

GILBERTO CARLOS TIANO

**Estudo da expressão de MMP-2 e MMP-9 por
fibroblastos gengivais de camundongos
estimulados por NaF via NF- κ B, p44/42, p38 e PI3K**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira

Araçatuba
2007

Dedico este trabalho:

À minha MARAVILHOSA esposa, **Ana Valéria**, quem eu amo muito, pelo incentivo nos momentos mais difíceis que passei, pela valiosa ajuda em várias situações e pela paciência que teve comigo em muitas ocasiões. O meu maior desafio foi abdicar de nossa convivência diária, quando cada minuto de ausência parecia uma eternidade.

Aos meus pais, **Gilberto e Ana**, exemplos do que é um alicerce dentro da família, que tudo fizeram nesta vida para que nunca não nos faltasse nada, com muito amor, respeito e dignidade.

Agradeço especialmente,

À Deus, por estar presente em todos os momentos de minha vida, ainda que às vezes tenha questionado algumas de Suas escolhas. Hoje não tenho dúvidas que me guiou pelo melhor caminho, me concedendo a benção de ser feliz.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Sandra Helena Penha de Oliveira, pela confiança em mim depositada, pela eficiência, firmeza, profissionalismo com que me conduziu na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, responsável pelo meu início na Odontopediatria, exemplo incontestável de professor, orientador, pessoa iluminada, inteligente, sempre pronto a ajudar a quem o procura, além é claro de ser um grande amigo.

Aos meus irmãos, Marcos, Priscila e Leonardo, pelo apoio constante, pelo carinho e incentivo.

Aos meus avôs José, Ana e Rosa por torcerem e acreditar em mim.

À minha segunda família, Jorge e Ana Neri; Gerônimo e Iara pelo incentivo, força e orações pelo meu sucesso.

À Lourdes Prando, por quem eu tenho muito carinho e respeito, pelos bons momentos compartilhados, apoio e incentivo durante a realização deste trabalho.

Meus agradecimentos,

Ao Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé e à Profa. Dra. Ana Maria Pires Soubhia, Diretor e Vice-diretora da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Araçatuba.

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Prof. Dr. Célio Percinoto, Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, Profa. Dra. Sandra M. H. C. Ávila de Aguiar e Profa. Dra. Rosângela dos Santos Nery.

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, pela amizade e companheirismo durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca da UNESP – Araçatuba, pela paciência e disposição.

À Marina, Valéria e Diogo da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP pela atenção e paciência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste trabalho (processo nº 06/54098-8).

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, chefe do laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP por permitir a utilização do laboratório para realização dos ensaios ELISA.

Aos funcionários da Disciplina de Odontopediatria, Maria dos Santos Ferreira Fernandes, Mário Luís da Silva, Maria Bertolina Mesquita de Oliveira e Cleide da Silva Oliveira, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos meus colegas da turma de Mestrado, Carolina, Adriana, Vanessa e Renata, pela convivência e troca de experiências.

A todos os colegas do curso de Pós-graduação em Odontopediatria pela convivência amigável e momentos de descontração.

A todos, que de alguma forma participaram na realização deste trabalho...

... meu muito obrigado.

**"Se queremos progredir, não
devemos repetir a história, mas
fazer uma nova história"**

Gandhi

Tiano GC. Estudo da expressão de MMP-2 e MMP-9 por fibroblastos gengivais de camundongos estimulados por NaF via NF- κ B, p44/42, p38 e PI3K (Dissertação). Araçatuba: Unesp – Universidade Estadual Paulista; 2007.

RESUMO

O declínio mundial da cárie dentária é atribuído ao uso abrangente do flúor. Embora esse elemento seja capaz de proteger os dentes, seu uso excessivo pode levar a uma ação citotóxica causando a inibição do crescimento celular, da síntese de proteínas e até mesmo a morte celular. O primeiro objetivo deste estudo foi investigar a concentração ideal do NaF (NaF) capaz de ativar os fibroblastos gengivais de camundongos sem induzir morte celular. Observou-se que, nesses fibroblastos, a concentração de 40 μ g F/mL induziu morte celular de 62,6 %. Na concentração de 20 μ g F/mL a morte celular foi de apenas 22,1%. Com base nesses resultados, optou-se por utilizar a concentração de 20 μ g F/mL como dose máxima para investigar os mecanismos envolvidos na ativação dos fibroblastos gengivais. Dessa forma, avaliou-se a capacidade do NaF induzir a expressão de MMP-2 e MMP-9 pelos fibroblastos gengivais de camundongos na presença ou ausência de LPS, assim como a produção da quimiocina CCL-3/MIP-1 α e óxido nítrico. Avaliou-se também a participação das vias de sinalização intracelular p44/42, p38, PI3K e NF- κ B envolvidas durante essa ativação, por meio da utilização dos respectivos inibidores PD98059 (50 μ M), SB202190 (10 μ M), LY294002 (30 μ M) e dexametasona (10 μ M). Observou-se que o NaF foi capaz

de estimular os fibroblastos gengivais a expressarem MMP-9, mas não MMP-2, na concentração de 20 µg F/mL com pico máximo 6 horas após, retornando aos níveis normais 24 horas após. A produção da quimiocina CCL3/MIP-1α pelos fibroblastos estimulados pelo NaF também foi observada com a concentração de 20 µg F/mL com pico máximo 6 horas após estímulo. Na presença de LPS, observou-se uma potenciação da expressão de MMP-9 e produção de CCL3/MIP-1α na concentração de 20 µg F/mL, 6 horas após. O pré-tratamento com o inibidor PD98053 (p44/42) e com a dexametasona (NF-κB) foi capaz de inibir a expressão de MMP-9 pelos fibroblastos gengivais estimulados por NaF na presença e ausência de LPS. A produção de CCL3/MIP-1α foi inibida nos fibroblastos gengivais tratados com os inibidores PD98059 (p44/42), SB 202190 (p38), LY294002 (PI3K) e Dexametasona (NF-κB). Em conclusão, o NaF foi capaz de promover tanto a expressão de MMP-9 como a produção de CCL3/MIP-1α pelos fibroblastos gengivais, sendo que a ativação dessa metaloproteinase ocorreu via p44/42 e NF-κB. A produção de CCL-3/MIP-1α foi ativada pelas vias p44/42, p38, PI3K e NF-κB.

Palavras-chave: NaF. Matriz Metaloproteinase. Quimiocinas.

Tiano GC. Study of the expression of MMP-2 and MMP-9 by gingival fibroblasts of mice stimulated by sodium fluoride through NF- κ B, p44/42, p38 and PI3K (Dissertation). Araçatuba: Unesp – São Paulo State University; 2007.

ABSTRACT

The worldwide decline of the dental caries is attributed to the widespread use of fluoride. Although this element is capable of protecting the teeth, its excessive use, can lead to a cytotoxic action, causing an inhibition of the cell growth, of the protein synthesis and even the cellular death. Based on these results, we have chosen to use a concentration of 20 μ g F/mL as maximum concentration to investigate the mechanisms involved in the activation of the gingival fibroblasts. It was observed that, on those fibroblasts, the concentration of 40 μ g F/mL has resulted in a death cellular index of 62.6%. In the concentration of 20 μ g F/mL the cellular death was of 22.1% only. Based on these results, the concentration of 20 μ g F/mL has been chosen as maximum concentration to investigate the mechanisms involved in the activation of the gingival fibroblasts. Later, the ability of NaF to induce the expression of MMP-2 and MMP-9 in gingival fibroblasts of mice in the presence or absence of LPS has been assessed, as well as the production of chemokine CCL-3/MIP-1 α and nitric oxide. It also evaluated the participation of intracellular signaling pathways p44/42, p38, PI3K e NF- κ B involved in this activation, through inhibitors PD98059 (50 μ M), SB202190 (10 μ M), LY294002 (30 μ M) e dexamethasone (10 μ M). It was observed that the NaF was capable to

stimulate the gingival fibroblasts to express MMP-9, at the concentration of 20 µgF/mL with maximum peak 6 hours after, returning to normal levels 24 hours after. The expression of MMP-2 was not observed. The production of chemokine CCL3/MIP-1α was also observed with the concentration of 20 µgF/mL with maximum peak 6 hours after the stimulation. In the presence of LPS, it was observed an intensification in the expression of MMP-9 and also in the production of CCL3/MIP-1α at the concentration of 20 µgF/mL, 6 hours later. The pre-treatment with the PD98053 inhibitor (p44/42) and with dexamethasone (NF-κB) was capable to inhibit the expression of MMP-9 in gingival fibroblasts stimulated by NaF in the presence and absence of LPS. The production of CCL3/MIP-1α has been inhibited in fibroblasts treated with the inhibitor PD98059 (p44/42), SB202190 (p38), LY294002 (PI3K) and Dexamethasone (NF-κB). In conclusion, the NaF was able to promote the expression of MMP-9 and also the production of CCL3/MIP-1α in gingival fibroblasts and the activation of this metalloproteinase have been occurred by means of p44/42 and NF-κB. The production of CCL-3/MIP-1α has been activated through p44/42, p38, PI3K and NF-κB.

Key-words: Sodium fluoride. Matrix metalloproteinase. Chemokines.

Lista de Figuras

Figura 1	Efeito citotóxico do NaF nos fibroblastos gengivais estimulados nas concentrações de 1, 5, 10, 20 e 40 µg F/mL e grupo controle (C), estimulados 6, 24 e 48 horas.	47
Figuras 2A, B e C	Expressão de RNAm para MMP-2 e MMP-9 em fibroblastos gengivais estimulados pelo NaF nas concentrações 1, 5, 10 e 20 µg F/mL e grupo controle.	49
Figura 3A, B E C	Expressão de RNAm para CCL3/MIP-1α em fibroblastos gengivais estimulados por NaF nas concentrações 1, 5, 10 e 20 µg F/mL e grupo controle.	51
Figuras 4	Produção de CCL3/MIP-1α nos sobrenadantes de fibroblastos gengivais estimulados por NaF nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 µg F/mL e grupo controle (c) após 1, 6 e 24 horas de estímulo.	53
Figura 5	Expressão de RNAm para MMP-2 e MMP-9 em fibroblastos gengivais estimulados por 6 horas com NaF (20 µg F/mL) na presença ou ausência de LPS (10 µg/mL).	55
Figura 6	Expressão de RNAm para CCL3/MIP-1α pelos fibroblastos gengivais estimulados por NaF (20 µg/mL) na presença ou ausência de LPS (10 µg/mL) no tempo de 6 horas.	57
Figura 7	Produção de CCL3/MIP-1α nos sobrenadantes de fibroblastos gengivais estimulados por NaF (20 µg/mL) na ausência ou presença de LPS (10 µg/mL) no tempo de 6 horas.	59
Figura 8	Expressão de RNAm para MMP-9 de fibroblastos gengivais pré-tratados com inibidores e estimulados por 6 horas com NaF (20 µg F/ml) na presença ou ausência de LPS (10 µg/ml).	61
Figura 9	Expressão de RNAm para CCL3/MIP-1α de fibroblastos gengivais pré-tratados com inibidores e estimulados por 6 horas com NaF (20 µg F/ml) na presença ou ausência de LPS (10 µg/ml).	63
Figura 10	Produção de CCL3/MIP-1α nos sobrenadantes de fibroblastos gengivais pré-tratados com os inibidores e estimulados por 6 horas com NaF (20 µg F/mL) na presença ou ausência de LPS (10 µg/ml).	65

Lista de Tabelas

Tabela 1	<i>Primers</i> utilizados na PCR para os diferentes alvos e tamanhos antecipados dos produtos de amplificação	40
Tabela 2	Pré-tratamento com diferentes inibidores	42

LISTA DE ABREVIATURAS

% = Por cento

® = Marca comercial registrada

CO₂ = Gás carbônico

cDNA = Ácido desoxirribonucléico cromossomal

DMEM = "Dulbecco's Modified Eagle's Médium – Meio de Eagle modificado por Dulbecco

ELISA = Ensaio imuno-enzimático

et al = e colaboradores

H₂O = Água

IL = Interleucina

LPS = Lipopolissacarídeo

MAPK = Proteína quinase ativadora de mitógeno

mg = Miligramas

MIP-1α = Proteína inflamatória para macrófago

MMP = Metaloproteinase

mL = Mililitros

mM = Milimolar

MTT = 2,5- difenil brometo de tetrazolium

NaF = NaF

nm= Nanômetro

NO = Óxido nítrico

NOS = Óxido nítrico sintase

pb = Pares de base

PBS = Tampão fosfato-salina

pg/mL = Picogramas por mililitros

RNA = Ácido ribonucléico

RT-PCR = Transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

TGF-β = Fator de crescimento transformador

μg/mL = Microgramas por mililitros

μM = Micromolar

μg F/mL = microgramas de flúor por mililitros

SUMÁRIO

1 Introdução	22
2 Proposição	31
3 Material e Método	33
3.1 Animais	33
3.2 Procedimento Experimental	33
3.3 Análise estatística	45
4 Resultado	44
5 Discussão	67
6 Conclusão	79
7 Referências	81
Anexos	88

1 INTRODUÇÃO

A Odontologia passou por grandes mudanças conceituais no século XX, entre elas, o entendimento da cárie dentária como doença, com alternativas para prevenção, controle e tratamento, principalmente por meio da utilização de flúor (ADAIR, 1999), que é capaz de reduzir a progressão das lesões cariosas (CURY, 2001).

O efeito cariostático primário do flúor se dá por sua presença na cavidade bucal em contato direto com os dentes já irrompidos, inibindo a desmineralização e favorecendo a remineralização do complexo esmalte-dentina, por meio da exposição tópica freqüente e em baixas concentrações. Porém, a ingestão excessiva durante o período de formação do esmalte dentário pode provocar uma alteração denominada fluorose dentária. (PAIVA, 1991; LEVY, 1994; FEJERSKOV et al., 1996).

O uso excessivo de flúor também pode provocar efeitos tóxicos nas células como a inibição do crescimento celular e da síntese de proteínas. Essa atividade citotóxica pode ocorrer em diferentes tipos celulares, no entanto, o exato mecanismo ainda não foi completamente elucidado (HELGELAND; LEIRSKAR, 1976; OGURO et al., 1982; SATO et al., 1987). A síntese de proteína em fibroblastos da mucosa oral humana é inibida pelo fluoreto de sódio (NaF) por meio da diminuição dos níveis de ATP de maneira dose-dependente (JENG et al., 1998). O flúor também apresenta

um efeito citotóxico em células pulpares humanas, de maneira dose e tempo-dependente. (CHANG; CHOU, 2001).

A ação do NaF no processo inflamatório tem sido observada utilizando-se uma composição de células epiteliais da mucosa oral e fibroblastos orais, nos quais dentifrícios fluoretados foram capazes de potencializar a secreção de interleucina-1 β (IL-1 β) e estimular a produção excessiva de metaloproteinase 9 (MMP-9), sugerindo um papel importante na resposta inflamatória (MOSTEFAOUI et al., 2002).

A resposta inflamatória é caracterizada pela reação do tecido vivo vascularizado a uma agressão local, quer seja de natureza física, química ou biológica. Esse mecanismo de defesa inclui uma série de reações bioquímicas que acontecem, basicamente na microcirculação, no tecido conjuntivo e no sangue. Quando um tecido é traumatizado ou torna-se localmente infectado, uma reação inflamatória é desencadeada (ALLEN et al., 1998). A resposta inflamatória compreende três componentes principais: aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade capilar e aumento da migração celular. Durante essa reação, uma variedade de fatores solúveis está envolvida no recrutamento de leucócitos, por meio do aumento da expressão de moléculas de adesão celular e de fatores quimiotáticos. Muitos desses fatores regulam a ativação das células residentes (tais como fibroblastos, células endoteliais, macrófagos teciduais e mastócitos) e também das células inflamatórias

recém recrutadas (monócitos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos) (COLLINS, 2000).

Os mediadores inflamatórios podem atuar em um ou alguns tipos celulares, ter alvos difusos, ou até mesmo efeitos diferentes, de acordo com os tipos de células e tecidos. Muitas variáveis podem modificar esse processo básico, incluindo a natureza e a intensidade da lesão, o material indutor da lesão, o local e o tecido afetado e a resposta do hospedeiro. Dentre os mediadores inflamatórios mais importantes encontram-se fatores ativadores plaquetários, citocinas, quimiocinas, além do óxido nítrico (COLLINS, 2000).

O óxido nítrico (NO), um gás solúvel, é produzido não apenas por células endoteliais, mas também por macrófagos e fibroblastos. Sua participação no processo inflamatório é observada durante a vasodilatação, redução da agregação e aderência plaquetária e também como regulador do recrutamento de leucócitos. O NO é sintetizado a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico-sintase (NOS). (COLLINS, 2000). No entanto, sua inibição pode ocorrer em presença da arginase que utiliza o mesmo substrato que a L-arginina (UGAR-ÇANKAL; OZMERIC, 2006). Estudos recentes mostram a produção de NO no tecido gengival é aumentada, isso ocorre porque o biofilme bacteriano é responsável pela ativação da NOS (PAQUETTE; WILLIAMS, 2000).

As quimiocinas são um grupo específico de citocinas que compartilham a capacidade de estimular o movimento leucocitário (quimiocinese) e o movimento dirigido (quimiotaxia), sendo particularmente importantes na inflamação. Atualmente as quimiocinas são classificadas de acordo com a posição dos resíduos de cisteína localizados na porção amino-terminal da molécula. As quimiocinas atuam em células-alvo por meio de receptores específicos ligados a proteínas G, caracterizados por apresentarem sete domínios transmembrânicos. Após a ligação com o receptor, a sinalização é realizada pela proteína G, que por meio de suas subunidades desencadeia eventos bioquímicos que resultam nos efeitos que as quimiocinas exercem sobre as células (MURDOCH; FINN, 2000).

A quimiocina CCL3/MIP-1 α (proteína inflamatória derivada de macrófago) é produzida no local da inflamação por vários tipos celulares, como neutrófilos, eosinófilos, células epiteliais, monócitos e fibroblastos (MILLER; KRANGEL, 1992; OPPENHEIM et al., 1991; KOCH et al., 1994). Sua produção pode ser induzida por diversos agentes pró-inflamatórios, LPS, infecções virais (MAURER; STEBUT, 2004). Esta quimiocina participa tanto da fase aguda como crônica da inflamação por meio do recrutamento de células pró-inflamatórias ao local do dano ou infecção (BONECCHI et al., 1999), como na artrite reumatóide, asma e principalmente na doença periodontal (JOHN; LUKACS, 2003).

Os fibroblastos, que são células residentes sentinelas, além de produzirem citocinas, quimiocinas e inicializarem a resposta inflamatória via

recrutamento de leucócitos (SMITH et al.,1997), desempenham outra importante função, que é o remodelamento da matriz extracelular (LEKIC et al.,1997), envolvida na homeostasia tecidual e nas condições patológicas (MATRISIAN, 1990). Essas células são capazes de fagocitar partículas estranhas do organismo e produzir o colágeno, que tem um papel crítico no processo de reparo tecidual (MURAKAMI; OKADA, 1998). Essas funções também são realizadas pelos fibroblastos gengivais ativados por lipopolissacarídeo (LPS) durante a inflamação periodontal (MURAKAMI; OKADA, 1998).

O LPS encontrado na parede bacteriana é também um dos agentes etiológicos da doença periodontal, sendo responsável pela ativação das células nos eventos da resposta inflamatória. Sua participação na destruição do tecido periodontal pode estar relacionada com a capacidade de estimular a produção das metaloproteinases (MMPs) (BODET et al., 2007).

As MMPs são um grupo de enzimas responsáveis pela degradação das proteínas da matriz extracelular durante o crescimento ou renovação tecidual, atuando inclusive na doença periodontal (UITTO et al., 2003). Essa família de proteinases constitui uma classe estruturalmente ligada a enzimas proteolíticas responsáveis pelo metabolismo de componentes extracelulares, incluindo a fibronectina, laminina e proteoglicanas, assim como colágeno da membrana basal (WOESSNER; NAGASE, 2000). Baseado em seu substrato específico podem ser divididas em três subgrupos: a

colagenase intersticial, a estromelisina e as gelatinases. Duas gelatinases, a metaloproteinase 2 (MMP-2) e a metaloproteinase 9 (MMP-9), são capazes de degradar colagenases intersticiais (gelatinas), laminina, elastina, fibronectina e colágeno tipo IV associado à membrana basal (WERB, 1989). Essas proteinases estão envolvidas em um grande número de eventos fisiológicos tais como desenvolvimento embrionário, involução do útero no pós-parto, remodelamento tecidual, morfogênese da glândula salivar e na erupção dentária. A produção excessiva de MMPs induz a degradação acelerada da matriz extracelular que está associada a patologias como artrite reumatóide, câncer, aterosclerose, osteoporose e periodontite (WOESSNER JUNIOR, 1991). Recentemente, a gelatinase A (MMP-9) foi encontrada aumentada em modelo experimental de mucosa oral humana após estímulo com dentifrícios fluoretados (MOSTEFAOUI et al., 2002) e em lesões periapicais *in vivo* (SHIN et al., 2002). Esses resultados sugerem que a inibição da atividade das MMPs pode ser uma ferramenta útil na terapêutica periodontal e endodôntica. O TGF- β e os inibidores da proteína quinase C podem inibir a atividade da MMP-2 em células pulpares humanas (CHANG; CHOU, 2001), células do ligamento periodontal (CHANG et al., 2002) e células de câncer bucal (TSAI et al., 2003).

Durante o processo de inflamação, a produção das MMPs e de muitas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias são dependentes, em grande parte, da ativação de quinases protéicas denominadas de MAPK

(proteína quinase ativadora de mitógeno). As MAPK são quinases envolvidas na transdução de sinal intracelular a partir de um estímulo agressor que culmina na ativação e migração de leucócitos para o tecido lesado. A ativação da via das MAPK é um dos maiores sistemas utilizados por células eucarióticas para traduzir sinal extracelular em respostas intracelulares. Todas as MAPKs apresentam a seqüência de aminoácidos Thr-Xxx-Tyr na qual X difere de acordo com a isoforma, podendo ser ácido glutâmico (Glu) na MAPK tipo ERK (p44/42), prolina (Pro) na MAPK JNK e glicina (Gly) na MAPK p38, formando assim os três maiores grupos de MAPK conhecidos até o presente momento (HERLAAR; BROWN, 1999).

Sabe-se o PI3K é positivamente regulado em consequência da ativação de receptores tirosino-quinases, de receptores de proteína G ou integrinas (NICHOLSON; ANDERSON, 2002). Além disso, a ativação da PI3K pode estar relacionada principalmente com a quimiotaxia celular (WEBER et al., 1998; NOBES; HALL, 1999) e com a produção de citocinas e quimiocinas, como por exemplo, CCL3/MIP-1 α (FINE et al., 2001).

A via de sinalização intracelular NF- κ B desempenha uma importante função na resposta imune e inflamatória através da regulação de citocinas, quimiocinas, fator de crescimento e enzimas da ciclooxigenase 2 (KARIN; BEN-NERIAH, 2000; VANE et al., 1994; TAK; FIRESTEIN, 2001; YAMAMOTO; GAYNOR, 2001). Sua ativação ocorre principalmente por receptores encontrados em patógenos conhecidos por causar a doença periodontal cuja ligação é ocasionada por produtos sintetizados por esses

microorganismos. (MORI et al., 2003; KUSUMOTO et al., 2004; REN et al., 2005).

Recentemente foi observado que a produção de MMP-2 por cultura de células da polpa dental humana é regulada pela via da enzima ciclooxigenase 2, NF- κ B e tirosina quinase (HUANG et al., 2004).

No entanto, muito pouco se conhece a respeito da participação das vias p44/42, p38, fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) e NF- κ B na produção das MMPs e da quimiocina CCL3/MIP-1 α por fibroblastos gengivais estimulados com por NaF, tão amplamente utilizado para prevenção da cárie dentária.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito citotóxico do fluoreto de sódio em fibroblastos gengivais de camundongos *in vitro*. Bem como os mecanismos envolvidos na ativação intracelularmente desses fibroblastos em expressarem MMP-2, MMP-9 e CCL3/MIP-1 α e também a produzirem alguns mediadores do processo inflamatório (CCL3/MIP-1 α e NO) após estímulo por NaF na presença ou ausência de LPS. Para isso, foram avaliadas nos fibroblastos gengivais de camundongos em cultura:

- A concentração capaz de promover o efeito citotóxico do NaF;
- A expressão de MMP-2 e MMP-9 após estímulo por NaF na presença ou ausência de LPS;
- A produção e a expressão de CCL3/MIP-1 α pós estímulo por NaF na presença ou ausência de LPS;
- A produção de NO;
- A participação das vias de sinalização intracelular p44/42, p38, NF- κ B e PI3K na expressão de MMP-2 e MMP-9 e na produção e expressão de CCL-3/ MIP-1 α .

3 MATERIAL E MÉTODO

Previamente à realização deste estudo, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Araçatuba - UNESP (Protocolo 51/06) (Anexo A).

3.1 ANIMAIS

Camundongos normais Balb/c com peso variando entre 20 e 24 g, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, foram utilizados. Esses animais foram mantidos em uma sala climatizada com temperatura variando entre 20 e 22°C, sistema de exaustão e ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração.

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Cultura de fibroblastos gengivais de camundongos

Os fibroblastos gengivais foram preparados a partir de fragmentos de gengivas extraídos de aproximadamente 5-6 camundongos normais e colocados em meio de cultura em placa de petri. Os fragmentos de gengiva foram triturados e transferidos para garrafas de cultura com meio

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) contendo 15 % de soro fetal bovino, 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de streptomomicina, 50 µg/mL de gentamicina e 300 ng/ml anfotericina B, durante o período da cultura. A medida que atingiram confluência, os fibroblastos gengivais em cultura foram repicados por 4 vezes e então, a partir do quarto repique, foram distribuídos em placas de 24 poços. Após um período de 24 horas os fibroblastos em confluências foram utilizados nos ensaios. As culturas foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂.

3.2.2 Contagem global

Para a realização da contagem global, foram utilizadas alíquotas de 20 µL de fibroblastos suspensos em meio de cultura. A contagem global foi efetuada utilizando a Câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico em aumento de 40 vezes e contador manual. A partir dos resultados obtidos nessa contagem, foi calculado o número total de células em cada poço.

3.2.3 Estimulação *in vitro* dos fibroblastos gengivais por NaF e LPS

Fibroblastos (3×10^6 / poço) foram estimulados com NaF (99,9% de pureza de marca comercial Sigma®) nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 µgF/mL nos tempos de 1, 6 e 24 horas na presença ou ausência de LPS (10 µg/mL) (*Escherichia coli*) a 37°C em incubadora com 5% de CO₂. Ao final da incubação nos respectivos tempos, os sobrenadantes e as células foram

recolhidos em ependorfs estéreis e congelados a -70°C para realização do ELISA e RT-PCR, respectivamente.

3.2.4 Avaliação do efeito citotóxico do NaF nos fibroblastos gengivais

No intuito de descobrir qual seria a dose de NaF que apresentasse um efeito tóxico aos fibroblastos gengivais, esses foram plaqueados em placas com 24 poços e após atingirem confluência foram estimulados por NaF nas concentrações de 1, 5, 10, 20 e 40 $\mu\text{gF/mL}$, sendo incubados a 37°C com 5% de CO_2 , por um período de 6, 24 e 48 horas. Ao final da incubação nos respectivos tempos, os sobrenadantes foram descartados e uma solução de MTT, foi adicionada às células.

A solução de MTT (5 mg de 2,5- difenil brometo de tetrazolium de marca comercial Sigma®) foi dissolvida em 1 mL de PBS, filtrada e esterilizada utilizando filtro Millipore 0,22 μm . A solução foi adicionada em cada poço (10 μL de MTT por 90 μL de meio de cultura), contendo os fibroblastos gengivais pós-estímulo onde permaneceram incubados por 4 horas a 37°C em 5% de CO_2 . Posteriormente, a solução de MTT foi retirada dos poços e descartada. Álcool isopropílico (100 μL) foi adicionado às células, deixadas em mesa agitadora à temperatura ambiente por 30 minutos para dissolver os cristais azuis que coraram as mitocôndrias. Após essa etapa, a placa foi levada ao espectrofotômetro com comprimento de

onda ajustado para 570 nm, no qual a leitura de absorbância foi realizada (MOSMANN, 1983).

3.2.5 Avaliação da expressão de MMP-2, MMP-9 e CCL3/MIP-1 α nos fibroblastos gengivais estimulados por NaF na presença e ausência de LPS por meio da RT-PCR

3.2.5.1 Extração de RNA das células

Para extração do RNA total contido nas amostras de fibroblastos gengivais estimulados com NaF, na presença ou ausência de LPS, foi adicionado em cada poço da placa de 24 poços contendo as células 1 mL de TRIzol (Life Technologies) para promover lise celular. As amostras foram armazenadas em ependorfs livres de DNase e RNase de 1500 μ L e congeladas a -70°C, até o momento da extração de RNA.

Para a extração do RNA, os ependorfs contendo as amostras dos fibroblastos foram descongelados. Para cada uma das amostras foi adicionado 200 μ L de clorofórmio, realizada agitação vigorosa, procedendo a uma centrifugação a 15.700 X g durante 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C, para separação das fases.

Após a centrifugação, obtiveram-se três fases no ependorf: fase transparente, correspondendo ao RNA total; fase branca, correspondendo ao DNA genômico e fase rosa, correspondendo ao TRIzol. Foram coletado 500 μ L da fase transparente, os quais foram transferidos para um novo

ependorf estéril. Em seguida, adicionou-se 500 µL de álcool isopropílico, sofrendo novamente agitação vigorosa, seguida pelo armazenamento a -20°C, por pelo menos 4 horas para precipitação do RNA.

Após este período as amostras foram centrifugadas a 15.700 X g durante 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. Os ependorfs foram mantidos em gelo e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi acrescentado 500 µL de álcool 75%, agitando-se vigorosamente e centrifugando os ependorfs a 9.300 X g durante 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado, os ependorfs foram deixados abertos e invertidos sobre filtro de papel em temperatura ambiente, por aproximadamente 1 hora para permitir a secagem das amostras. Para dissolver o RNA total, os ependorfs receberam 20 µL de água livre de DNase e RNase. Então, as amostras de RNA foram armazenadas a -70°C até o uso.

3.2.5.2 Obtenção de cDNA a partir da extração do RNA

A obtenção de cDNA foi realizada a partir do RNA total. Os tubos contendo amostras de RNA foram descongelados, homogeneizados e armazenados em gelo. A seguir 2 µg de RNA foram diluídos em 8 µL em cada amostra, os quais foram transferidos para um novo ependorf. Em seguida, foi adicionado 1 µL de Oligo DT (Invitrogen) (0,5 µg/µl). Os ependorfs foram incubados a 70°C por 10 minutos e a 4°C por 5 minutos em termociclador. Após esse período, foi preparada uma solução para ser

adicionada às amostras, sendo que para cada amostra foram necessários: 4 µL de DNTP (Invitrogen) (2,5 µM), 4 µL de 5 x tampão para PCR (Invitrogen) (250 mM TRIS-HCl), 2 µL dTT (Invitrogen) (0,1M) e 1 µL de RT (Invitrogen) (200 U/µL). Em cada amostra foram adicionados 11 µL da solução; os ependorfs foram centrifugados a 4°C por 30 segundos e colocados em termociclador 42°C por 1 hora e 90°C por 5 minutos.

As amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

3.2.5.3 Transcriptase reversa- reação de polimerase em cadeia (RT-PCR)

RT-PCR combina síntese de cDNA vindo de molde de RNA com PCR para fornecer um método rápido e sensível para verificar a expressão gênica. RT-PCR é usado para quantificar a expressão de RNAm, vindo de uma concentração pequena de RNA (SANTOS et al., 2004). Esse método foi utilizado para verificar a expressão de MMP-2, MMP-9 e CCL3/MIP-1α nos fibroblastos gengivais de camundongos estimulados por NaF na presença ou ausência de LPS *in vitro*. Os ependorfs foram numerados, mantidos em gelo e em cada ependorf foram colocados 1 µL de cDNA mais 4 µL de água livre de DNase e RNase.

A seguir foi preparada uma solução, sendo que para cada amostra foram necessários: 11,4 µL de água livre de DNase e RNase, 2,5 µL de 10 X tampão para PCR (Invitrogen) (200 mM TRIS-HCl), 2 µL de DNTP (Invitrogen)

(2,5 μ M), 1,5 μ L de $MgCl_2$ (Invitrogen) (50 mM), 1 μ L de primer (10 μ M), 0,1 μ L de TAq DNA polimerase (Invitrogen) (5 U/ μ L). Então 20 μ L da solução foram adicionados a cada ependorf, resultando em um volume total de 25 μ L. Os ependorfs foram centrifugados a 4°C por 30 segundos e colocados em termociclador de acordo com a temperatura de amplificação, anelamento e extensão para cada primer.

O processo de ciclagem térmica para os genes de expressão constitutiva de β -actina pelos fibroblastos foi constituído de desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C seguida por 30 ciclos de amplificação. Cada ciclo foi constituído de desnaturação por 45 segundos a 94°C, anelamento por 45 segundos a 56°C e extensão 45 segundos a 72°C. Após o término do último ciclo, as amostras foram incubadas por um período adicional de 10 minutos a 72°C (extensão final).

O processo de ciclagem térmica para os genes de expressão induzida de MMP-2 pelos fibroblastos foi constituído por desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C seguida por 35 ciclos de amplificação. Cada ciclo foi constituído de desnaturação por 45 segundos a 94°C, anelamento por 45 segundos a 59,5°C e extensão 45 segundos a 72°C. Após o término do último ciclo, as amostras foram incubadas por um período adicional de 10 minutos a 72°C (extensão final). Para o alvo MMP-9 por fibroblastos gengivais foi alterada somente a temperatura de anelamento para 57°C.

O processo de ciclagem térmica para os genes de expressão induzida de CCL3/MIP-1 α pelos fibroblastos, foi constituído de desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C seguida por 35 ciclos de amplificação. Cada

ciclo foi constituído de desnaturação por 45 segundos a 94°C, anelamento por 45 segundos a 58°C e extensão 45 segundos a 72°C. Após o término do último ciclo, as amostras foram incubadas por um período adicional de 10 minutos a 72°C (extensão final).

O tamanho dos pares de base e os primers utilizados na PCR são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - *Primers* utilizados na PCR para os diferentes alvos e tamanhos antecipados dos produtos de amplificação

Alvo	Tamanho Antecipado	Sense (5'-3')	Anti-sense (5'-3')
β -actina*	345 pb	taaaacgcagctcagtaagagtcg	tggatcctgtggcatccatgaaac
MMP-2**	331 pb	gaatgcgggctcctgactacacatcc	actggccggctcttctcgcttact
MMP-9 [#]	481 pb	cgacagcacctcccactatg	cccaacttatccagactcct
CCL3 ^ψ	258 pb	gcccttgctgttcttctctgt	ggcattcagttccagggtcagt

* Graham et al., 1990, ** Zhang et al., 2006, [#] Li et al., 2002, ^ψ Ishida et al., 2007

Para detecção dos produtos amplificados de tamanhos antecipados, uma alíquota de 13 μ L de cada amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose (1,8%) (196 mL de água livre de DNase e RNase, 3,6g de agarose e 4 mL de tampão TAE 50 X) corado com 10 μ L de brometo de efídio (10 μ g/mL) (Invitrogen). A eletroforese foi feita a 90 Volts, por 150 minutos, em uma cuba de eletroforese horizontal, e o cDNA visualizado sob luz ultra-violeta em um transiluminador. O peso molecular

dos produtos da PCR foi determinado pela comparação com um marcador de peso molecular de tamanhos conhecidos (DNA *ladder*, Invitrogen 100-1500 pb). A fotodocumentação dos géis de agarose foi realizada com a utilização de máquina Polaróide.

3.2.6 Determinação da produção de CCL3/MIP-1 α nos sobrenadantes dos fibroblastos gengivais estimulados por NaF e LPS

A produção de CCL3/MIP-1 α foi avaliada a partir do sobrenadante dos fibroblastos gengivais coletado 1, 6 e 24 horas após estímulo por NaF nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 μ g F/mL, na presença ou ausência de LPS (10 μ g/mL). A produção de CCL3/MIP-1 α extracelular foi quantificada utilizando-se o método de ensaio imunoenzimático (ELISA). Placas de 96 poços foram recobertas e incubadas durante 15-18 horas a 4°C, com anticorpo anti-CCL3 (Anti-human CCL3 Antibody – AF – 270-NA – R&D Systems), diluídos em tampão fosfato de cálcio. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas com PBS, contendo 0,5% de Tween 20 e bloqueadores durante 1 hora, em temperatura ambiente, com PBS contendo soroalbumina bovina 1%. As placas então, foram lavadas e incubadas com os sobrenadantes das células e com CCL3/MIP-1 α recombinante durante 1 hora a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas e incubadas com anticorpo biotinilado (Biotinylated Anti-human CCL3/MIP-1 α Antibody – BAF 270-NA – R&D Systems) por 30 minutos à 37°C. As placas foram lavadas com PBS e o substrato (peróxido de hidrogênio e

tetrametilbenzidina na proporção de 1:1) adicionado conforme as instruções do fabricante. Após 30 minutos, a solução de paralisação da reação (ácido sulfúrico 2N) foi adicionada e a leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 490nm.

3.2.7 Avaliação do papel da dexametasona, PD98059, SB202190 e LY294002 sobre a expressão de MMP-9 e CCL3/MIP-1 α pelos fibroblastos gengivais de camundongos

Para identificar a via de sinalização intracelular envolvida na ativação dos fibroblastos gengivais por NaF na ausência ou presença de LPS, esses fibroblastos foram pré-tratados com os seguintes inibidores.

Tabela 2 – Pré-tratamento com inibidores

INIBIDOR	FABRICANTE	AÇÃO	CONCENTRAÇÃO
DEXAMETASONA*	Sigma Chem	Glicocorticoide	10 μ M
PD98059 **	Calbiochem	Inibidor da p44/42	50 μ M
SB 202190 *	Calbiochem	Inibidor da p38	10 μ M
LY294002 #	Calbiochem	Inibidor da PI3K	30 μ M

*Igarashi et al., 2004, **Adachi et al., 2000, # Amin et al., 2003

Os fibroblastos gengivais normais foram plaqueados em placas de 24 poços e após atingirem confluência foram pré-tratados com os respectivos

inibidores da tabela 2. Após 30 minutos, os fibroblastos foram estimulados por NaF nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 µg F/mL, na presença ou ausência de LPS (10 µg/ml), por um período de 6 horas. As células foram coletadas em Trizol para detecção da expressão do RNA mensageiro para MMP-9 e CCL3/MIP-1α, por meio da técnica do RT-PCR, descrita anteriormente.

3.2.8 Determinação da produção de CCL3/MIP-1α nos sobrenadantes dos fibroblastos gengivais estimulados por NaF e LPS após pré-tratamento com inibidores

A produção de CCL3/MIP-1α foi avaliada a partir dos sobrenadantes dos fibroblastos gengivais pré-tratados 30 minutos antes do estímulo com inibidores PD98059, SB202190, LY294002 e dexametasona e coletados 06 horas após estímulo por NaF (20 µg F/mL) na presença ou ausência de LPS (10 µg/mL). A produção de CCL3/MIP-1α extracelular foi quantificada utilizando-se o método do ensaio imuno-enzimático (ELISA) descrito anteriormente.

3.2.9 Determinação da produção de óxido nítrico por fibroblastos gengivais

Os fibroblastos gengivais normais foram plaqueados em placas de 24 poços e após atingirem confluência foram estimulados por NaF (1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g F/mL}$), na presença ou ausência de LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) e 1400w (10 μM) (inibidor da enzima óxido nítrico sintase induzida). Após 1, 6 e 24 horas os sobrenadantes foram coletados para dosagem de óxido nítrico pelo método de Griess (GREEN et al., 1982).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Graph Prism 3.0. As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de correção de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ e $p < 0,001$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DO NaF POR FIBROBLASTOS GENGIVAIS DE CAMUNDONGOS

Para verificar qual concentração de NaF (1, 5, 10, 20 e 40 µg F/mL) teria efeito tóxico nos fibroblastos, a taxa de mortalidade celular foi observada 6, 24 e 48 horas após o estímulo com NaF. O efeito citotóxico do NaF sobre os fibroblastos gengivais ocorreu de maneira dose e tempo-dependente (Fig.1). Observou-se que a concentração de 40 µg F/mL apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, 6 horas ($p < 0,05$), 24 e 48 após estímulo ($p < 0,001$), com percentual de morte celular de 62,4% para esses dois últimos tempos de estímulo. A concentração de 20 µg F/mL foi estatisticamente significativa 24 e 48 horas após, apresentando um índice de morte celular de 22,1% e 28,2% respectivamente.

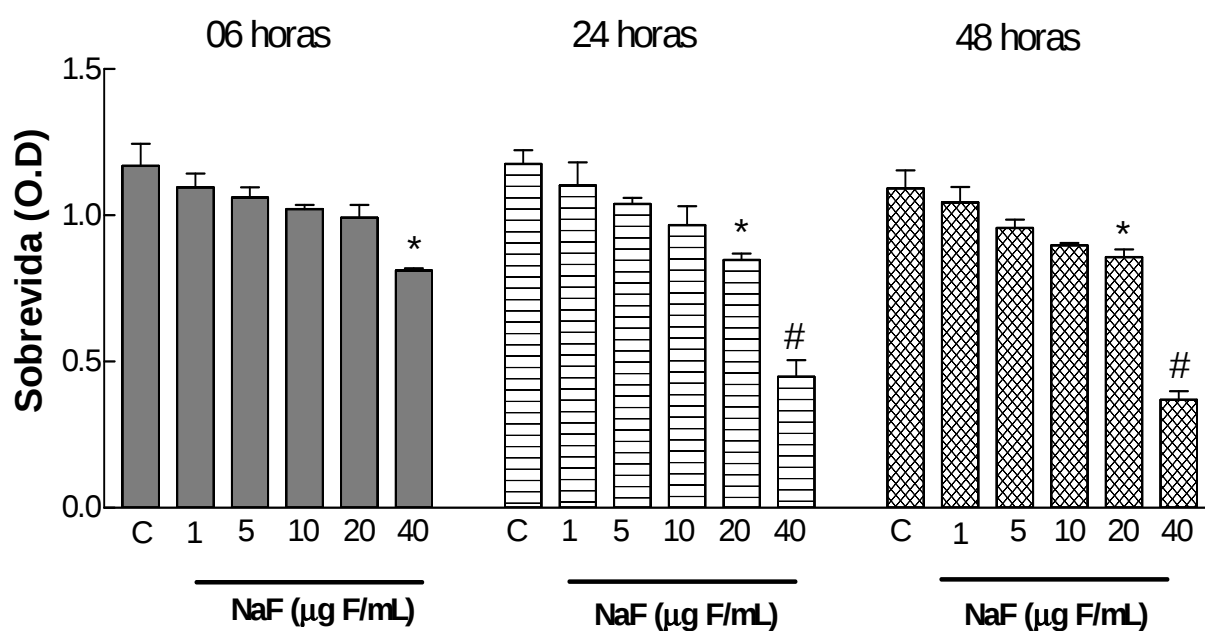


Figura 1 – Efeito citotóxico do NaF nos fibroblastos gengivais estimulados nas concentrações de 1, 5, 10, 20 e 40 µg F/mL e grupo controle (C), estimulados 6, 24 e 48 horas. *($p < 0,05$) e #($p < 0,001$) comparados com o grupo controle de cada tempo. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM, (ANOVA, com correção de Bonferroni).

4.2 EXPRESSÃO DE MMP-2 E MMP-9 POR FIBROBLASTOS GENGIVAIS ESTIMULADOS POR NaF

Com base nos dados obtidos, observou-se que a concentração de 40 $\mu\text{g F/mL}$ promoveu um alto índice de morte celular (62,4%), com isso optou-se por utilizar para os experimentos de ativação celular, concentrações que não induzissem morte celular ou no máximo um pequeno índice dessa morte, como a observada na concentração de 20 $\mu\text{g F/mL}$ (22,1%). Para tanto, utilizou-se as seguintes concentrações de NaF: 1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g F/mL}$ nos tempos de 1, 6 e 24 horas. A expressão de MMP-9 pelos fibroblastos gengivais estimulados por NaF foi observada somente 6 e 24 horas pós-estímulos (Fig. 2B e 2C), na concentração de 20 $\mu\text{g F/mL}$, o pico máximo de expressão de MMP-9 ocorreu de 6 horas após o estímulo (Fig. 2B). No entanto, não foi observada a expressão de MMP-2 em nenhuma das concentrações e tempos propostos (Fig. 2A, 2B e 2C).

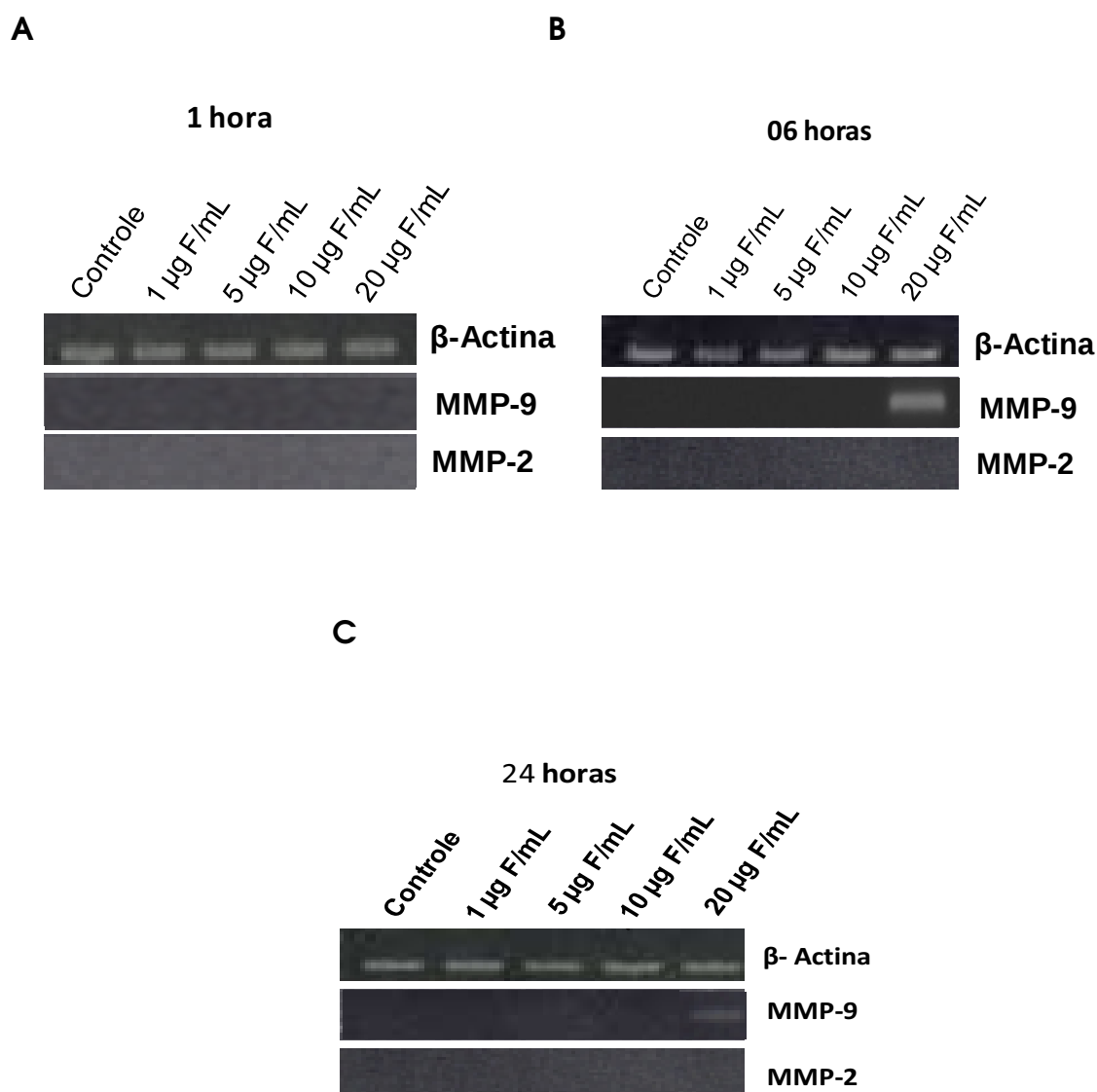


Figura 2 - Expressão de RNAm para MMP-2 e MMP-9 em fibroblastos gengivais estimulados pelo NaF nas concentrações 1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g F/mL}$ e grupo controle. **(A)** Tempo de 1 hora, **(B)** tempo de 06 horas, **(C)** tempo de 24 horas. Foram extraídos 2 μg de RNA total e sua expressão avaliada pela técnica RT-PCR utilizando gel de garose (1,8%) com os produtos da PCR para detecção de β -actina (345 pb), MMP-9 (481 pb) e MMP-2 (331 pb).

4.3 EXPRESSÃO DE CCL3/MIP-1 α POR FIBROBLASTOS GENGIVAIS DE CAMUNDONGOS ESTIMULADOS POR NaF

Observou-se também a expressão de CCL3/MIP-1 α pelos fibroblastos gengivais estimulados por NaF. Os resultados demonstram que CCL3/MIP-1 α foi expressa somente na concentração de 20 μ g F/mL após 6 e 24 horas de estímulo (Fig. 3B e 3C). O pico máximo de expressão dessa quimiocina pelos fibroblastos gengivais foi observado com 20 μ g F/mL, 6 horas após, diminuindo 24 horas após (Fig. 3B).

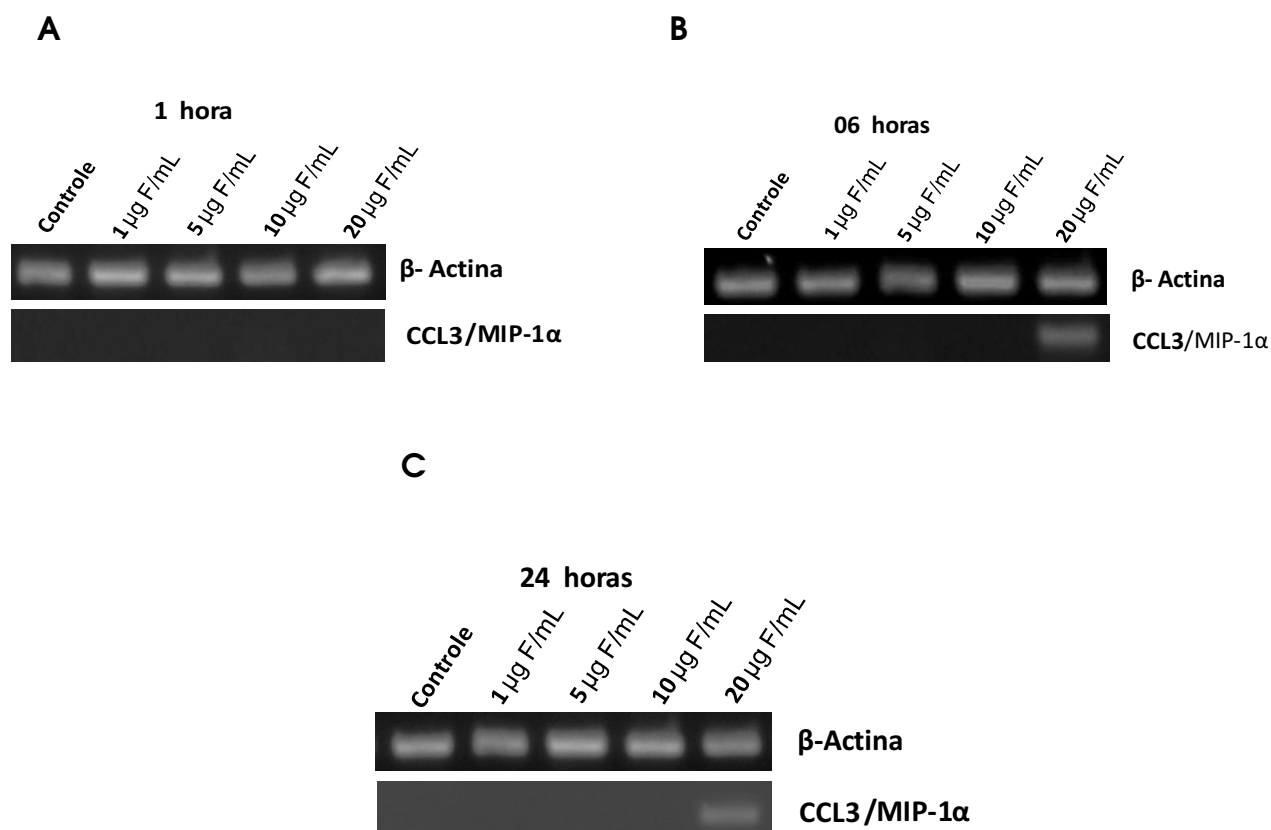


Figura 3 - Expressão de RNAm para CCL3/MIP-1α em fibroblastos gengivais estimulados por NaF nas concentrações 1, 5, 10 e 20 µg F/mL e grupo controle. **(A)** Tempo de 1 hora, **(B)** tempo de 6 horas, **(C)** tempo de 24 horas. Foram extraídos 2 µg de RNA total e sua expressão avaliada pela técnica RT-PCR utilizando gel de agarose (1,8%) com os produtos da PCR para detecção de β-actina (345 pb) e CCL3/ MIP-1α (258 pb).

4.4 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CCL3/MIP-1 α NOS SOBRENADANTES DE FIBROBLASTOS GENGIVAIS DE CAMUNDONGOS ESTIMULADOS POR NaF

Com o intuito de confirmar a expressão da quimiocina CCL3/MIP-1 α pelos fibroblastos gengivais estimulados por NaF, realizou-se a quantificação da produção dessa quimiocina por meio do método ELISA. A produção de CCL3/MIP-1 α foi observada somente nos grupos estimulados com a concentração de 20 μ g F/mL, 6 e 24 horas pós-estímulo ($p < 0,001$), quando comparados ao grupo controle. O pico máximo de produção de CCL3/MIP-1 α nesses fibroblastos foi observado 6 horas após, diminuindo após 24 horas (Fig. 4), semelhantemente ao observado pela técnica da RT-PCR. Com base nos resultados obtidos, observou-se que o pico máximo de expressão de MMP-9, expressão e produção de CCL3/MIP-1 α ocorreu somente 6 horas após estímulo na concentração de 20 μ g F/mL. Desta forma, optou-se em utilizar essa concentração e esse tempo de estímulo para a avaliação da expressão de MMP-9, expressão e produção de CCL3/MIP-1 α pelos fibroblastos gengivais estimulados por NaF na presença de LPS.

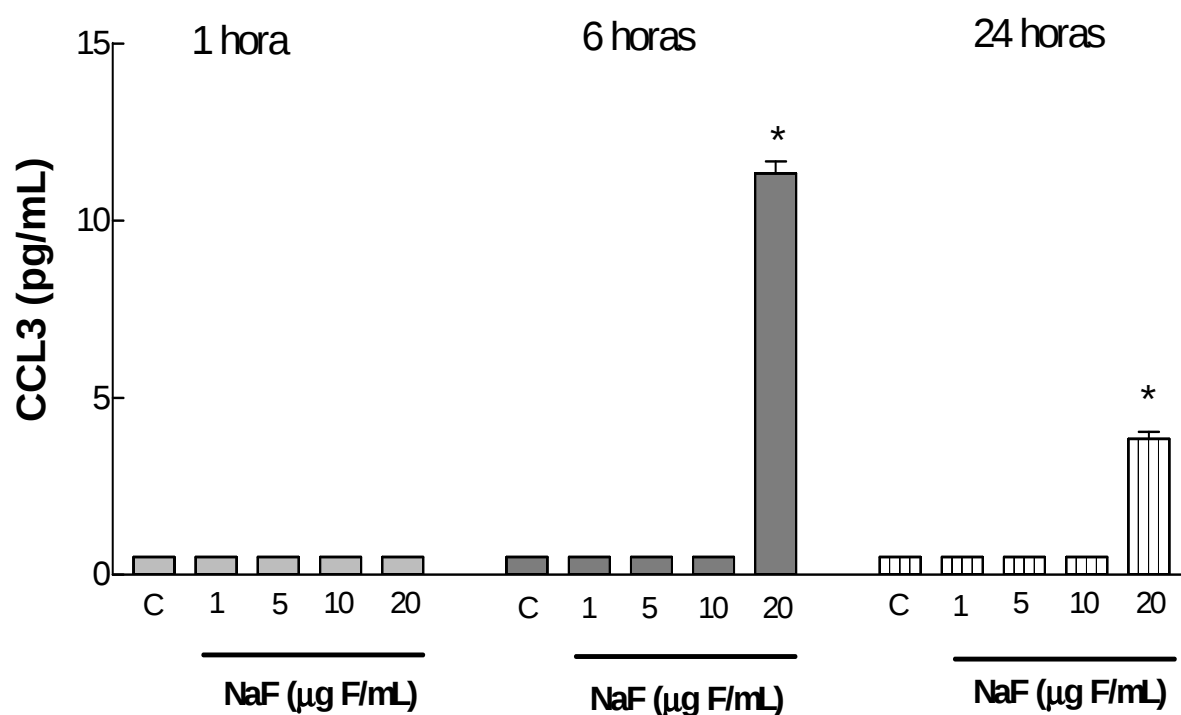


Figura 4 - Produção de CCL3/MIP-1 α nos sobrenadantes de fibroblastos gengivais estimulados por NaF nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 μ g F/mL e grupo controle (c) após 1, 6 e 24 horas de estímulo. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM (ANOVA, com correção de Bonferroni) * $p < 0,001$. Este ensaio é representativo de um experimento realizado em triplicata.

4.5 EXPRESSÃO DE MMP-2 E MMP-9 POR FIBROBLASTOS GENGIVAIS ESTIMULADOS POR NaF NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE LPS.

Avaliou-se a expressão de MMP-2 e MMP-9 nos fibroblastos gengivais de camundongos estimulados por NaF (20 µg F/mL) na presença ou ausência de LPS (10 µg/mL) (Fig. 5). Observou-se que tanto o LPS quanto o NaF promoveram a expressão de MMP-9, mas não de MMP-2, nos fibroblastos gengivais. Entretanto, esses fibroblastos estimulados apenas por NaF apresentaram uma ligeira intensidade na expressão de MMP-9 em relação aos fibroblastos estimulados apenas por LPS. Portanto, os dados mostram uma potencialização na expressão de MMP-9 nesses fibroblastos ativados por NaF na presença de LPS.

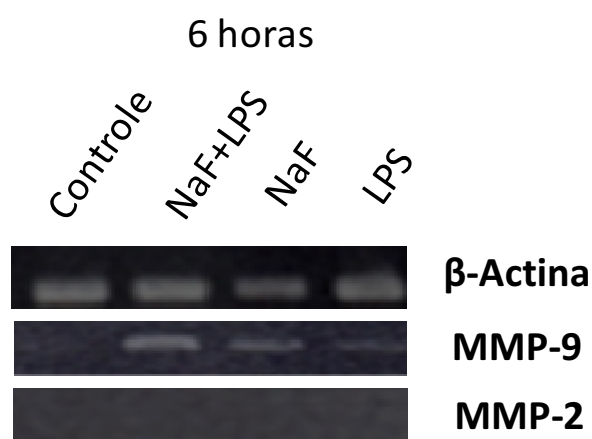


Figura 5- Expressão de RNAm para MMP-2 e MMP-9 em fibroblastos gengivais estimulados por 6 horas com NaF (20 µg F/mL) na presença ou ausência de LPS (10 µg/mL). Foram extraídos 2 µg de RNA total e sua expressão avaliada pela técnica RT-PCR utilizando gel de agarose (1,8%) com os produtos da PCR para detecção de β-actina (345 pb), MMP-9 (481 pb) e MMP-2 (331 pb) Este ensaio é representativo de um experimento realizado em triplicata.

4.6 EXPRESSÃO DE CCL3/MIP-1 α POR FIBROBLASTOS GENGIVAIS DE CAMUNDONGOS ESTIMULADOS POR NaF NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE LPS.

Analisou-se também a expressão de RNAm para CCL3/MIP-1 α nos fibroblastos gengivais ativados por NaF na presença ou ausência de LPS através da técnica RT-PCR (Fig. 6). Os resultados mostram a expressão de CCL3/MIP-1 α pelos fibroblastos gengivais estimulados tanto por NaF quanto por LPS. No entanto, quando esses fibroblastos foram estimulados por NaF na presença de LPS, observou-se uma potencialização na expressão de CCL3/MIP-1 α .

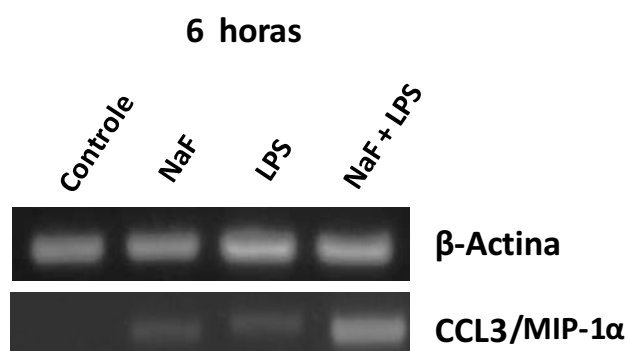


Figura 6 - Expressão de RNAm para CCL3/MIP-1 α pelos fibroblastos gengivais estimulados por NaF (20 μ g/mL) na presença ou ausência de LPS (10 μ g/mL) no tempo de 6 horas. Foram extraídos 2 μ g de RNA total e sua expressão avaliada pela técnica RT-PCR utilizando gel de agarose (1,8%) com os produtos da PCR para detecção de β -actina (345 pb) e CCL3/MIP-1 α (258 pb). Este ensaio é representativo de um experimento realizado em triplicata.

4.7 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CCL3/MIP-1 α NOS SOBRENADANTES DE FIBROBLASTOS GENGIVAIS DE CAMUNDONGOS ESTIMULADOS POR NaF NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE LPS

No intuito de confirmar a expressão de CCL3/MIP-1 α pelos fibroblastos gengivais, avaliou-se a produção de CCL3/MIP-1 α nos sobrenadantes desses fibroblastos estimulados por NaF (20 μ g F/mL) na presença e ausência de LPS (10 μ g/mL) por meio do método ELISA (Fig 7). Observou-se a produção de CCL3/MIP-1 α pelos fibroblastos gengivais estimulados somente por NaF, por LPS e NaF na presença de LPS. No entanto, observou-se uma potencialização na produção dessa quimiocina para esses fibroblastos estimulados por NaF na presença de LPS ($p < 0,001$).

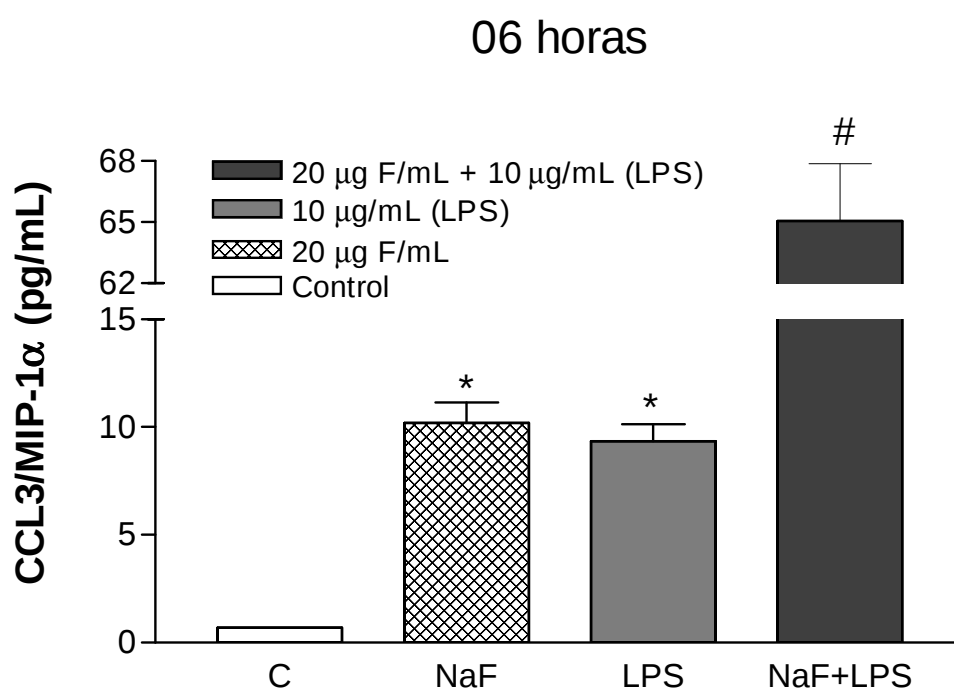


Figura 7 - Produção de CCL3/MIP-1α nos sobrenadantes de fibroblastos gengivais estimulados por NaF (20 µg/mL) na ausência ou presença de LPS (10 µg/mL) no tempo de 6 horas. Os resultados foram expressos pela média ± EPM (ANOVA, com correção de Bonferroni) * $p < 0,05$ e # $p < 0,001$. Este ensaio é representativo de um experimento realizado em triplicata.

4.8 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR FIBROBLASTOS GENGIVAIS ESTIMULADOS POR NaF E LPS

Avaliou-se a produção de NO (óxido nítrico) pelos fibroblastos gengivais de camundongos estimulados por NaF (1, 5, 10 e 20 µg F/mL) nos tempos de 1, 6 e 24 horas. Observou-se que o NaF não foi capaz de induzir a produção de NO nos fibroblastos gengivais.

4.9 AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS INIBIDORES: PD98059, SB202190, LY294002 E DEXAMETASONA SOBRE A EXPRESSÃO DE MMP-9 PELOS FIBROBLASTOS GENGIVAIS DE CAMUNDONGOS ESTIMULADOS POR NaF NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE LPS

As culturas de fibroblastos gengivais foram pré-tratadas 30 minutos antes do estímulo com os inibidores: PD98053 (inibidor da p44/42), SB202190 (inibidor da p38 MAPK), LY 294002 (inibidor da PI3K) e Dexametasona (glicocorticóide - NF-κB) após isso, foram estimuladas por NaF na presença ou ausência de LPS (Fig. 8). Observou-se que PD98053 e dexametasona foram capazes de inibir a expressão de RNAm para MMP-9 nos fibroblastos gengivais estimulados somente por NaF, somente por LPS e para os fibroblastos estimulados por NaF na presença de LPS, no entanto, LY294002 e SB202190 não foram capazes de promover essa inibição.

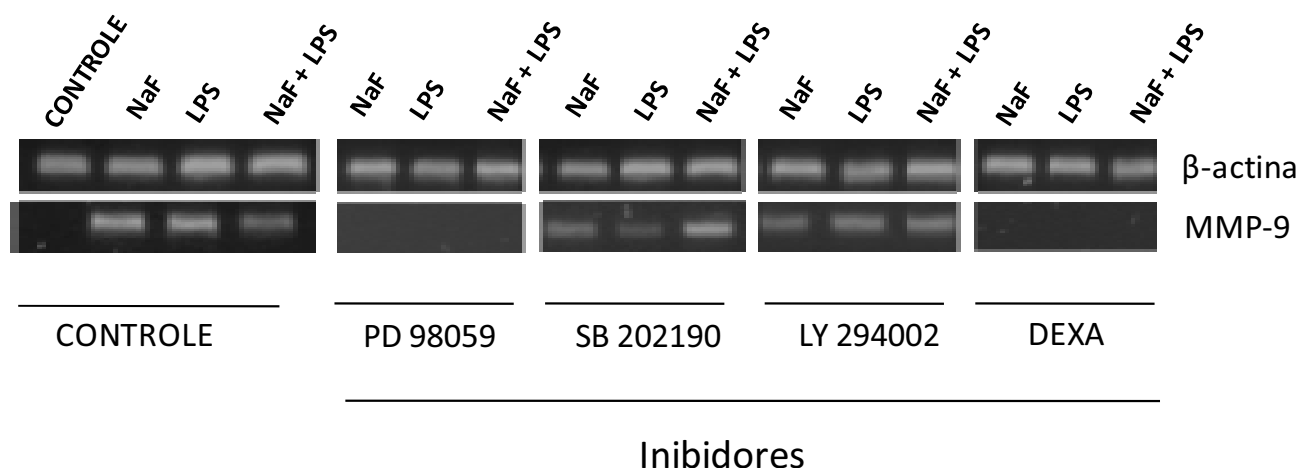


Figura 8 - Expressão de RNAm para MMP-9 de fibroblastos gengivais pré-tratados com inibidores e estimulados por 6 horas com NaF (20 μ g F/ml) na presença ou ausência de LPS (10 μ g/mL). Os fibroblastos foram pré-tratados com os inibidores PD98059 (50 μ M), SB202190 (10 μ M), LY294002 (30 μ M) e Dexametasona (10 μ M) 30 minutos antes do estímulo. O RNA total foi extraído e avaliado a sua expressão pela técnica RT-PCR utilizando gel de agarose (1,8%) com os produtos da PCR para detecção de β -actina (345 pb) e MMP-9 (481 pb).

4.10 AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS INIBIDORES: PD98059, SB202190, LY294002 E DEXAMETASONA NA EXPRESSÃO DE CCL3/MIP-1 α PELOS FIBROBLASTOS GENGIVAIS DE CAMUNDONGOS ESTIMULADOS POR NaF E LPS

Com o objetivo de identificar qual via de sinalização estaria envolvida na expressão de CCL3/MIP-1 α nos fibroblastos gengivais estimulados por NaF na presença ou ausência de LPS (10 μ g/mL), os fibroblastos foram pré-tratados com os inibidores: PD98059 (50 μ M), SB202190 (10 μ M), LY294002 (30 μ M) e Dexametasona (10 μ M) (Fig. 9). Os dados mostram que todos os inibidores utilizados no experimento foram capazes de bloquear a expressão de CCL3/MIP-1 α nesses fibroblastos submetidos aos estímulos.

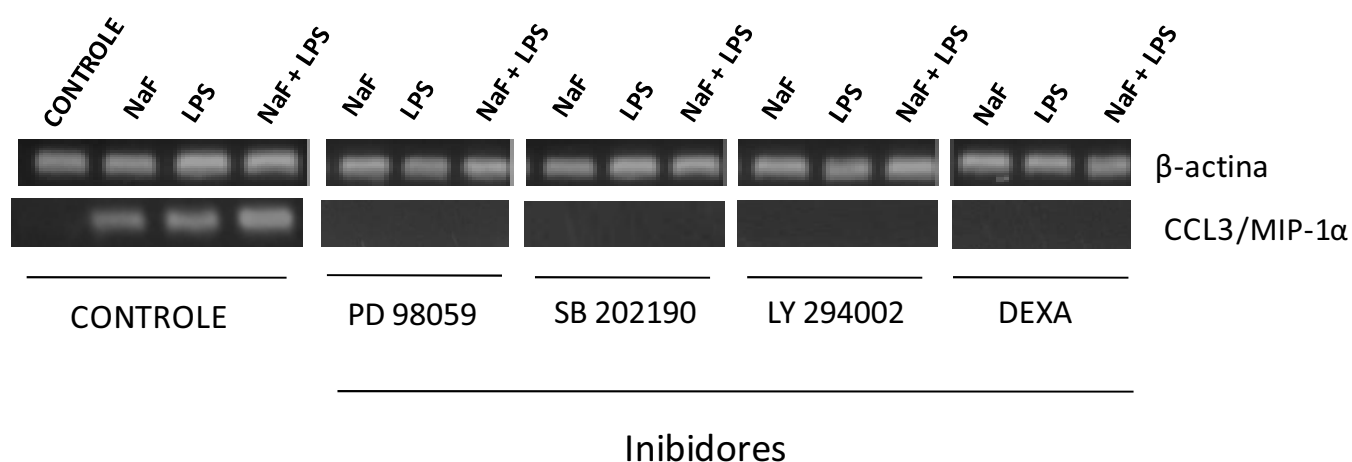


Figura 9 - Expressão de RNAm para CCL3/MIP-1 α de fibroblastos gengivais pré-tratados com inibidores e estimulados por 6 horas com NaF (20 μ g/ml) na presença ou ausência de LPS (10 μ g/ml). Os fibroblastos foram pré-tratados com os inibidores PD98059 (50 μ M), SB202190 (10 μ M), LY294002 (30 μ M) e Dexametasona (10 μ M), 30 minutos antes do estímulo. O RNA total foi extraído e sua expressão avaliada pela técnica da RT-PCR utilizando gel de agarose (1,8%) com os produtos da PCR para detecção de β -actina (345 pb) e CCL3 (258 pb).

4.11 AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS INIBIDORES: PD98059, SB202190, LY294002 E DEXAMETASONA NA PRODUÇÃO DE CCL3/MIP-1 α NOS SOBRENADANTE DE FIBROBLASTOS GENGIVAIS DE CAMUNDONGOS ESTIMULADOS POR NaF E LPS

No sentido de avaliar a presença de CCL3/MIP-1 α nos sobrenadantes dos fibroblastos gengivais pré-tratados com os inibidores: PD98053, SB202190, LY294002 e Dexametasona estimulados por NaF na ausência ou presença de LPS, a produção de CCL3/MIP-1 α foi quantificada utilizando-se o método ELISA (Fig. 10). Para o grupo que não foi pré-tratado com os inibidores (grupo controle) foram observados resultados semelhantes aos apresentados acima. Entretanto, quando esses fibroblastos foram pré-tratados com esses inibidores observou-se uma completa inibição na produção de CCL3/MIP-1 α nos fibroblastos gengivais.

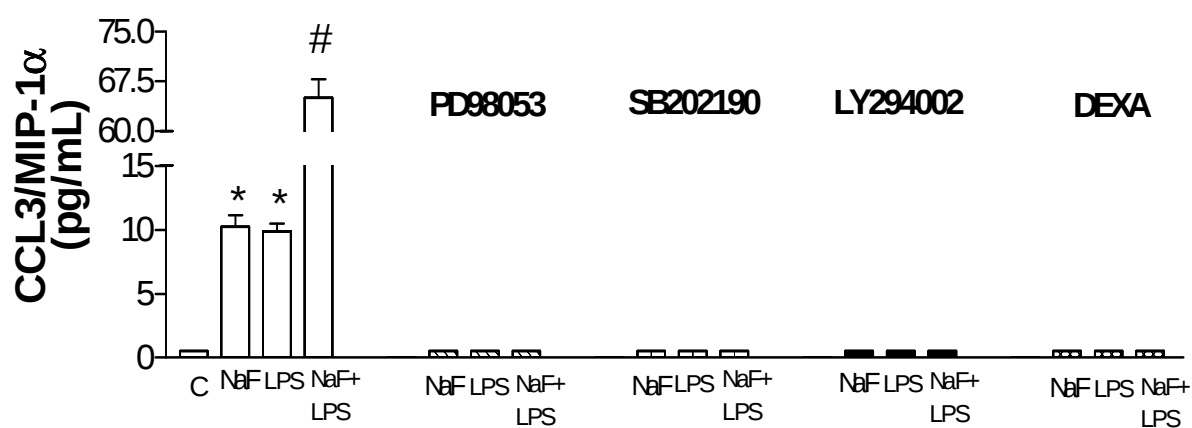


Figura 10 - Produção de CCL3/MIP-1α nos sobrenadantes de fibroblastos gengivais pré-tratados com os inibidores PD98059 (50 μM), SB202190 (10 μM), LY294002 (30 μM) e Dexametasona (10 μM) e estimulados por 6 horas com NaF (20 μg F/mL) na presença ou ausência de LPS (10 μg/ml). Os resultados foram expressos pela média ± EPM, * $p < 0,05$ e # $p < 0,001$ (ANOVA com correção de Bonferroni).

5 DISCUSSÃO

Nas ultimas décadas o flúor vem sendo amplamente utilizado na odontologia, tanto na forma tópica quanto na sistêmica, devido aos seus benefícios na redução da cárie dentária. Diante disso, observa-se um aumento indiscriminado na sua utilização e infelizmente um aumento significativo na prevalência da fluorose dentária. Atualmente existem muitos estudos direcionados aos efeitos nocivos desse íon nos tecidos mineralizados, no entanto, sabe-se muito pouco sobre seus efeitos no meio celular e os mecanismos envolvidos nesse processo. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão de MMP-2 e MMP-9 e a produção de CCL3/MIP-1 α desses fibroblastos gengivais estimulados por NaF e investigar as vias de sinalização intracelular envolvidas na ativação desses fibroblastos para produção das substâncias descritas acima.

Dados de literatura mostram que o flúor pode promover alterações nas células da polpa humana em cultura a partir da concentração de 19 μ g F/mL (CHANG e CHOU et al., 2001). Em fibroblastos orais humanos o NaF pode apresentar um efeito citotóxico a partir da concentração de 40 μ g F/mL (JENG et al., 1998). Quando dentifrícios fluoretados contendo 1500 μ g F/mL são utilizados a longo prazo, os tecidos da mucosa bucal podem apresentar até 19 μ g F/mL. Utilizando soluções para bochecho contendo 0,2 % de NaF, os tecidos da mucosa bucal podem conter até 40 μ g F/mL (JACOBSON et al., 1992).

Com base nesses dados, primeiramente o presente estudo avaliou a dose que poderia ser ideal para ativar os fibroblastos gengivais sem induzir morte celular. Para tanto se realizou o ensaio de citotoxicidade. Observou-se que a concentração de 40 µg F/mL após 24 horas resultou em um percentual de morte celular de 62,6%. Já a concentração de 20 µg F/mL, resultou em 22,1% de morte celular. Optou-se, então, por utilizar 20 µg F/mL como concentração máxima para os ensaios de ativação celular, já que 40 µg F/mL resultou em alto índice de morte celular, o que tornaria impossível a visualização da ativação dos fibroblastos nessa concentração.

A justificativa em estudar a ativação das metaloproteinases 2 e 9 deve-se principalmente ao fato de desempenharem uma importante função na destruição do tecido periodontal durante a periodontite e também por serem produzidas pelos fibroblastos (CHANG et al., 2002). Essas metaloproteinases pertencem ao mesmo subgrupo (gelatinases), sendo responsáveis por degradar elastina, fibronectina e colágeno (colágeno tipo IV) encontrado principalmente no tecido gengival (NAGASE; WOESSNER, 1999). A expressão dessas metaloproteinases pode ser regulada por vários estímulos incluindo o fator de crescimento, estímulos mitógenos e até por citocinas inflamatórias como a interleucina-1 β (SATO et al., 1993; YOKOO; KITAMURA, 1996). Neste trabalho, determinou-se a capacidade do NaF induzir a ativação dos fibroblastos gengivais para a expressão MMP-2 e MMP-9.

No presente estudo, observou-se que o NaF foi capaz de induzir os fibroblastos a expressarem MMP-9, somente na concentração de 20 µg

F/mL. No entanto, a expressão de MMP-2 não foi observada. Os dados do presente estudo podem ser relevantes visto que corroboram o estudo de Mostefaoui et al. (2002), no qual uma composição de células epiteliais da mucosa e fibroblastos orais foi estimulada com dois dentifrícios fluoretados (Crest® e Aquafresh®) observando-se somente a produção de MMP-9 e não de MMP-2. De acordo com Schönbeck et al. (1998), a produção de MMP-9 em fibroblastos orais pode ser mediada pela interleucina-1 β . Desta forma, sugere-se que a produção de MMP-9 pelos fibroblastos estimulados por NaF pode ser mediada pela presença de algumas citocinas liberadas durante esse estímulo.

A produção de metaloproteinase-2 pelos fibroblastos orais durante a periodontite pode ser inibida pela presença de TGF- β no local da inflamação (CHANG et al., 2002). Desta forma, pode-se sugerir que o NaF pode induzir a produção de TGF- β , causando a inibição da expressão MMP-2, justificando de certa forma o resultado encontrado.

Sabendo que o NaF foi capaz de ativar os fibroblastos gengivais a expressarem MMP-9, e que a concentração de 20 μ g F/mL pode ser observada no tecido da mucosa oral quando se faz uso contínuo de dentifrícios fluoretados com concentrações de 1.500 μ g F/mL (JACOBSON et al., 1992) utilizados na prevenção da cárie, é sugerida a utilização de produtos fluoretados com baixas concentrações de flúor, principalmente quando esses produtos são destinados ao uso infantil, para evitar possíveis danos ao tecido gengival e retardo na cicatrização durante a doença periodontal.

Com base em dados de literatura, sabe-se que a quimiocina CCL3/MIP-1 α participa tanto da fase aguda como da crônica no processo inflamatório desempenhando um importante papel na ativação e recrutamento de células pró-inflamatórias, como leucócitos, eosinófilos e neutrófilos (BONECCHI et al., 1999). Essa quimiocina também é encontrada durante a inflamação do tecido gengival com doença periodontal (JOHN; LUKACS, 2003). Desta forma, investigou-se a possibilidade do NaF induzir os fibroblastos gengivais a produzirem essa quimiocina.

Os dados do presente estudo demonstram que o NaF induziu os fibroblastos gengivais a produzirem CCL-3/MIP-1 α somente na concentração de 20 μ g F/mL. Essa produção diminuiu após o tempo de 24 horas, provavelmente em razão do início da morte celular. Sabe-se que o NaF é capaz de induzir a composição de células epiteliais da mucosa e de fibroblastos orais a produzirem interleucina-6 e interleucina-8, citocinas essas envolvidas no processo inflamatório no qual também são capazes de atrair neutrófilos (MOSTEFAOUI et al., 2002). Até o presente, não há relatos sobre os efeitos do NaF em relação à produção da quimiocina CCL3/MIP-1 α e da expressão de MMP-9 por fibroblastos gengivais. Desta forma, os dados deste estudo sugerem que o NaF na concentração de 20 μ g F/mL pode induzir uma degradação no tecido gengival em função da produção excessiva de MMP-9 e induzir também uma resposta inflamatória mediada pela quimiocina CCL3/MIP-1 α .

Durante a doença periodontal níveis elevados de óxido nítrico (NO) são encontrados no tecido gengival em decorrência do biofilme

bacteriano (PAQUETTE; WILLIAMS, 2000). Sabe-se que o óxido nítrico (NO), é um gás solúvel produzido por células endoteliais, macrófagos, neurônios (COLLINS, 2000) e fibroblastos (UGAR-ÇANKAL; OZMERIC, 2006) que desempenha uma importante função na regulação vascular, redução da agregação e aderência plaquetária, servindo como regulador do recrutamento de leucócitos durante o processo inflamatório (COLLINS, 2000). A síntese de NO ocorre a partir da L-arginina através da enzima óxido nítrico-sintase (MACMICKING et al., 1997; FANG, 1997). Sua inibição pode ocorrer na presença da arginase que compete com a L-arginina para utilizar o mesmo substrato (UGAR-ÇANKAL; OZMERIC, 2006). Desta forma, avaliou-se também a produção de óxido nítrico (NO) nos fibroblastos gengivais estimulados com NaF. Observou-se que esse estímulo não foi capaz de induzir a produção de NO pelos fibroblastos gengivais, sendo assim, sugerindo que o NaF pode ser capaz de induzir nesses fibroblastos a produção de arginase, com isso ocasionando o bloqueio da síntese de NO, ou que o mecanismo de ativação desses fibroblastos, estimulados pelo NaF, seja independente do NO.

Sabendo que NaF foi capaz de ativar os fibroblastos gengivais normais a expressarem MMP-9 e produzirem CCL3/MIP-1 α , avaliou-se a capacidade desse sal em ativar os fibroblastos gengivais a expressarem MMP-9 e produzirem CCL-3/MIP-1 α na presença de LPS. Para tanto utilizamos o LPS (lipopolissacarídeo) de *Escherichia coli* com o intuito de mimetizar o processo inflamatório nos fibroblastos gengivais avaliando os efeitos do NaF em um fibroblasto já ativado. Os dados demonstram que o

NaF foi capaz de induzir a expressão de MMP-9 nos fibroblastos com LPS, no entanto, conforme observado anteriormente, a produção de MMP-2 não foi visualizada. Observou-se que a expressão de MMP-9 nesses fibroblastos foi mais intensa quando comparada à expressão dos fibroblastos estimulados somente com NaF ou somente com LPS. Sugere-se que essa intensa expressão de MMP-9 induzida por NaF pelos fibroblastos na presença de LPS, pode estar relacionada com um possível sinergismo no qual outras citocinas podem ser liberadas, potencializando o efeito final. Dados de literatura mostram que o LPS é capaz de induzir fibroblastos orais a produzirem MMP-9 (BODET et al., 2007), entretanto, atualmente não há relato mostrando que o NaF pode potencializar a expressão de MMP-9 em fibroblastos gengivais ativados pelo LPS. Semelhantemente ao observado anteriormente, a expressão de MMP-2 não foi visualizada.

Com base nos resultados obtidos é sugerido que a presença de LPS pode potencializar a expressão de MMP-9 no processo inflamatório em tecido gengival. Desta forma, pode-se sugerir que um indivíduo que tenha doença periodontal e que faz uso de produtos fluoretados cronicamente, em altas concentrações, pode sofrer um aumento na destruição tecidual com possível retardo no processo cicatricial.

Já que foi observado em nosso estudo que o NaF foi capaz de ativar os fibroblastos gengivais de camundongos a produzirem CCL3/MIP-1 α , decidiu-se avaliar também a produção desta quimiocina em fibroblastos gengivais ativados pelo LPS. Os dados mostraram que o NaF intensificou a produção da quimiocina CCL-3/MIP-1 α nesses fibroblastos ativados pelo

LPS. Conforme observado na expressão de MMP-9, sugerindo que nesse caso também possa estar ocorrendo sinergismo durante a exacerbada produção de CCL-3/MIP-1 α , sugerindo também que durante a doença periodontal o NaF pode promover um aumento na resposta inflamatória justamente pela produção excessiva de CCL-3/MIP-1 α , já que essa quimiocina desempenha um importante papel na ativação e recrutamento de leucócitos ao local da inflamação. No entanto, não existem relatos na literatura que demonstrem essa intensificação da produção dessa quimiocina em fibroblastos gengivais ativados LPS e estimulados por NaF.

Visto que o NaF foi capaz de ativar os fibroblastos gengivais a expressarem MMP-9 e a produzirem CCL3/MIP-1 α tanto na ausência quanto na presença de LPS, decidiu-se investigar qual via de sinalização estaria envolvida durante a expressão e produção das respectivas substâncias.

A transdução de sinal das MAPK (p38 e p44/42) vindo sendo estudada devido a sua participação em inúmeras funções celulares (LEWIS et al., 1998). Sabe-se que a ERK1/2 (p44/42) está envolvido na ativação da proliferação e diferenciação celular e o p38 MAPK envolvida na apoptose e em respostas mediadas por estresse (HERLAAR; BROWN, 1999). O pré-tratamento dos fibroblastos gengivais com inibidores específicos da MAPK – proteína quinase ativadora de mitógeno- (ERK1/2 e p38) foi utilizado como ferramenta farmacológica. Observou-se que o inibidor específico da proteína quinase ativadora de mitógeno p44/42 (PD 98059) foi capaz de inibir a expressão de MMP-9 em fibroblastos na presença ou ausência de

LPS quando estimulados com NaF. Esses dados sugerem que NaF sozinho ou na presença de LPS foi capaz de ativar os fibroblastos gengivais a expressarem MMP-9 via p44/42. Corroborando nossos dados, resultados obtidos por outros autores mostram que a ativação da ERK 1/2 pode estar envolvida na produção de MMP-9 (LAI et al., 2003), no entanto, não há relatos na literatura sobre a ativação de fibroblastos gengivais para expressarem MMP-9 na presença ou ausência de LPS estimulados por NaF, o que nos leva a concluir que este trabalho seja o primeiro a realizar este tipo de estudo.

Outra via de sinalização importante envolvida no processo inflamatório é a p38 MAPK. Avaliou-se a participação dessa via de sinalização também sobre a expressão de MMP-9 pelos fibroblastos gengivais estimulados somente por NaF ou na presença de LPS. Observou-se que a inibição da expressão MMP-9 nesses fibroblastos após a utilização do inibidor específico da p38 MAPK (SB 202190) não ocorreu. Esses dados sugerem que a expressão de MMP-9 pelos fibroblastos gengivais estimulados pelo NaF não é ativada por essa via, possivelmente porque a via de sinalização p38 MAPK é responsável principalmente pela produção e ativação de algumas citocinas como a interleucina-4 (FOLTZ et al., 1997), alguns mediadores inflamatórios como, por exemplo, aminas vaso-ativas e metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos) (BARNES et al., 1998), mas não na ativação de metaloproteinases (FOLTZ et al., 1997).

Seguindo a investigação das vias de sinalização responsáveis pela ativação de MMP-9 induzida por NaF, pré-tratamos os fibroblastos gengivais com o inibidor da PI3K (LY 294002). Novamente não houve inibição da produção de MMP-9. De acordo com dados de literatura, sabe-se o PI3K é positivamente regulado em consequência da ativação de receptores tirosino-quinases, de receptores de proteína G ou integrinas (NICHOLSON; ANDERSON, 2002). Além disso, a ativação da PI3K pode estar relacionada principalmente com a quimiotaxia celular (WEBER et al., 1998; NOBES; HALL, 1999) e com a produção de citocinas e quimiocinas, como por exemplo, CCL3/MIP-1 α (FINE et al., 2001). Assim como a via de sinalização p38, sugere-se também que a via PI3K não seja responsável pela ativação da MMP-9.

Quando os fibroblastos gengivais foram pré-tratados com dexametasona (inibidor da NF- κ B) e estimulados por NaF na ausência ou presença de LPS, observa-se resultados semelhantes ao pré-tratamento com o inibidor PD98053. É sabido que a via de sinalização intracelular NF- κ B é ativada principalmente por receptores encontrados em patógenos conhecidos pela indução da doença periodontal cuja ligação é ocasionada por produtos sintetizados por esses microorganismos como, por exemplo, o LPS. Essa ativação é responsável por desencadear uma resposta inflamatória induzindo a liberação de citocinas ou quimiocina e enzimas destrutivas (MORI et al., 2003; KUSUMOTO et al., 2004; REN et al., 2005).

Sabe-se que a ativação de MMP-9 é regulada pela via de sinalização NF- κ B. Assim a inibição dessa via provoca também a inibição da produção de MMP-9 (EBERHARDT et al., 2002). Estudos recentes mostram que a inibição da expressão de MMP-9 por meio da dexametasona ocorre em vários tipos celulares incluindo células da mucosa oral (KYLMANIEMI et al., 1996). De acordo com Eberhardt et al. (2002), reduzindo a IL-1 β indutora de MMP-9 com glicocorticóides pode haver inibição da expressão gênica de MMP-9, isso porque a regulação dessa expressão ativada por IL-1 β é dependente da ativação de NF- κ B. (YOKOO; KITAMURA, 1996; EBERHARDT et al., 2000). Desta forma, pode-se sugerir que a ativação da MMP-9 é dependente da via de sinalização NF- κ B.

Quanto à produção de CCL3/MIP-1 α pelos fibroblastos gengivais estimulados por NaF na presença ou ausência de LPS, foi observada uma inibição na produção dessa quimiocina por todos os inibidores utilizados no presente estudo. Em estudos realizados por Fine et al. (2001) mostram que a liberação de CCL3/MIP-1 α em monócitos pode estar relacionada com a via de sinalização da PI3K. A quimiocina CCL3/MIP-1 α também é ativada via p38 (WANG et al., 1999), via p44/42 (YEN et al., 1997) e via NF- κ B (HELD et al., 2001). Os resultados desses estudos corroboram a presente pesquisa. Com base no presente estudo sugere-se que os inibidores: PD98053, SB202190, LY294002 e dexametasona, promoveram a inibição da quimiocina CCL-3/MIP-1 α induzida por fibroblastos gengivais por NaF indicando a dependência das vias p44/42, p38, PI3K e NF- κ B na produção de CCL3/MIP-1 α .

Concluindo, nossos dados mostram que NaF foi capaz de ativar fibroblastos gengivais a expressarem metaloproteinase-9 via p44/42 e via NF-KB. Esse estímulo, também promoveu nos fibroblastos gengivais a produção da quimiocina CCL3/MIP-1 α ativada pelas vias de sinalização p44/42, p38, PI3K e NF- κ B. Com isso, pode-se sugerir que o bloqueio dessas vias responsáveis pela ativação da metaloproteinase-9 e da quimiocina CCL-3/MIP-1 α pode ser utilizada como uma ferramenta terapêutica durante uma possível resposta inflamatória ocasionada pelo uso crônico e excessivo de NaF.

Tomados em conjunto, os resultados do presente estudo sugerem que o emprego do NaF em altas concentrações, além de possibilitar o desenvolvimento de fluorose dental, pode também causar alteração no tecido gengival. Essa alteração pode ser mais intensa quando o indivíduo apresenta inflamação gengival ocasionada pelo acúmulo de biofilme. Portanto, sugerimos a utilização de produtos fluoretados em baixas concentrações é mais segura, possuindo eficácia comprovada, sem a desvantagem de causar possíveis danos ao tecido gengival.

6 CONCLUSÃO

Ao investigar os mecanismos envolvidos na ativação intracelular para a expressão de MMP-2 e MMP-9 e expressão e produção de CCL3/MIP-1 α nos fibroblastos gengivais estimulados por NaF na ausência ou presença de LPS, concluímos que:

- O efeito citotóxico do NaF ocorre de maneira dose e tempo-dependente nos fibroblastos gengivais em cultura na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$;
- O NaF (20 $\mu\text{g/mL}$) foi capaz de ativar os fibroblastos gengivais em cultura na presença ou ausência de LPS a expressarem MMP-9, mas não MMP-2, via p44/42 e via NF- κB ;
- O NaF (20 $\mu\text{g/mL}$) promoveu a ativação dos fibroblastos gengivais em cultura na presença ou ausência de LPS a expressarem e produzirem CCL3/MIP-1 α ; via p44/42, p38 MAPK, PI3K e NF- κB ;
- Na presença de LPS, os fibroblastos gengivais em cultura estimulados por NaF tiveram uma potencialização na expressão de MMP-9;
- Na presença de LPS, os fibroblastos gengivais em cultura estimulados por NaF tiveram uma potencialização na expressão e produção de CCL3/MIP-1 α .

7 REFERÊNCIAS

ADACHI, T. et al. The differential role of extracellular signal-regulated kinases and p38 mitogen-activated protein kinase in eosinophil functions. **J Immunol**, v. 165, p.2198-2204, 2000.

ADAIR, S.M. Overview of the history and status of fluoride supplementation schedules. **J Public Health Dent**, v.59, n.4, p. 252-258, Fall.1999.

ALLEN, W.E. et al. A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. **J Cell Biol**, v.141, n.5, p.1147-57, Jun. 1998.

AMIN, A.R.M.R. et al. Secretion of matrix metalloproteinase-9 by the proinflammatory cytokine, IL-1 β : a role for the dual signaling pathways, Akt and ERK. **Genes to Cells**, v. 8, p.515-523, 2003.

BARNES, P.J.; CHUNG, K.F.; PAGE, C.P. Inflammatory mediators of asthma: an update. **Pharmacol Rev**, v.50, n.4, p.515-96, Dec. 1998.

BODET, C. et al. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide regulates matrix metalloproteinase, tissue inhibitors of matrix metalloproteinase, and plasminogen activator production by human gingival fibroblasts: a potential role in connective tissue destruction. **J Cell Physiol**, v.212, n.1, p.189-194, Jul. 2007.

BONECCHI, R. et al. Up-regulation of CCR1 and CCR3 and induction of chemotaxis to CC chemokines by IFN-gamma in human neutrophils. **J Immunol**, v.162, n.1, 474-479, jan 1999.

CHANG, Y. C.; CHOU, M. Y. Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures in vitro. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 91, n.2, p.230-234, Feb, 2001.

CHANG, Y.C. et al. Regulation of matrix metalloproteinases production by cytokines, pharmacological agents, and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. **J Periodontal Res**, v.37, n.3, p.196-203, Jun. 2002.

COLLINS, T. Inflamação aguda e crônica. In: COTRAN R. S., KRUMAN V., COLLINS T. **Robbins – Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan, p.44-78. 2000.

CURY, J.A. Uso do flúor e o controle da cárie como doença. In: BARATIERI, L. N. et al. **Odontologia Restauradora: fundamentos e possibilidades**. 2. ed. São Paulo: Santos. p. 34-68, 2001.

EBERHARDT, W. et al. Amplification of IL-1 β -induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF- κ B and activating protein kinase pathways. **J Immunol**, v.165, p.5788-5797, 2000.

EBERHARDT, W. et al. Glucocorticoid-mediated suppression of cytokine-induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat mesangial cells: Involvement of nuclear factor- κ B and ets transcription factors. **Mol Endocrinol**, v.16, n.8, p.1752-1766, August, 2002.

FANG, F. C. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. **J Clin Invest**, v. 99, p. 2818-225, 1997.

FEJERSKOV, O.; BÆLUM, V.; RICHARDS, A. Dose-response and dental fluorosis. In: FEJERSKOV, O.; EKSTRAND, J.; BURT, B.A. **Fluoride in dentistry**. 2nd. ed. Copenhagen: Munksgaard, p.153-166. 1996.

FINE, J.S. et al. Evaluation of signal transduction pathways in chemoattractant-induced human monocyte chemotaxis. **Inflammation**, v.25, n.2. p.61-67, 2001.

FOLTZ, I.N.; LEE, J.C.; YOUNG, P.R.; SCHRADER, J.W. Hemopoietic growth factors with the exception of interleukin-4 activate the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. **J Biol Chem**, v.272, n.6, p.3296-3301, Feb. 1997.

GRAHAM, G. J. et al. Identification and characterization of an inhibitor of haemopoietic stem cell proliferation. **Nature**, v. 344, p.442-444, 1990

GREEN, L.C. et al. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v.126, n.1, p.131-138, Oct. 1982.

HELD, H. D. et al. Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear factor- κ B and is blocked by steroids. **Am J Respir Crit Care Med**, v.163, p.711-716, Mar. 2001.

HELGELAND K, LEIRSKAR J. pH and the cytotoxicity of fluoride in an animal cell culture system. **Scand J Dent Res**, v.84, p. 37-45. Jan. 1976.

HERLAAR, E.; BROWN, Z. p38 MAPK signaling cascades in inflammatory disease. **Mol Med Today**, v.5, n.10, p.439-447. Oct. 1999.

HUANG, F. M. et al. Examination of the signal transduction pathways involved in matrix metalloproteinase-2 in human pulp cells. **Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod**, v.97, p.398-403, 2004.

IGARASHI, M. et al. Inductive effects of dexamethasone on the gene expression of Cbfa1, osterix and bone matrix proteins during differentiation of cultured primary rat osteoblasts. **J Mol Histol**, v. 35, p. 3-10, 2004.

ISHIDA, Y. et al. Essential roles of the CC chemokine ligand 3-CC chemokine receptor 5 Axiz in bleomycin-induced pulmonary fibrosis through regulation of macrophage and fibrocyte infiltration. **Am J Pathol**, v. 170, p. 843-854, 2007.

JACOBSON, A.P.M.; STEPHEN, K.W.; STRANG, R. Fluoride uptake and clearance from the buccal mucosa following mouthrinsing. **Caries Res**, v. 26, p. 56-58, 1992.

JENG, J.H. et al. Cytotoxicity of sodium fluoride on human oral mucosal fibroblasts and its mechanisms. **Cell Biol Toxicol**, v.14, n.6, p. 383-389, Dec. 1998.

JOHN, A. E.; LUKACS, N. M. Chemokines and asthma. **Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis**, v.20, n.3, p.180-189, Oct. 2003.

KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. **Ann Rev Immunol**, v.18, p.621-663, 2000.

KOCH, A.; KUNKEL, S.; HARLOW, L.; MAZARAKIS, D.; HAINES, G.; BURDICK, M.; POPE, R.; STRIETER, R. Macrophage inflammatory protein-1 alpha. A novel chemotactic cytokine for macrophages in rheumatoid arthritis. **J Clin Invest**, v.93, p.921-928, Mar,1994.

KUSUMOTO, Y; et al. Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 after stimulation with Porphyromonas gingivalis via toll-like receptor 2. **J Periodontol**, v.75, n.3, p.370-9. Mar. 2004.

KYLMANIEMI, M. et al. Effects of dexamethasone and cell proliferation on the expression of matrix metalloproteinases in human mucosal normal and malignant cells. **J Dent Res**, v.75, p.919-926, 1996.

LAI, W-C. et al. Differential regulation of lipopolysaccharide-induced monocyte matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MM-9 by p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. **J Immunol**, v.170, p.6244-6249, 2003.

LEKIC, P.C.; PENDER, N; MCCULLOCH, C.A. Is fibroblast heterogeneity relevant to the health, diseases and treatments of periodontal tissues? **Crit Rev Oral Biol Med**, v.8, n.3, p.253-268, 1997.

LEVY, S.M. Review of fluoride exposures and ingestion. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.22, n.3, p.173-180, June. 1994.

LEWIS, T.S.; SHAPIRO, P.S.; AHN, N.G. Signal transduction through MAP kinase cascades. **Adv Cancer Res**, v.74, p.49-139. 1998.

LI, J. et al. Collagen degradation in a murine myocarditis model: relevance of matrix metalloproteinase in association with inflammatory induction. **Cardio Res**, v. 56, p. 235-247, 2002.

MACMICKING, J.; XIE, Q-W., NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 323-350, 1997.

MATRISIAN, L.M. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. **Trends Genetic**, v.6, n.4, p.121-125, Apr. 1990.

MAURER, M.; von STEBUT, E. Macrophage inflammatory protein-1. **Int J Biochem Cell Biol**. V.36n.10 p.1882-1886, Oct, 2004.

MILLER, M. D.; KRANGEL, M. S. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. **Crit Rev Immunol**, v.12, p.17-46, 1992.

MORI, Y.; YOSHIMURA, A.; UKAI, T.; LIEN, E.; ESPEVIK, T.; HARA, Y. Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis. **Oral Microbiol Immunol**, v.18, n.1, p.54-8. Feb. 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v.65, n.1-2, p.55-63, Dec 16 .1983.

MOSTEFAOUI, Y. et al. Tissue structure, and Il-1 β , Il-8, and TNF- α secretions after contact by engineered human oral mucosa with dentifrices. **J Clin Periodontol**, v.29, n.11, p.1035-1041, Nov. 2002.

MURAKAMI, S.; OKADA, H. Cytokine expression in periodontal health and disease. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 9, n.3, p. 248-266. 1998.

MURDOCH, C.; FINN, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Blood**, v.95, n.10, p.3032-43, May. 2000.

NAGASE, H.; WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases. **J Biol Chem**, v. 279, p.21491-21494. 1999.

NICHOLSON, K.M.; ANDERSON, N.G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. **Cell Signal**, v.14, n.5, p.381-95, May, 2002.

NOBES, C. D.; HALL, A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. **J Cell Biol**, v.141, p.1235-1244, 1999.

OGURO A, KOIZUMI N, HORII K. Effect of fluoride ion on proliferation of Vero cell line cells: growth acceleration by sodium fluoride. **Koku Eisei Gakkai Zasshi**, v.31, n.5 p. 55-62, Jan, 1982.

OPPENHEIM, J. J.; ZACHARIAE, C. O.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K.; Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine"cytokine family. **Annu Rev Immunol**, v.9, p.617-648, 1991.

PAIVA, S.M. **Contribuição ao estudo da fluorose dentária, na dentição permanente, numa comunidade com fluorose dentária endêmica.** 1991. 99f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1991.

PAQUETTE, D. W.; WILLIAMS, R. C. Modulation of host inflammatory mediators as a treatment strategy for periodontal diseases. **Periodontol** **2000**, v.24, p.239-252, 2001.

REN, L.; LEUNG, W.K.; DARVEAU, R.P.; JIN, L. The expression profile of lipopolysaccharide-binding protein, membrane-bound CD14, and toll-like receptors 2 and 4 in chronic periodontitis. **J Periodontol**, v.76, n.11, p.1950–1959. Nov. 2005.

SANTOS, S.F. et al. Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. **J Appl Oral Sci**, v.12, n.1, p.1-11, Jan./Mar. 2004.

SATO, H.; KITA, M.; SEIKI, M. v-Src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements. A mechanism regulating gene expression independent of that by inflammatory cytokines. **J Biol Chem**, v.268, p.23460–23468, 1993.

SATO, T.; YAGORI, A.; NIWA, M. Low sensitivity of cultured human young adult and adult gingival fibroblasts to fluoride. I. Relation to doubling time. **Pharmacol Toxicol**, v. 61, n.5, p.313-5, Nov, 1987.

SCHONBECK, U.; MACH, F.; LIBBY, P. Generation of biologically active IL-1 β by matrix metalloproteinase: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 β processing. **J Immunol**, v. 161, p. 3340-3346, 1998.

SHIN, S.J. et al. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. **J Endod**, v.28, n. 4, p.313-315, Apr. 2002.

SMITH, R. S. et al. Fibroblast as sentinel cells: Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. **Am J Pathol**, v.151, n.2, p.317-322, Aug, 1997.

TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. **J Clin Invest**, v.107, p.7-11, 2001.

TSAI, C.H. et al. Matrix metalloproteinase 2 and 9 expression in human oral squamous cell carcinoma and the effect of protein Kinase C inhibitors: preliminary observations. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol, Oral Radiol Endod**, v.95, n. 6, p. 710-716, Jun. 2003.

UGAR-ÇANKAL, D.; OZMERIC, N. A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. **Clin Chimica Acta**, v. 366, p.90-100, 2006

UITTO, V. J.; OVERALL, C. M.; McCULLOCH, C. Proteolytic host enzymes in gingival crevice fluid. **Periodontol** 2000, v.31, p.77-104, 2003.

VANE, J. R. et al. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. **Proc Nati Acad Sci USA**, v.91, n.6 p.2046-2050, Mar.1994.

WANG, S. W. et al. Cytokine mRNA decay is accelerated by an inhibitor of p38-mitogen-activated protein kinase. **Inflamm Res**, v.48, p.533-538, 1999.

WEBER, K. S. C. et al. Chemokine-induced monocyte transmigration requites cdc42-mediated cytoskeletal changes. **Eur J Immunol**, v.28, p.2245-2251, 1998.

WERB, Z. Proteinases and matrix degradation. In: KELLY, W.N. et al. **Textbook of Rheumatology**, 3rd. ed. Philadelphia: Saunders, 1989. p.300-321.

WOESSNER JUNIOR, J.F. Matrix Metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB J**, v.5, n. 8, p. 2145-2154, May. 1991.

WOESSNER, J.F.; NAGASE, H. **Matrix metalloproteinases and TIMPs**. Protein profile. Oxford: Oxford University Press, 2000.

YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R. B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. **J Clin Invest**, v.107, p.135-142, 2001.

YEN, H. H. et al. MCP-1 mediated chemotaxis requires activation of non-overlapping signal transduction pathways. **J Leuk Biol**, v.61, p529-532, 1997.

YOKOO, T.; KITAMURA, M. Dual regulation of IL-1 β -mediated matrix metalloproteinase-9 expression in mesangial cells by NF- κ B and AP-1. **Am J Physiol**, v.270, p.28620-28628, 1994.

ZHANG, Y-M. et AL. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in aging of transgenic mouse liver. **Chin Med J**, v.119, n.6, p.504-509, Mar. 2006.

Anexos

ANEXO A



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Campus de Araçatuba



unesp

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEa)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"ESTUDO DA EXPRESSÃO DE MMP-2 E MMP-9 POR FIBROBLASTOS GENGIVAIS DE CAMUNDONGOS ESTIMULADOS POR DENTIFRÍCIOS FLUORETADOS VIA NF- κ B, P44/42, P38 E PI3K"** sob responsabilidade de SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA, GILBERTO CARLOS TIANO E RENATO RODRIGUES CIMO está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEa em reunião ordinária de 15 de fevereiro de 2006, de acordo com o protocolo nº 51/06

Araçatuba, 15 de fevereiro de 2006


Prof.ª Ass. Dr.ª Maria Gisela Laranjeira
Presidente

ANEXO B

SOLUÇÕES

1 TAMPÃO SALINA-FOSFATO (PBS)

Cloreto de sódio P.A. (MERCK)-----	8,0g
Cloreto de potássio P.A. (MERCK)-----	0,2g
Fosfato de sódio dibásico P.A. (MERCK)-----	1,15g
Fosfato de potássio monobásico P.A. (MERCK)-----	0,2g
Água deionizada Mili-Q q.s.p-----	1 L

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH ou HCl e a solução autoclavada antes de ser utilizada.

2 MEIO DE EAGLE MODIFICADO POR DULBECO (DMEM) Completo

Bicarbonato de sódio P.A. (Merck)-----	3,7 g
Água deionizada Mili-Q q.s.p-----	1 L
Meio de Eagle Modificado por Dulbeco-----	
Soro fetal bovino (Sigma)-----	150 mL
Penicilina/Streptomicina (Sigma)-----	10 mL
Gentamicina-----	1 mL
Fungisone-----	0,3 mL
Glutamina-----	20 mL

O pH foi ajustado para 7,2 o meio filtrado em milipore 0,22 µm e mantido a 4°C.