 20141, Novotec;
- 2) 1:500, Mouse anti-human MMP-2 monoclonal antibody, MAB13405, Chemicon;
- 3) 1:50, Purified goat anti-MMP-8 polyclonal antibody, sc-8848, Santa Cruz;
- 4) 1:1000, Mouse anti-human-MMP-14 monoclonal antibody, MAB3317, Chemicon;
- 5) 1:20, Rabbit anti-human TIMP-1 polyclonal antibody, AB770, Chemicon;
- 6) 1:100, Mouse anti-TIMP-2 monoclonal antibody, MAB13446, Chemicon.

Os anticorpos primários diluídos foram aplicados sobre os cortes e incubados por 16 horas a 4°C, seguindo lavagem em PBS. Para detecção utilizamos o kit LSAB® System HRP (DAKO Cytomation, USA) por 30 minutos a 37°C e revelação com DAB como substrato, por 3 minutos a 37°C. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina. Como controle negativo as lâminas foram processadas sem incubação com soro ou por PBS 1% substituindo o anticorpo primário.

### **3.4– HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU***

#### **3.4.1 – Coleta e processamento das amostras**

Foram utilizados 10 ratos para cada condição funcional, divididos em grupos de 5 animais segundo o período experimental de 7 e 14 dias. Após o experimento os animais foram sacrificados por meio de perfusão intracardíaca com uma solução fixadora de 4% paraformaldeído, 0,5% glutaraldéido em tampão fosfato 0,1M pH 7,4. As hemimandíbulas foram dissecadas, armazenadas na mesma solução fixadora a 4°C por pelo menos 48 horas. As hemimandíbulas foram lavadas em tampão PBS e descalcificadas com solução de EDTA a 10% em tampão fosfato 0,01M pH 7,4 autoclavada antes do uso (Tsubota et al, 2002). As amostras foram incluídas em paraplast e seccionadas transversalmente para obtenção de cortes com 3 µm de espessura, coletados em lâminas previamente preparadas com organossilano (3 aminopropyltriethoxy-silano, Sigma, USA).

Cuidados extras para evitar a contaminação das amostras foram tomados, como a esterilização do material utilizado para a coleta das amostras e para o preparo das soluções.

#### **3.4.2 – Síntese das sondas RNA marcadas com <sup>35</sup>S**

I.M.A.G.E. cDNA clones contendo a sequência que codifica os genes de rato, MMP-2 (Clone 7100171; GenBank NM\_031054.1), MMP-14 (Clone 7103279; GenBank NM\_031056.1), TIMP-1 (Clone 7930800; GenBank NM\_053819.1) e TIMP-2 (Clone 7303706; GenBank NM\_021989.2) foram adquiridas da empresa Invitrogen (USA). O clone contendo a sequência que codifica MMP-8 de rato no plasmídeo pWGIHG (GenBank NM\_022221.1) foi generosamente doado pelo Dr. Christopher Overall (Department of Oral Biological & Medical Sciences, Department of Biochemistry & Molecular Biology, University of British Columbia, Vancouver,

Ca). A sequência foi subclonada em pBluescript II KS- no sítio de restrição da enzima *Sal I*.

As bactérias contendo os clones foram incubadas durante a noite a 37°C em meio de cultura LB contendo ampicilina e o DNA plasmidial foi extraído por meio do método de lise alcalina (Miniprep). O DNA foi linearizado usando enzimas de restrição e o tamanho das sequências foi verificado em gel de agarose (Figuras 6 e 7). Para a obtenção de maior quantidade de DNA para a síntese das sondas, as bactérias foram incubadas em 250ml de meio LB contendo 1ml de ampicilina (10mg/ml) durante a noite a 37°C e o DNA plasmidial foi extraído usando o kit QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Canada), conforme recomendado pelo fabricante. As sequências foram confirmadas por dideoxinucleotídeo sequenciamento.

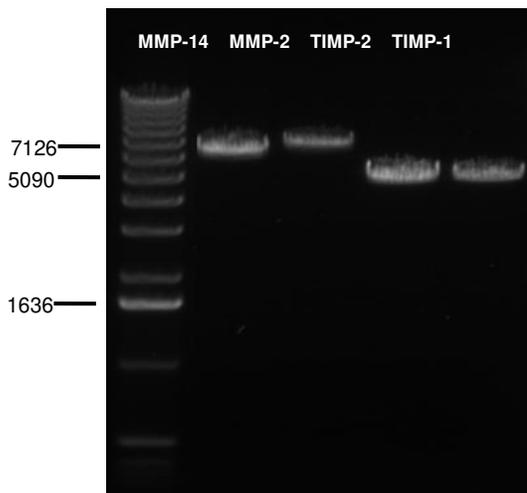


Figura 6 - Gel de agarose a 0,8% corado pelo SYBR Safe™ DNA Gel Stain, evidenciando os plasmídeos linearizados.  $\phi$ X, 1Kb DNA Ladder (marcador de massa molecular); clone da MMP-14; clone da MMP-2; clone da TIMP-2; clone da TIMP-1.

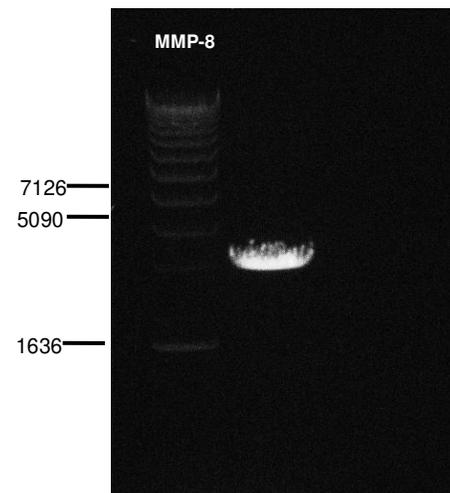


Figura 7 - Gel de agarose a 0,8% corado pelo SYBR Safe™ DNA Gel Stain, evidenciando plasmídeo linearizado.  $\phi$ X, 1Kb DNA Ladder (marcador de massa molecular); clone da MMP-8.

Os I.M.A.G.E. cDNA clones foram linearizados por digestão com a enzima *EcoRI* e o clone da MMP-8 foi linearizado usando a enzima *XhoI*, seguindo da separação em gel de agarose e purificação do gel utilizando o QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, USA). As ribosondas foram geradas usando a polimerase específica para cada gene (Tabela 2) e <sup>35</sup>S-UTP SJ1303 (Perkin Elmer, USA), e hidrolizadas em fragmentos de aproximadamente 300pb.

Tabela 2 – Características dos clones, RNA polimerases e enzimas de restrição usadas para as sondas de RNA

Genes	Tamanho inserto	Tamanho do clone	Plasmídeo Vetor	Polimerase/ Enzima
MMP-2	3006bp	7114bp	pExpress-1	T7 promotor/ <i>EcoRI</i>
MMP-14	2438bp	6546bp	pExpress-1	T7 promotor/ <i>EcoRI</i>
MMP-8	1410pb	4371pb	pBluescript II KS(-)	T7 promotor/ <i>XhoI</i>
TIMP-1	779bp	5146bp	pCMV-Sport6	T7 promotor/ <i>EcoRI</i>
TIMP-2	1024bp	5132bp	pExpress-1	T7 promotor/ <i>EcoRI</i>

### 3.4.3 – Reação de Hibridização *in situ*

Os cortes foram desparafinizados, hidratados em soluções de concentrações decrescentes de etanol, tratadas em ácido clorídrico 0,2N por 20 minutos. Depois de lavados em SSC os cortes foram incubados com 5 µg/ml de proteinase K (Sigma-Aldrich, USA) em 100mM de Tris pH 7,5 e 50mM de EDTA por 10 minutos a 37°C, tratados com 2mg/ml de glicina em PBS por 2 minutos, seguindo tratamento com paraformaldeído 4% em PBS por 20 minutos e depois com trietanolamina 0,1M com anidro acético 1/400. Entre cada tratamento citado os cortes foram lavados em PBS. Os cortes foram desidratados em soluções de concentrações crescentes de álcool, secos e incubadas com as sondas durante a

noite em 55°C. Depois de lavadas em solução de formamida 50% e 10mM DTT em SSC a 65°C, os cortes foram tratados com 40µg/ml de Rnase A (Boehringer Mannheim, Germany) por 30 minutos a 37°C. Após lavadas em 0,1M SSC os cortes foram desidratados em 300mM de acetato de amônio em etanol 70%, etanol 95% e etanol 100% e secos.

Para a observação da intensidade do sinal radioativo das sondas, um filme radiográfico foi exposto às lâminas com os cortes hibridizados por 24 horas. As lâminas foram então tratadas com emulsão Ilford K5 na diluição 6:8 em glicerol 2% na câmara escura, secas por 10 minutos e colocadas em caixas lacradas e protegidas da exposição da luz, armazenadas a 4°C.

Duas lâminas teste para cada gene foram utilizadas para verificar o tempo adequado de exposição da emulsão à radiação das sondas. Uma das lâminas teste foi revelada após um período de 7 dias, enquanto a outra, foi revelada próximo do período estimado. Determinado o tempo de exposição, todas as lâminas hibridizadas com a mesma sonda foram reveladas em Kodak D19, lavadas em água e fixadas em Kodak Inufix. Após a lavagem em água corrente por 10 minutos as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina por 3 minutos e montadas em Entellan® (Merck KG-A, Germany).

## 4 RESULTADOS

Como resultado da extração dos incisivos inferiores para a coleta das amostras de ligamento periodontal para a realização do qPCR, pudemos observar que o tecido se separa em duas porções na região conhecida como zona de cisalhamento. Parte do tecido permaneceu ligado ao osso alveolar (Figura 8A) e parte ligado ao dente por meio do cemento (Figura 8B e C).

No ligamento periodontal ligado ao osso alveolar estão presentes células como osteoblastos e osteoclastos, além de diversos vasos sanguíneos e nervos. Por causa dessas características, a coleta das amostras de ligamento periodontal limitou-se a porção do tecido ligado ao dente, onde ocorre a predominância de fibroblastos e cementoblastos. Deste modo, os resultados obtidos da quantificação da expressão dos genes estudados, tiveram origem de um número reduzido de tipos celulares.

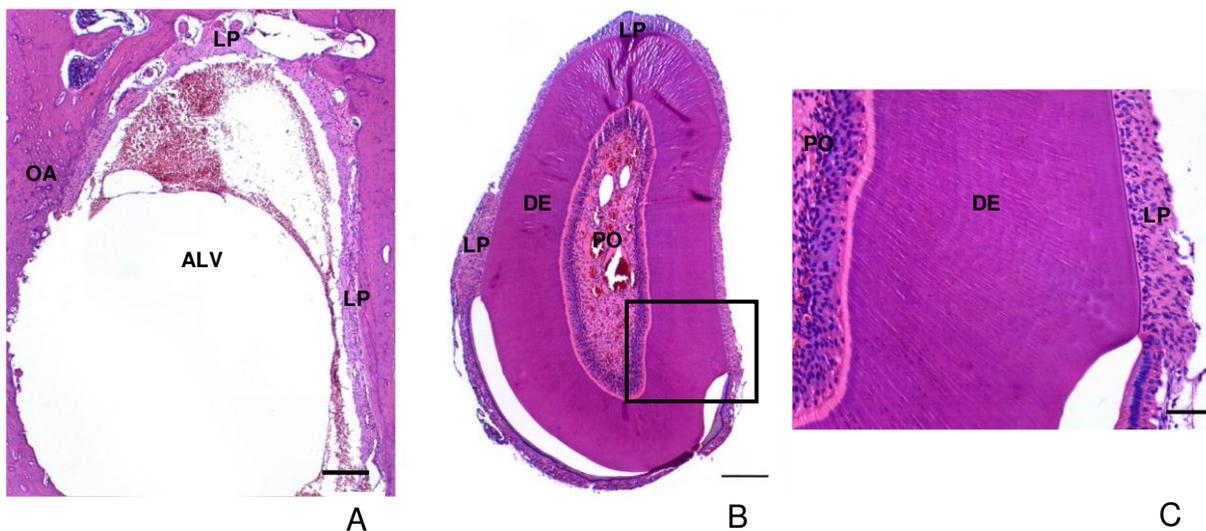


Figura 8 – Fotomicrografias de cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina, evidenciando o ligamento periodontal após a extração do incisivo. A – Corte transversal de hemimandíbula de rato mostrando alvéolo dentário. B – Corte tranversal do incisivo extraído. C – Região correspondente a imagem delimitada pelo retângulo em B. ALV, alvéolo dentário; DE, dentina; LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar; PO, polpa. Barra igual a 200μm (A e B); barra igual a 50 μm (C).

#### 4.1 – Análise da quantificação da expressão de Col-1, MMPs e TIMPs no ligamento periodontal por PCR em Tempo Real

As médias e desvio padrão dos dados obtidos pela quantificação dos níveis de mRNA do Col-1, MMP-2, MMP-8, MMP-14, TIMP-1 e TIMP-2, podem ser observados nos gráficos da Figura 9.

Os dados obtidos por meio do qPCR demonstraram que a redução na expressão de Col-1 no ligamento periodontal ocorreu após alterações funcionais do incisivo. Foi observada uma redução nos níveis de mRNA para Col-1 em todos os grupos tratados, sendo que as alterações foram significantes ( $p < 0,05$ ) para os grupos hipofuncional e contido por 7 dias, e hiperfuncional por 14 dias. Diferença significativa também foi observada entre os períodos de tratamento por contenção da erupção, havendo maior expressão de Col-1 no grupo contido por 14 dias.

Os níveis de mRNA para MMP-2 foram significativamente aumentados ( $p < 0,05$ ) no grupo hipofuncional por 7 dias em relação aos níveis do normofuncional e do hipofuncional por 14 dias. Diferença significativa também ocorreu entre os períodos de tratamento do grupo contido.

Nenhuma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) foi observada para os níveis de mRNA de MMP-14 nos grupos e períodos estudados, em relação ao grupo normofuncional. Entretanto, diferenças significantes foram encontradas entre os períodos de 7 e 14 dias do grupo hipofuncional e do grupo contido, havendo aumento dos níveis de MMP-14 no período de 14 dias.

A análise dos dados para a MMP-8 demonstrou haver um alto nível de expressão da colagenase MMP-8 no ligamento periodontal de incisivos normofuncionais e uma redução em todos os grupos tratados, sendo significativa ( $p < 0,05$ ) no grupo contido por 7 e 14 dias. Nos grupos hipofuncional e hiperfuncional houve um aumento significativo dos níveis de MMP-8 no período de 14 dias em relação ao período de 7 dias.

As alterações funcionais estudadas não afetaram de forma significativa ( $p < 0,05$ ) os níveis de expressão de TIMP-1 no ligamento periodontal em relação ao normofuncional e entre períodos. Porém, os dados sugerem uma tendência de aumento dos níveis de mRNA no grupo contido por 7 e 14 dias.

Para o inibidor de metaloproteinase TIMP-2, os níveis de mRNA foram reduzidos em relação ao normofuncional após 7 dias de experimento, com diferença significativa no grupo hiperfuncional. Um aumento significativo foi observado nos grupos hipofuncional e hiperfuncional por 14 dias em relação ao período de 7 dias.

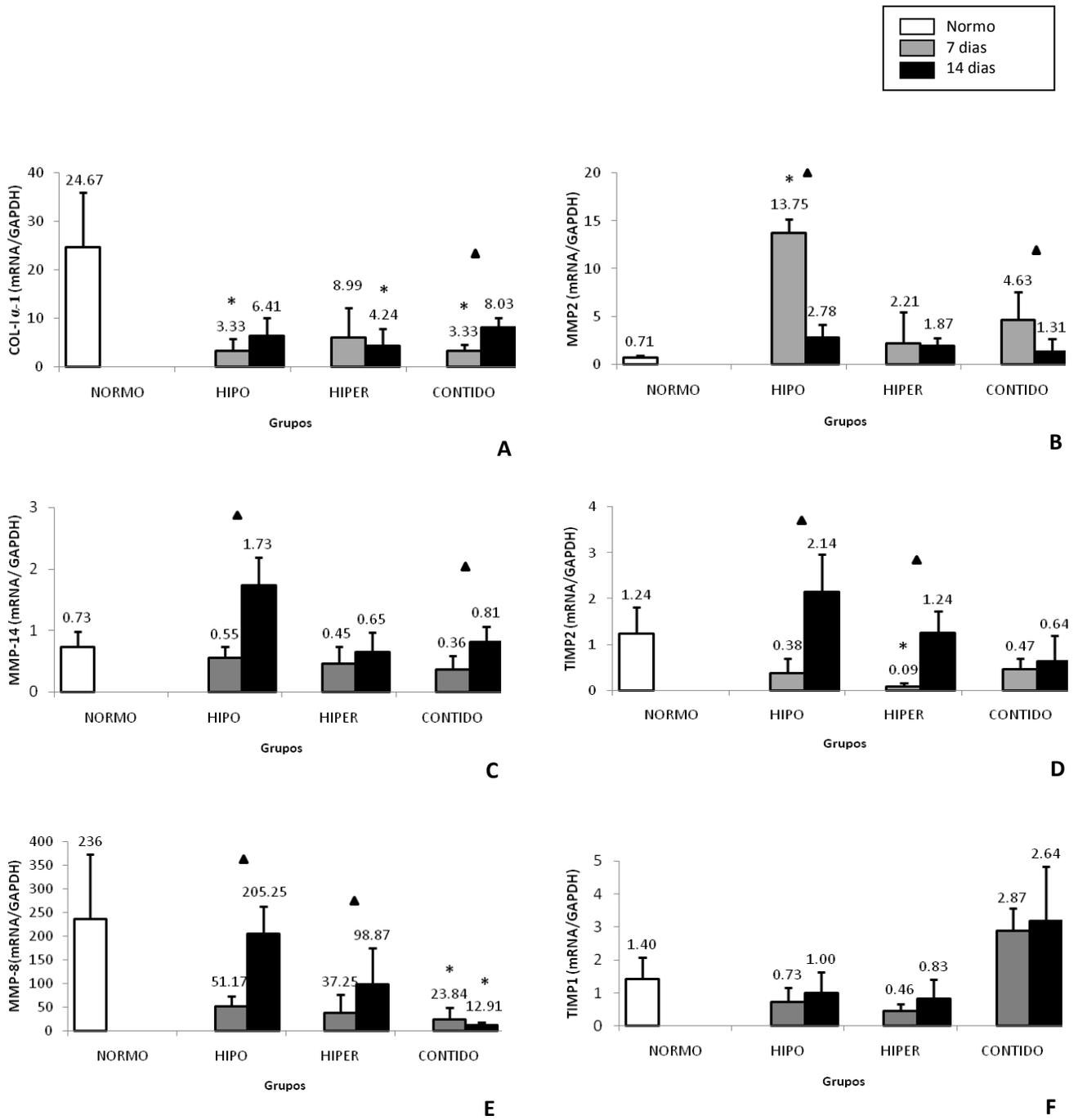


Figura 9 – Análise da quantificação por PCR em Tempo Real. Os gráficos mostram média e desvio padrão dos níveis de mRNA (mRNA/GAPDH/calibrador) de Col1- $\alpha$ 1 (A), MMP-2 (B), MMP-14 (C), MMP-8 (E), TIMP-1 (F) e TIMP-2 (D) no ligamento periodontal de incisivos de ratos em diferentes condições funcionais. \* p < 0,05, teste Kruskal Wallis, para a comparação entre os grupos tratados e o normofuncional; ▲ p < 0,05, teste Mann-Whitney, para a análise das diferenças intragrupos dos tempos de tratamento.

## 4.2 – Localização da expressão de Col-1, MMPs e TIMPs no ligamento periodontal

As análises por hibridização *in situ* e as reações de imunohistoquímica mostraram sinais de especificidade das sondas e dos anticorpos, respectivamente, quando a detecção foi comparada nos diversos tecidos dentais e tipos celulares (Figura 11A e D). Os controles negativos das reações de imunohistoquímica não apresentaram nenhuma marcação nos tecidos como ilustrado na Figura 10F.

As reações de imunohistoquímica para a localização do colágeno tipo I, mostraram uma distribuição heterogênea da proteína no tecido. Uma maior concentração de Col-1 foi observada na região do ligamento periodontal mais próxima ao osso alveolar e ao redor dos vasos sanguíneos. Variações de intensidade da marcação para Col-1 observadas nos grupos sugerem uma diminuição do colágeno no ligamento em todos os grupos tratados em relação ao normofuncional, como demonstradas na Figura 10 (A-E).

As MMPs e TIMPs estudadas foram detectadas no ligamento periodontal de incisivos e possuem um padrão de localização no tecido semelhante em todos os grupos tratados e normofuncional. As metaloproteinases 2, 8 e 14, e seus inibidores TIMP-1 e TIMP-2 estão presentes na matriz extracelular e foram detectadas em quase todos os tipos celulares do periodonto. As células do tecido ósseo, principalmente osteoblastos e osteoclastos, foram fortemente detectados pela imunohistoquímica e pelo sinal de hibridização para as MMP-2, -8 e -14, e TIMP-2 (Figuras 11, 12, 13 e 15), além de fibroblastos e cementoblastos, enquanto para a TIMP-1 (Figura 14) observou-se fraca marcação e pouco sinal de hibridização.

A MMP-8 foi detectada no ligamento periodontal em maior concentração na região adjacente ao folículo dentário próximo a junção cimento esmalte (Figura 12A e D). A distribuição da TIMP-2 apresentou-se mais

concentrada na região mais próxima ao dente no ligamento periodontal em todos os grupos (Figura 15D).

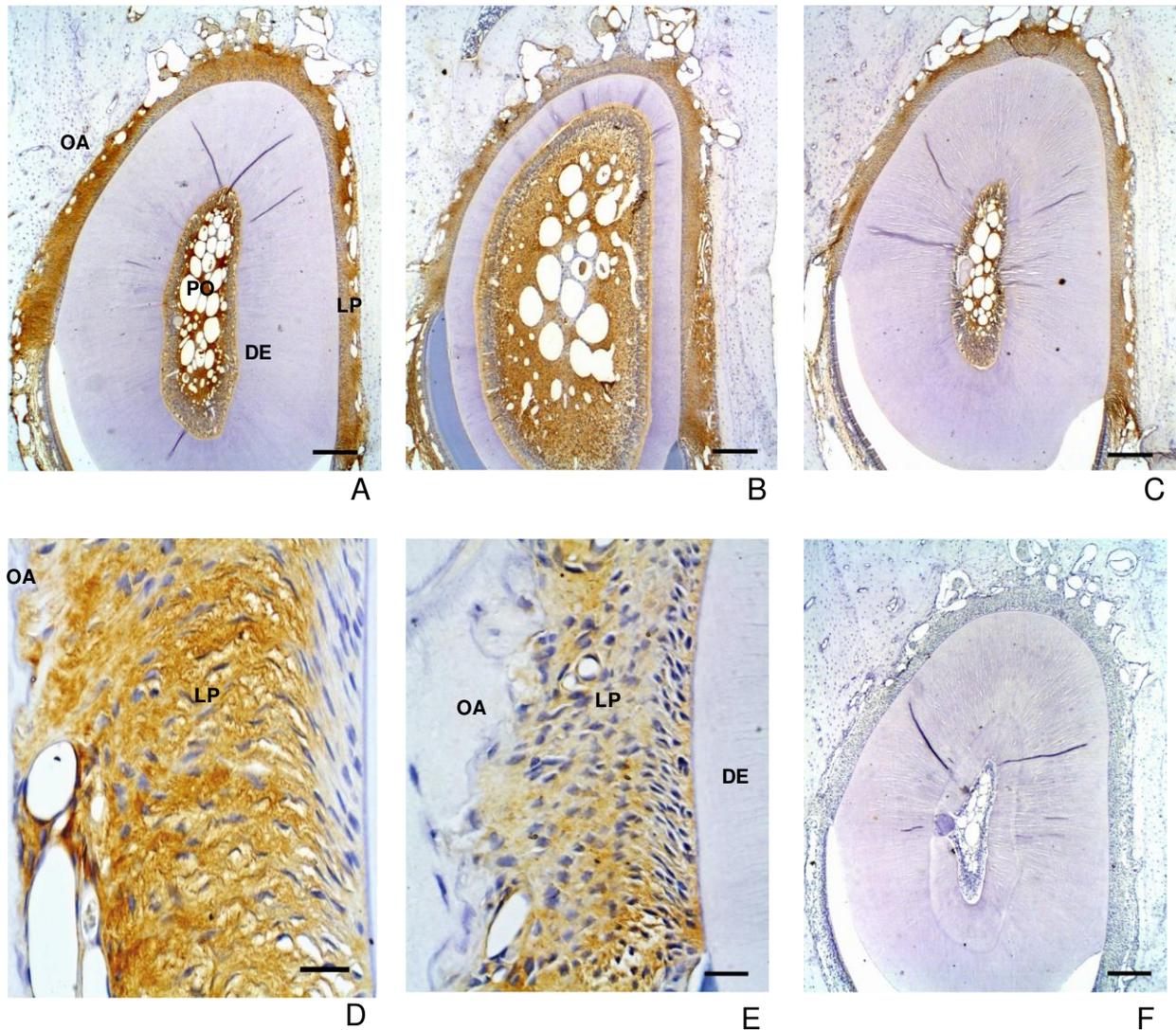


Figura 10 – Detecção imunohistoquímica de colágeno tipo 1 em cortes histológicos transversais de hemimandíbula de rato. A- incisivo normofuncional; B- incisivo hipofuncional por 14 dias; C- incisivo contido por 7 dias. D- Região distal do ligamento periodontal de incisivo normofuncional; E- região distal de ligamento periodontal de incisivo hipofuncional por 14 dias; F- controle negativo. LP, ligamento periodontal; DE, dentina; OA, osso alveolar, PO- polpa. Barra igual a 200µm (A, B, C e F); Barra igual a 20µm (D e E).

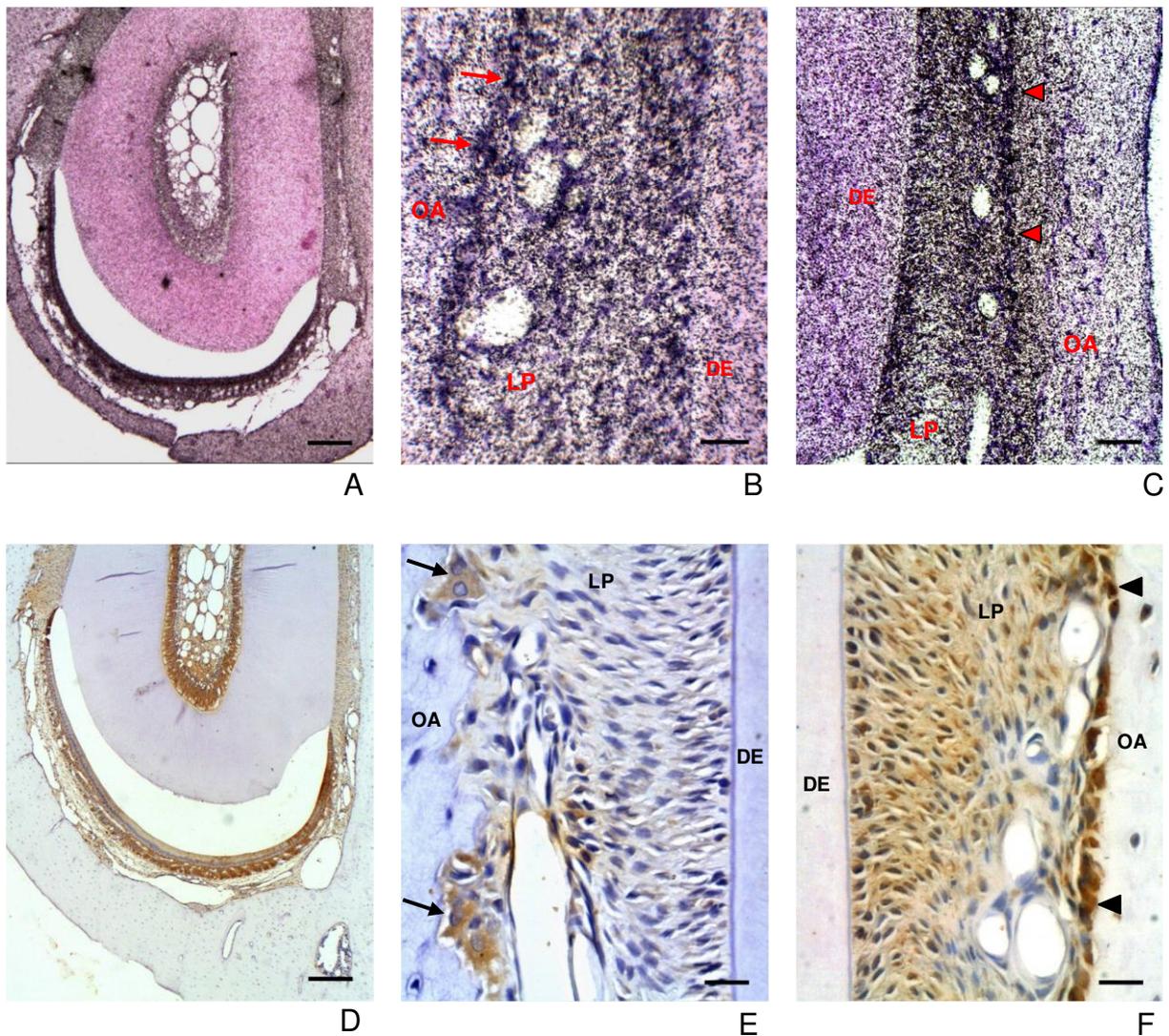


Figura 11 – Análise por hibridização *in situ* (A, B e C) e detecção imunohistoquímica de MMP-2 (D, E e F). A e D - incisivo normofuncional; B e E- Região distal do ligamento periodontal de incisivo normofuncional em B e hiperfuncional por 7 dias em E. C e F - Região mesial do ligamento periodontal de incisivo hiperfuncional por 7 dias em C e contido por 7 dias em F; As setas apontam para osteoclastos. As cabeças de seta apontam para osteoblastos. LP, ligamento periodontal; DE, dentina; OA, osso alveolar. Barra igual a 200 $\mu$ m (A e D). Barra igual a 50  $\mu$ m (C). Barra igual a 20 $\mu$ m (B, E e F).

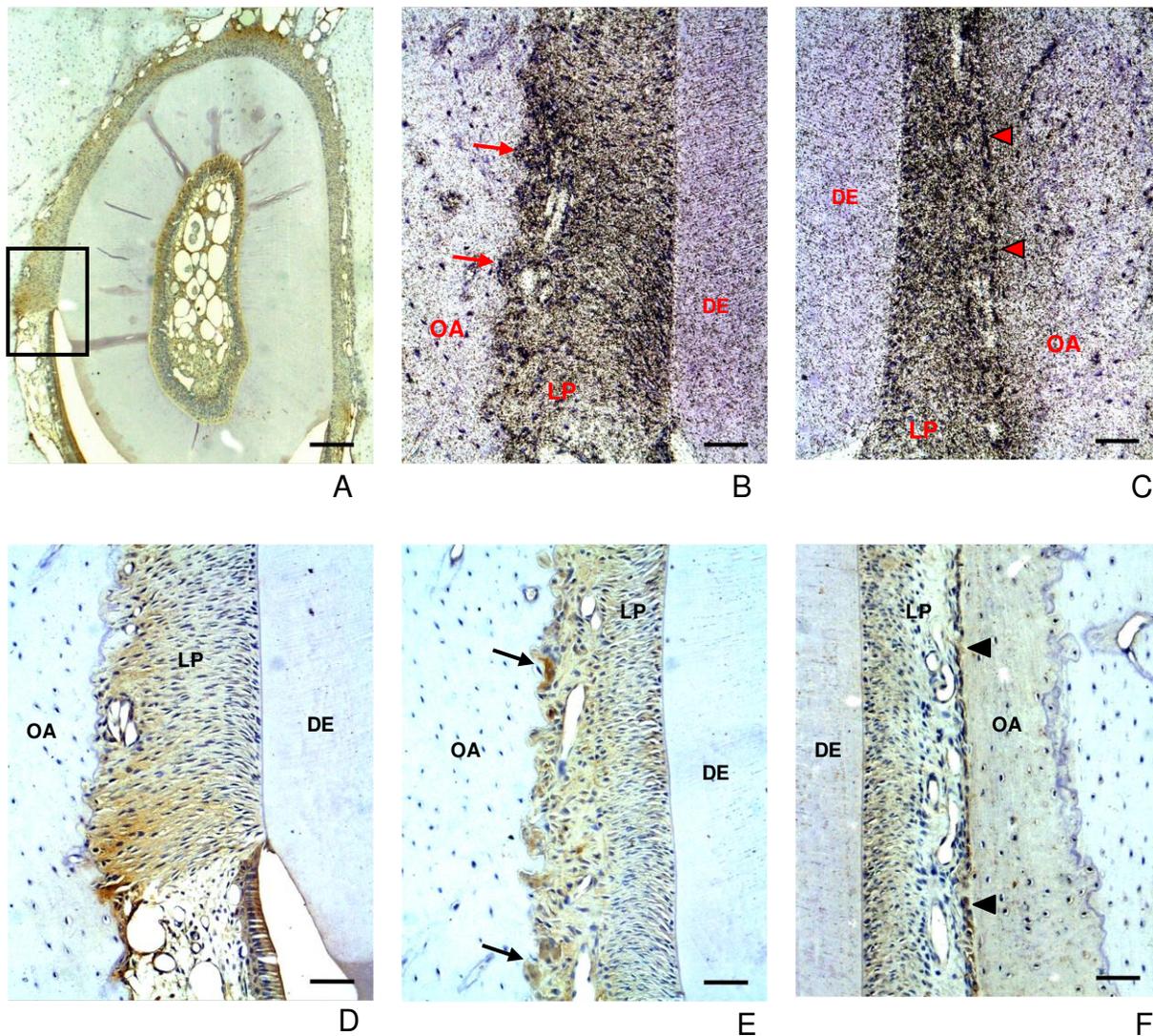


Figura 12 - Análise por hibridização *in situ* (B e C) e detecção imunohistoquímica de MMP-8 (A, D, E e F). A- Incisivo hiperfuncional por 14 dias; D- Região correspondente a imagem dentro do retângulo em A, distal do ligamento periodontal; B e E – Região distal do ligamento periodontal de incisivos hiperfuncionais por 7 dias; C e F - região mesial do ligamento periodontal de incisivos hiperfuncionais por 7 dias; As setas apontam para osteoclastos. As cabeças de seta apontam para osteoblastos. LP, ligamento periodontal; DE, dentina; OA, osso alveolar. Barra igual a 200 $\mu$ m (A); Barra igual a 50 $\mu$ m (B, C, D, E e F).

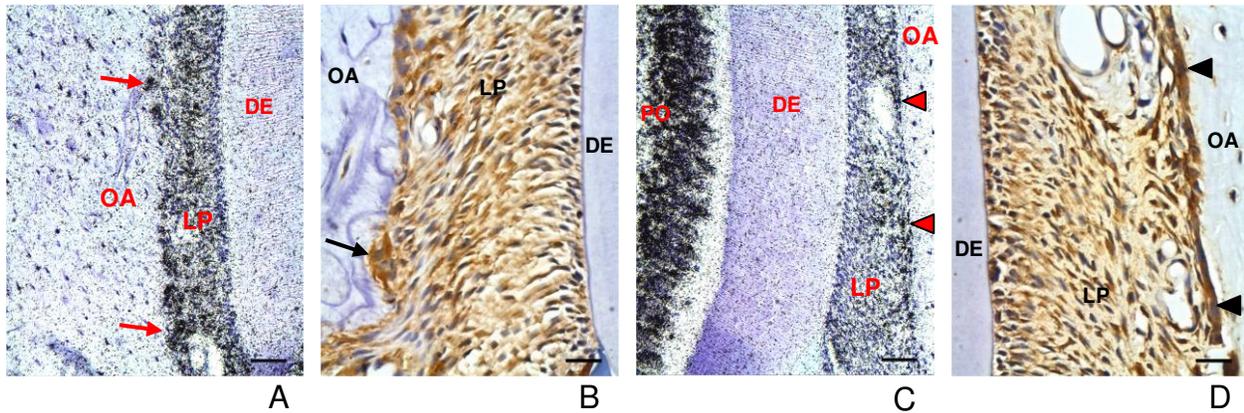


Figura 13 - Análise por hibridização *in situ* (A e C) e detecção imunohistoquímica de MMP-14 (B e D). A e B – Região distal do ligamento periodontal de incisivo hiperfuncional por 14 dias em A e hipofuncional por 14 dias em B; C e D – Região mesial do ligamento periodontal de incisivo hiperfuncional por 14 dias em C e hipofuncional por 14 dias em D. As setas apontam para osteoclastos. As cabeças de seta apontam para osteoblastos. LP, ligamento periodontal; DE, dentina; OA, osso alveolar, PO- polpa. Barra igual a 50µm (A e C); Barra igual a 20µm (B e D).

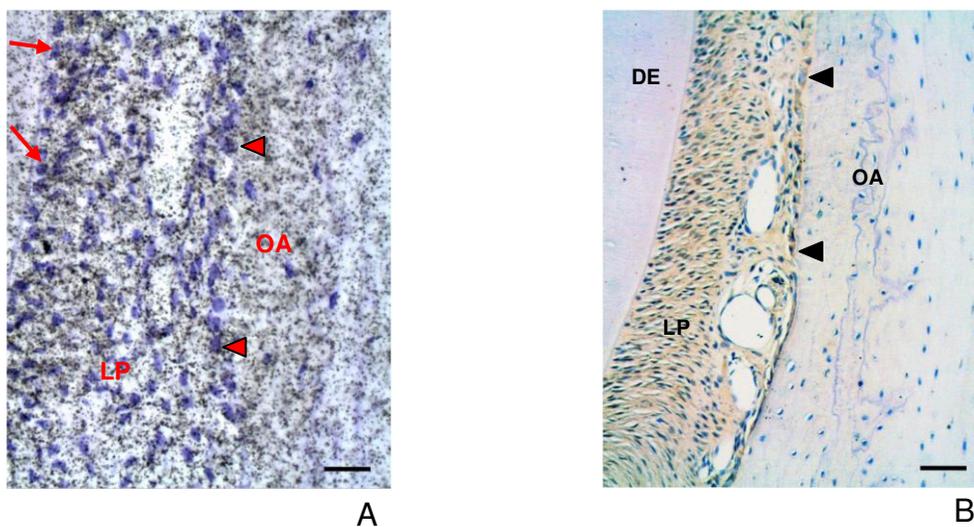


Figura 14 - Análise por hibridização *in situ* (A) e detecção imunohistoquímica de TIMP-1 (B). A e B – Região mesial do ligamento periodontal de incisivo hipofuncional por 14 dias em A e hiperfuncional por 7 dias em B. As setas apontam para cementoblastos. As cabeças de seta apontam para osteoblastos. LP, ligamento periodontal; DE, dentina; OA, osso alveolar. Barra igual a 50µm (B); Barra igual a 20µm (A).

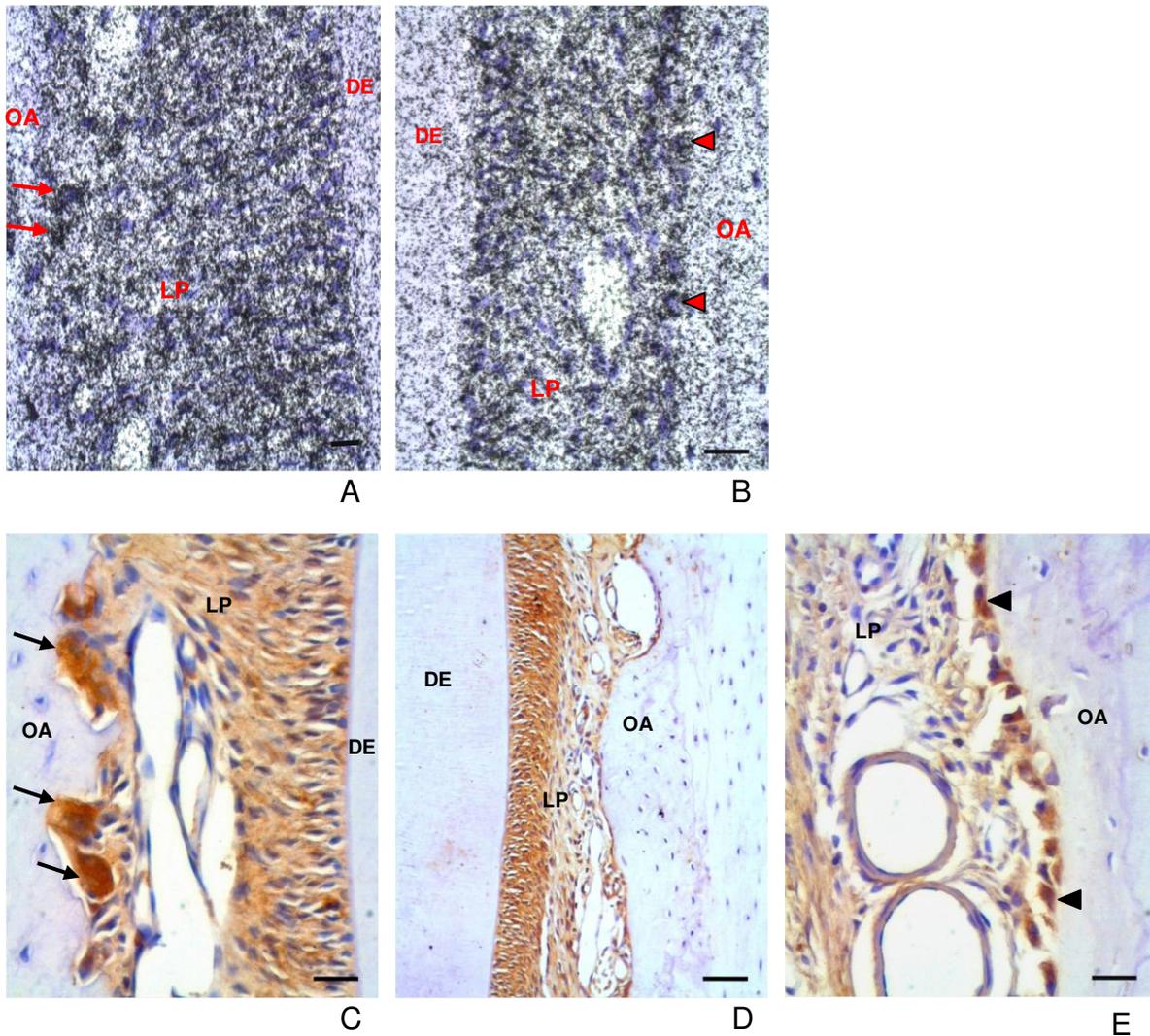


Figura 15 - Análise por hibridização *in situ* (A, B) e detecção imunohistoquímica de TIMP-2 (C, D e E). A e C – Região distal do ligamento periodontal de incisivos hiperfuncionais por 14 dias. B e D – Região mesial do ligamento periodontal de incisivo hipofuncional por 14 dias em B e hiperfuncional por 7 dias em D. E – Região mesial do ligamento periodontal de incisivo contido por 14 dias. As setas apontam para osteoclastos. As cabeças de seta apontam para osteoblastos. LP, ligamento periodontal; DE, dentina; OA, osso alveolar. Barra igual a 50 $\mu$ m (A, B, C, e E). Barra igual a 20 $\mu$ m (D).

## 5 DISCUSSÃO

Estudos prévios identificaram a presença das MMPs e TIMPs, analisadas neste trabalho, no ligamento periodontal, e demonstraram sua relação com a doença periodontal (Tervahartiala *et al*, 2000; Achong *et al*, 2003; Cury *et al*, 2007; Gürkan *et al*, 2007; Hernández *et al*, 2007; Kubota *et al*, 2008). Tais proteínas também foram relacionadas ao desenvolvimento dos dentes (Beertsen *et al*, 2002; Goldberg *et al*, 2003; Maruya *et al*, 2003; Yoshida *et al*, 2003; Tsubota *et al*, 2002; entre outros). Porém, pouco é conhecido sobre o envolvimento dessas proteínas na remodelação fisiológica do tecido periodontal e em condições funcionais alteradas em incisivos de ratos adultos.

A escolha do modelo experimental se deve à facilidade de manipulação do animal, à experiência prévia do presente grupo de pesquisa com o modelo e a dificuldade de execução da contenção em animais pequenos, como camundongos, ou em molares. Muitos estudos sobre erupção dental utilizaram os incisivos de rato como modelo, pois várias alterações dos fatores ligados ao movimento eruptivo, incluindo alterações no ligamento periodontal, podem ser facilmente produzidas nesses dentes (van den Bos & Tonino, 1984; Kirkham *et al*, 1993; Merzel *et al*, 2000a, 2000b; Gerlach *et al*, 2002; Salmon, 2004; Silva & Merzel, 2004). Alguns estudos mostraram que o movimento eruptivo pode ser muito acelerado na condição hipofuncional e a aplicação de forças mecânicas causa mudanças na taxa de erupção, alterações moleculares e na estrutura do ligamento periodontal (Steigman *et al*, 1989, 1993; Terespolsky *et al*, 2002; Takahashi *et al*, 2003; Redlich *et al*, 2004).

A coleta das amostras de tecido periodontal foi realizada por meio da extração dos incisivos inferiores, onde ocorre a separação do tecido em uma região intermediária entre o dente e o osso alveolar, conhecida como zona de cisalhamento. Para a análise quantitativa da expressão dos genes estudados, procurou-se evitar a coleta do ligamento periodontal ligado ao osso, onde são

encontrados osteoblastos e osteoclastos, e a presença de diversos vasos sanguíneos e nervos. Além disso, a raspagem de tecido calcificado seria inevitável e indesejável, pois poderia dificultar a extração do RNA. A coleta das amostras limitou-se assim, à porção do tecido periodontal ligado ao dente, onde observa-se a predominância de fibroblastos e cementoblastos.

Um volume muito pequeno de tecido foi obtido de cada dente durante a coleta das amostras de ligamento periodontal, gerando uma quantidade de RNA total extraído insuficiente para análise quantitativa da expressão dos genes no periodonto de um único animal. A cultura de células coletadas do tecido de dentes tratados poderia provocar mudanças no perfil de expressão dos genes e fornecer resultados que não representassem as alterações experimentais *in vivo*. Para solucionar esta questão foi decidido utilizar um “pool” de amostras de ligamento periodontal coletadas da superfície dos dentes tratados para proceder a extração do RNA total.

Os resultados obtidos demonstraram que as MMPs e TIMPs examinadas neste estudo foram expressas no ligamento periodontal normal e alterado dos incisivos de ratos. As proteínas foram localizadas no peridonto indicando claramente que as células do ligamento periodontal produzem tais metaloproteinases e seus inibidores. As células do ligamento periodontal estão provavelmente envolvidas tanto na produção quanto na degradação da matriz de colágeno pela expressão de Col-1 e MMPs.

A análise dos resultados da quantificação por meio do qPCR mostraram que as alterações dos níveis de mRNA ocorrem mais frequentemente no sentido da redução dos níveis de expressão dos genes estudados. Quando a redução dos níveis de mRNA foi significativa ( $p < 005$ ), ela foi observada nos grupos de 7 dias de tratamento. Apenas no grupo hipofuncional por 7 dias ocorreu um aumento significativo dos níveis de mRNA para MMP-2. O aumento dos níveis dos mRNAs estudados no ligamento periodontal foram observados no período de 14 dias de experimento, quando comparados aos grupos tratados por 7 dias. Para a MMP-8 e

MMP-14 parece haver uma correspondência entre as alterações dos níveis de mRNA das metaloproteinases e de seus inibidores, TIMP-1 e TIMP-2. Quando a expressão das MMPs foi reduzida com 7 dias de tratamento a expressão das TIMPs também reduziu, enquanto aos 14 dias ambos, enzimas e seu inibidores, aumentaram. Esses resultados parecem indicar uma tendência de recuperação da expressão para os níveis normais de MMPs e TIMPs após as mudanças causadas inicialmente pelos tratamentos.

Takahashi *et al* (2003), usando movimento ortodôntico em ratos, encontraram níveis aumentados de MMP-8 no ligamento periodontal no lado de tensão nos dias 4 e 7 de experimento, e nos dias 2 e 7 no lado de compressão. Foi demonstrado que em ambas as condições do ligamento periodontal, os níveis de MMP-8 retornaram aos níveis do controle após 14 dias de experimento. Redlich *et al* (2004) em estudo com cultura de fibroblastos do ligamento periodontal, observaram aumento da expressão de Col-1, MMP-1, TIMP-1 e 2, no período inicial de aplicação de pressão sob as células (após 60 minutos), e o retorno dos níveis normais de expressão após 90 minutos nas mesmas condições. Esses trabalhos mostraram que ocorrem picos de expressão ou picos de redução da expressão, e uma tendência de recuperação dos níveis de mRNA normal após um período de tempo de experimento.

As alterações das condições funcionais do incisivo parecem reduzir a expressão de Col-1 (Figura 9A) e a produção da proteína pelas células do ligamento periodontal (Figuras 10D e E). Os principais grupos afetados foram o hipofuncional e o contido por 7 dias, onde os níveis de Col-1 estavam significativamente reduzidos em relação ao normofuncional. Esses dados coincidem com os níveis mais altos de mRNA para MMP-2 encontrados nos mesmos grupos, enquanto a MMP-8 e MMP-14, mantiveram os níveis normais ou redução não significativa. Podemos sugerir então, que a MMP-2 pode ter um papel importante na degradação do Col-1 quando as condições funcionais dos incisivos são alteradas (Figuras 9 A e B).

Durante a extração dos incisivos para a coleta das amostras foi possível observar que os incisivos hipofuncionais e contidos por 7 e 14 dias necessitam de uma intensidade de força muito menor para sua extração comparado com o normofuncional, e corroboram com os resultados obtidos pela quantificação de mRNA para Col-1 e MMP-2.

O Col-1 foi localizado no ligamento periodontal, mostrando maior intensidade de marcação na porção do ligamento periodontal mais próxima ao osso, indicando uma maior presença da proteína nesta região. A detecção de osteoclastos e osteoblastos intensamente marcados pela MMP-2, MMP-8 e MMP-14 sugere que essas enzimas participam do processo de remodelação do osso alveolar, e está de acordo com estudos anteriores (Sato *et al*, 1997; Maruya *et al*, 2003; Hatori *et al*, 2004; Takahashi *et al*, 2006). Em regiões de constante reabsorção do osso alveolar, como na distal dos incisivos, pode ocorrer a liberação de fibras de Sharpey e simultaneamente, a inserção de novas fibras nas áreas de aposição óssea para a manutenção do suporte do dente permitindo a sua movimentação contínua no sentido apical.

A TIMP-2 foi mais intensamente detectada na porção do ligamento junto ao dente. O inibidor de metaloproteinase TIMP-2 pode conferir um fator de proteção de degradação da matriz extracelular pelas metaloproteinases, para o ligamento periodontal junto ao dente. Esta característica parece contribuir para a manutenção da estrutura de suporte do dente, protegendo as fibras de Sharpey ligadas ao cemento acelular. Desta maneira, podemos sugerir que a remodelação do ligamento periodontal ocorre de maneira diferente nas porções ligadas ao osso e ao dente, e parece ser mais intensa na região próxima ao osso alveolar.

A MMP-8 foi localizada no periodonto e sua expressão foi identificada nos fibroblastos do ligamento periodontal, osteoblastos, osteoclastos e cementoblastos. Esses resultados estão de acordo com os do estudo de Tsubota *et al* (2002) em molares de rato durante a erupção dental. Entretanto, diferem dos encontrados por Takahashi *et al* (2003), que demonstraram a expressão de MMP-

8 pelos cementoblastos, mas não por outros tipos celulares no ligamento periodontal de molares de ratos sob forças ortodônticas.

Tsubota et al (2002) demonstraram por hibridização *in situ* que a maior intensidade de expressão de MMP-8 no ligamento periodontal está co-localizada com a expressão de Col-1 e de colágeno tipo III, sugerindo que a MMP-8 tem um importante papel na organização da matriz de colágeno na formação do ligamento periodontal e durante a erupção dental. Nesse estudo, a MMP-8 teve os níveis de mRNA reduzidos de forma significativa nos grupos contidos por 7 e 14 dias, enquanto seu inibidor TIMP-1, possui os níveis mais altos de expressão para os mesmos grupos (Figuras 9E e F). Essa diferença sugere que no grupo contido a função de degradação de Col-1 pela MMP-8 pode ter sido inibida pela TIMP-1. Esses achados podem indicar que a atividade da MMP-8 tem um papel importante durante a movimentação dental ou em condições funcionais alteradas. No grupo contido, o incisivo tem sua erupção ou movimentação impedida e, portanto a ação da MMP-8 poderia ser desnecessária.

Além da degradação pelas MMPs, as fibras colágenas do ligamento periodontal podem também sofrer fagocitose pelos fibroblastos (van der Pauw *et al*, 2001), terminando com degeneração por catepsinas e outros tipos de enzimas lisossomais (Domon *et al*, 1999).

Outros fatores, como os relacionados à forças aplicadas às células do ligamento periodontal, também podem contribuir para a alteração da expressão de Col-1, MMPs e TIMPs no periodonto. Takahashi *et al* (2003), demonstraram que forças de compressão e de tensão no ligamento periodontal podem alterar os níveis de mRNA para a MMP-8. Redlich *et al* (2004), também observaram aumento da expressão de Col-1, MMP-1, TIMP-1 e TIMP-2 em cultura de células do ligamento sob força de pressão.

A alteração das forças aplicadas ao dente parecem ter um efeito na estrutura e no metabolismo do ligamento peridontal. Os dentes hipofuncionais, estando fora de contato com o seu antagonista, permanecem livres de forças

---

oclusais que podem provocar um desarranjo das fibras colágenas. Devemos considerar a hipótese que de somente a redução da expressão de Col-1 no periodonto poderia por si só afetar a estrutura de suporte do dente. Entretanto, ocorre também o aumento da degradação da matriz extracelular pela MMP-2 no período de 7 dias. Esses fatores causam uma menor resistência do ligamento periodontal às forças eruptivas, contribuindo para a aceleração da taxa de erupção do incisivo.

A diminuição de colágeno extracelular no ligamento periodontal tinha sido demonstrada por Beertsen & Everts (1977) em incisivos de camundongos desimpedidos (hipofuncionais). A redução na expressão de Col-1 poderia induzir a uma redução também nos níveis de MMPs e TIMPs no ligamento periodontal. Segundo Takahashi *et al* (2003), desde que a remodelação do ligamento periodontal pelas MMPs requer a produção de fibras colágenas, a expressão de Col-1 e MMPs devem estar correlacionadas.

Nos incisivos contidos o metabolismo de colágeno pode estar reduzido por causa do impedimento do movimento do dente. A produção de colágeno e a degradação poderiam ser diminuídos, já que o dente não irá para uma nova posição. As reflexo das forças mastigatórias não chegariam ao ligamento periodontal, pois o incisivo permanece fixado pelo fio ortodôntico utilizado para a contenção. Assim, as fibras do ligamento periodontal podem estar desorganizadas e a remodelação da matriz reduzida de forma semelhante aos dentes hipofuncionais. Isto poderia explicar a utilização de uma força menor para a extração dos incisivos dos grupos hipofuncional e contido em relação aos incisivos normofuncionais.

Ainda não está claro qual mecanismo de remodelação do colágeno é relevante, mas provavelmente ambos, fagocitose por fibroblastos ou ou degração pelas MMPs, podem contribuir com a remodelação fisiológica do ligamento periodontal. Estudos futuros sobre a dinâmica da atividade das MMPs e TIMPs sobre a degradação da matriz de colágeno no ligamento periodontal, incluindo a

análise de outros períodos de experimento, poderiam contribuir para esclarecer qual o papel dessas enzimas logo após o início das alterações das condições funcionais dos incisivos de ratos e após longos períodos experimentais.

## 6 CONCLUSÃO

1. O presente estudo demonstrou a expressão de Col-1, MMP-2, MMP-8, MMP-14, TIMP-1 e TIMP-2 e sua localização em fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos, osteoclastos, no ligamento periodontal de incisivos de ratos em condições funcionais normal e alteradas.
2. As MMPs e TIMPS parecem ter um importante papel no balanço entre a produção e a degradação da matriz extracelular do ligamento periodontal de dentes de erupção contínua (incisivos de ratos).
3. A alteração das condições funcionais do incisivo de ratos causa uma modificação na expressão de mRNA de Col-1, MMPs e TIMPs, apresentando picos de expressão ou redução da expressão com tendência de retorno à normalidade ao longo do tempo.

---

**REFERÊNCIAS\***

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

Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. *J Biol Chem*. 1995; 270(11): 5872-6.

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

Barros SP. Estudo morfológico ultraestrutural da matriz extracelular do ligamento periodontal do incisivo inferior de ratos, em diferentes regiões e zonas, nas condições de erupção impedida, desimpedida e retardada pela vimblastina. [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP, 1995.

Beertsen W, Everts V. The site of remodelling of collagen in the periodontal ligament of the mouse incisor. *Anat Rec*. 1977; 189(3): 479-97.

Beertsen W, Holmbeck K, Niehof A, Bianco P, Chrysovergis K, Birkedal-Hansen H, Everts V. On the role of MT1-MMP, a matrix metalloproteinase essential to collagen remodeling, in murine molar eruption and root growth. *Eur Oral Sci*. 2002; 110(6): 445-51.

Beertsen W, Holmbeck K, Niehof A, Bianco P, Chrysovergis K, Birkedal-Hansen H, Everts V. Inhibition of molar eruption and root elongation in MT1-MMP-deficient mice. *Connect Tissue Res*. 2003; 44 (Suppl) 1: 298-9.

Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol*. 1993; 64(5 Suppl):474-84. Review.

Carneiro J, De Moraes FF. Radioautographic visualization of collagen metabolism in periodontal tissues of the mouse. *Archs Oral Biol*. 1965; 10(6):833-48.

---

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

Chiba M, Ohshima S, Kuroda T, Ohkawa S. Effects of repeated shortenings and of artificial restraint on the rat tensile strength of the periodontium of the rat mandibular incisor. *Arch Oral Biol.* 1981; 26: 135-41.

Cury PR, Araújo VC, Canavez F, Furuse C, Araújo NS. Hydrocortisone affects the expression of matrix metalloproteinases (MMP-1, -2, -3, -7, and -11) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP-1) in human gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 2007;78(7):1309-15.

Cury PR, de Araújo VC, Canavez F, Furuse C, Leite KR, de Araújo NS. The effect of epidermal growth factor on matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase gene expression in cultured human gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(6):585-90.

Domon S, Shimokawa H, Matsumoto Y, Yamaguchi S, Soma K. In situ hybridization for matrix metalloproteinase-1 and cathepsin K in rat root-resorbing tissue induced by tooth movement. *Arch Oral Biol.* 1999; 44(11):907-15.

Emonard H, Grimaud JA. Matrix metalloproteinases. *Cell Mol Biol.* 1990; 36(2): 131-153,. Review.

Gerlach RF, Toledo DB, Fonseca RB, Novaes PD, Line SR, Merzel J. Alveolar bone remodelling pattern of the rat incisor under different functional conditions as shown by minocycline administration. *Arch Oral Biol.* 2002; 47(3): 203-9.

Goldberg M, Septier D, Bourd K, Hall R, George A, Goldberg H, Menashi S. Immunohistochemical localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in the forming rat incisor. *Connect Tissue Res.* 2003; 44(3-4):143-53.

Gürkan A, Emingil G, Saygan BH, Atilla G, Cinarcik S, Köse T, Berdeli A. Matrix metalloproteinase-2, -9, and -12 gene polymorphisms in generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2007; 78(12):2338-47.

Hatori K, Sasano Y, Takahashi I, Kamakura S, Kagayama M, Sasaki K. Osteoblasts and osteocytes express MMP2 and -8 and TIMP1, -2, and -3 along with extracellular matrix molecules during appositional bone formation. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004; 277(2):262-71.

Hernández M, Martínez B, Tejerina JM, Valenzuela MA, Gamonal J. MMP-13 and TIMP-1 determinations in progressive chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2007; 34(9):729-35.

Johnson LL, Dyer R, Hupe DJ. Matrix metalloproteinases. *Curr Opin Chem Biol.* 1998; 2(4):466-71. Review.

Kirkham J, Robinson C, Phull JK, Shore RC, Moxham BJ, Berkovitz BK. The effect of rate of eruption on periodontal ligament glycosylaminoglycan content and enamel formation in the rat incisor. *Cell Tissue Res.* 1993; 274(2): 413-9.

Kirkham J, Robinson C, Phull, JK, Shore RC, Moxham BJ, Berkovitz BKB. The effect of rate of eruption on periodontal ligament glycosaminoglycans content and enamel formation in the rat incisor. *Cell Tissue Res.* 1993; 274(2): 413-19.

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

Kubota T, Itagaki M, Hoshino C, Nagata M, Morozumi T, Kobayashi T, Takagi R, Yoshie H. Altered gene expression levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in periodontitis-affected gingival tissue. *J Periodontol.* 2008; 79(1):166-73.

Maruya Y, Sasano Y, Takahashi I, Kagayama M, Mayanagi H. Expression of extracellular matrix molecules, MMPs and TIMPs in alveolar bone, cementum and periodontal ligaments during rat tooth eruption. *J Electron Microsc.* 2003; 52(6):593-604.

Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution and diversification. *FASEB J.* 1998; 12(12): 1075-95.

Matena V. The periodontium of the enamel aspect of the rat incisor. *J Periodontol.* 1972; 43(5):311-5.

Matrisian LM. The matrix degrading metalloproteinases. *Bioessays.* Cambridge, 1992; 14(7):455-63. Review.

Merzel J, Novaes PD, Furlan S. A histological study of root-resected and root-transsected rat incisors when erupting ceases, shortly before they are exfoliated from the socket. *Arch Oral Biol.* 2000a; 45(4):315-22.

Merzel J, Novaes PD, Furlan S. The effects of local trauma to the enamel-related periodontal tissues in the eruption of the rat incisor. *Arch Oral Biol.* 2000b; 45(4): 323-33.

Moxham BJ, Berkovitz BKB. A quantitative assesment of the effects of axially directed extrusive loads on displacement of the impeded and unimpeded rabbit mandibular incisor. *Arch Oral Biol.* 1981; 26(3):209-15.

Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006; 69(3):562-73. Review.

Nagase H, Woesser JRJr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999; 274(31):21491-4. Review.

Redlich M, Roos H, Reichenberg E, Zaks B, Grosskop A, Bar Kana I, Pitaru S, Palmon A. The effect of centrifugal force on mRNA levels of collagenase, collagen type-I, tissue inhibitors of metalloproteinases and  $\beta$ -actin in cultured human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodont Res.* 2004; 39(1):27-32.

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

Salmon CR. Remodelação óssea do peridonto de incisivo de rato em erupção normal e alterada: estudo com marcadores fluorescente [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2004.

Sasano Y, Zhu JX, Tsubota M, Takahashi I, Onodera K, Mizoguchi I, Kagayama M. Gene expression of MMP-8 and MMP-13 during embrionic development of bone and cartilage in the rat mandible and hind limb. *J Histochem Cytochem.* 2002; 50(3):325-32.

Sato T, del Carmen Ovejero M, Hou P, Heegaard AM, Kumegawa M, Foged NT, Delaissé JM. Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts. *J Cell Sci.* 1997; 110(5):589-96

Schellens JPM, Everts V, Beertsen W. Quantitative analysis of connective tissue resorption in the supra-alveolar region of the mouse incisor ligament. *J Periodont Res.* 1982; 17(4): 407-22.

Silva MA, Merzel J. Alveolar bone Sharpey fiber of the rat incisor in normal and altered functional conditions examined by scanning electron microscopy. *Anat Rec.* 2004; 279(2): 792-7.

Sodek J. A comparison of the rates of synthesis and turnover of collagen and non-collagen proteins in adult rat periodontal tissues and skin using a microassay. *Archs Oral Biol.* 1977; 22(12):655-65

Steigman S, Boym R, Weinreb M, Michaeli Y. Dynamics of tissue changes found after mechanical loading of the rat incisor. II. A three-dimensional longitudinal study of the histopathologic aspects. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1993; 104(5): 492-505.

Steigman S, Michaeli Y, Yitzhaki M, Weinreb M. A three-dimensional evaluation of the effects of functional occlusal forces on the morphology of dental and periodontal tissues of the rat incisor. *J Dent Res.* 1989; 68(8): 1269-74.

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

Takahashi I, Onodera K, Bae JW, Mitani H, Sasano Y, Mitani H. Age-related changes in the expression of gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in mandibular condylar, growth plate, and articular cartilage in rats. *J Mol Histol.* 2005; 36(5):355-66.

Takahashi I, Onodera K, Nishimura M, Mitnai H, Sasano Y, Mitani H. Expression of genes for gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontal tissues during orthodontic tooth movement. *J Mol Histol.* 2006; 37(8-9):333-42.

Terespolsky MS, Brin I, Harari D, Steigman S. The effect of functional occlusal forces on orthodontic tooth movement and tissue recovery in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2002; 121(6): 620-8.

Tervahartiala T, Pirilä E, Ceponis A, Maisi P, Salo T, Tuter G, Kallio P, Törnwall J, Srinivas R, Konttinen YT, Sorsa T. The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2, -8, -13, and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res.* 2000;79(12):1969-77.

Tsubota M, Sasano Y, Takahashi I, Kagayama M, Shimauchi H. Expression of MMP-8 and MMP-13 mRNAs in rat periodontium during tooth eruption. *J Dent Res.* 2002; 81(10): 673-78.

van den Bos, Tonino GJM. Composition and metabolism of the extracellular matrix in the periodontal ligament of impeded and unimpeded rat incisors. *Arch Oral Biol.* 1984;29(11):893-7

van der Pauw MT, Van den Bos T, Everts V, Beertsen W. Phagocytosis of fibronectin and collagens type I, III, and V by human gingival and periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J Periodontol.* 2001;72(10):1340-7.

Yoshihara N, Yoshihara K, Stoetzel C, Perrin-Schmitt F, Cam Y, Ruch JV, Lesot H. Temporospatial gene expression and protein localization of matrix metalloproteinases and their inhibitors during mouse molar tooth development. *Dev Dyn.* 2003;228(1):105-12.

Zucker S, Hymowitz M, Conner C, DeClerck Y, Cao J. TIMP-2 is released as an intact molecule following binding to MT1-MMP on the cell surface. *Experimental Cell Research.* 2004; 293(1):164-74.

**ANEXO**



**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 659-1, sobre "**EXPRESSION DE mRNAs DE COLÁGENO TIPO I, MMP-2, MMP-8 E MT-1MMP NO LIGAMENTO PERIODONTAL DE INCISIVOS DE RATOS EM CONDIÇÕES FUNCIONAIS NORMAIS E ALTERADA**" sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes / Cristiane Ribeiro Salmon** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 06 de Maio de 2004.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº 659-1, entitled "**nRNAs EXPRESSION OF COLLAGEN TYPE 1, MMP-2, MMP-8 E MT-1-MMP IN THE PERIODONTAL LIGAMENT OF RAT INCISORS IN NORMAL AND ALTERED FUNCIONAL CONDITIONS**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on May 6, 2004.

Campinas, 06 de Maio de 2004.

Profa. Dra. Liana Verinaud  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso  
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

12/05/2004