

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Área de Concentração em Dentística



Dissertação

Efeito do laser de baixa potência na proliferação de fibroblastos pulpares humanos e na atividade das metaloproteinases 2 e 9 *in vitro*

Rodrigo Varella de Carvalho

Pelotas, 2006

RODRIGO VARELLA DE CARVALHO

**EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA PROLIFERAÇÃO DE
FIBROBLASTOS PULPARES HUMANOS E NA ATIVIDADE
DAS METALOPROTEINASES 2 E 9 *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Dentística.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Etges

Co-Orientadoras: Profa. Dra. Fátima Teresa Alves Beira
Profa. Dra. Isabel Oliveira de Oliveira

Pelotas, 2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C331e Carvalho, Rodrigo Varella de

Efeito do *laser* de baixa potência na proliferação de fibroblastos pulpare humanos e na atividade das metaloproteinases 2 e 9 in vitro / por Rodrigo Varella de Carvalho. – 2006
63 f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia., Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, 2006. “Orientação: Prof.^a Dr.^a. Adriana Etges ; Co-orientação: Prof.^a. Dr.^a. Fátima Tereza Alves Beira, Prof.^a Dr.^a. Isabel Oliveira de Oliveira.

1. Dentística .2. Terapia a *laser* de baixa intensidade. 3. Metaloproteinases da matriz. 4. Fibroblastos. 5. Técnicas de cultura de células. I.Título.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Adriana Etges
Profa. Dra. Elena Riet Correa Rivero
Prof. Dr. João Batista César Neto

DEDICATÓRIA

À minha família, meus pais Tabajara e Edite, e meus irmãos Juliano e André Luiz, pelo contínuo incentivo à minha formação e por nosso amor.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora Adriana Etges pelo seu profissionalismo, inteligência, incentivo, tranquilidade e, sobretudo, pela confiança depositada em mim na confecção deste trabalho. Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Suzana Cantanhede Orsini Machado de Souza por permitir o meu acesso à Pós-Graduação em Patologia Bucal da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr. pela gentileza em colocar a disposição o Laboratório de Biologia Celular da Universidade de São Paulo, onde foram realizados os experimentos.

Ao Prof. Dr. Flávio Fernando Demarco e Profa. Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquínio pelas excelentes considerações feitas na qualificação do projeto, o que o tornou mais adequado.

Ao Prof. Dr. Evandro Piva, que na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas permitiu a minha ausência para a realização deste trabalho.

Às Profas. Dras. Fátima Beira e Isabel de Oliveira pela co-orientação deste trabalho e pela contribuição na criação do Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Pelotas.

Aos Professores do curso de Pós-Graduação em Odontologia pela ajuda na minha formação e pela disposição em contribuir sempre.

Ao colega de Pós-Graduação Fabrício Ogliari pela fantástica ajuda com o programa SigmaPlot na confecção dos gráficos.

Aos meus colegas e grandes amigos Sinval, Henrique e Lund, pessoas muito importantes na minha formação.

A todos os meus colegas de Pós-Graduação pela convivência e pelos duros momentos de trabalho.

Ao doutorando em Patologia Bucal, da Universidade de São Paulo, Sérgio de Melo Alves Jr. por ter me ajudado em São Paulo desde a minha chegada, pela ajuda com o cultivo celular e com o programa ImageJ.

Ao doutorando em Patologia Bucal, da Universidade de São Paulo, Fabrício Passador pela hospitalidade em São Paulo, permitindo minha organização inicial na selva-de-pedra.

À doutoranda Elizabete Martinez pela ajuda inicial com a execução dos trabalhos pilotos.

A todos os alunos de pós-graduação em Patologia Bucal da Universidade de São Paulo, que em nenhum momento me trataram como estranho e que só me remetem a boas lembranças.

Ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (área de concentração em Dentística) por minha formação e pelas amplas linhas de pesquisa e pensamento, resultado de muito trabalho.

Aos Professores Souza, Oscar e Camila por dividirem comigo as disciplinas de Dentística I e II, onde aprendi muito.

À Universidade Federal de Pelotas, meu local de estudo, ensino e pesquisa, por isso quero sempre melhorá-la.

Aos Professores e Funcionários da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas.

Aos Alunos da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas.

À CAPES pelo auxílio financeiro no desenvolvimento desta dissertação

“O maior naufrágio é não partir”.

Amyr Klink

Resumo

CARVALHO, Rodrigo Varella de. **Efeito do laser de baixa potência na proliferação de fibroblastos pulpares humanos e na atividade das metaloproteinases 2 e 9 *in vitro***. 2006. 61. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade das gelatinases (MMP-2 e MMP-9), e a proliferação de fibroblastos pulpares humanos *in vitro*, após a irradiação com um diodo laser de baixa de baixa potência (780nm). A atividade foi avaliada com zimografia e as taxas de proliferação e contagem celular foram obtidas através de curvas de crescimento feitas com o software SigmaPlot (8.0), após a contagem em câmara de Neubauer ao microscópio óptico. As células usadas para a zimografia foram cultivadas em DMEM, com SFB a 10% e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ e 95% de ar, em 100% de umidade. Já, as células usadas para a taxa de proliferação e contagem celular foram cultivadas em déficit nutricional (5% SFB). Os grupos para zimografia e para a contagem e taxa de proliferação foram determinados: a) zimografia - Z1 = sem irradiação, Z2 = 3J/cm² e Z3 = 6J/cm² e b) proliferação e contagem celular - L1 = sem irradiação, L2 = 3J/cm² e L3 = 6J/cm². A contagem celular foi realizada em após 2, 4 e 6 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata. A zimografia mostrou que a atividade da MMP-2 foi maior que a MMP-9, e Z2 e Z3 produziram uma grande atividade, quando comparados ao grupo Z1. Os resultados da zimografia e dos testes de contagem e proliferação celular foram comparados por análise de variância (ANOVA) e complementado pelo teste Tukey. O nível de significância utilizado foi de % ($p < 0,05$). A análise estatística demonstrou diferença entre os grupos nos diferentes dias para a proliferação e contagem celular. O grupo L3 obteve a maior contagem celular ao final dos seis dias avaliados. O grupo L2 demonstrou maior proliferação que o grupo L1. Os fibroblastos irradiados com o laser de baixa potência expressaram uma alta atividade de MMP-2 e a dose 6J/cm² produziu uma alta taxa de proliferação nos primeiros dias.

Palavras-chave: Laser de baixa potência. Metaloproteinases. Fibroblastos.

Abstract

CARVALHO, Rodrigo Varella de. **Effect of low power laser in the human pulp fibroblasts proliferation and in the activity of metalloproteinases 2 and 9 in vitro**. 2006. 65p. Dissertação (Mestrado) – Program of Post-Graduation in Dentistry. University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

The aim of the present study was to evaluate the gelatinase activity (MMP-2 and 9), and proliferation of human pulp fibroblasts in vitro, after irradiation with a low level diode laser (780nm). The activity was evaluated with zymography and the proliferation rate was obtained through growth curves made in SigmaPlot (8.0), after the counting in Neubauer chamber in light microscope. Cells used to zymography were cultivated in DMEM, 10% fetal bovine serum and incubated at 37°C in atmosphere of 5% CO₂ and 95% air, in 100% humidity. Cells used to proliferation rate were cultivated in nutritional deficit (5% SFB). Groups to zymography and cell proliferation were determined: zymography - Z1 = not irradiated, Z2 = 3J/cm² e Z3 = 6J/cm², cell proliferation: L1 = not irradiated, L2 = 3J/cm² e L3 = 6J/cm². The counting was made after 2, 4 and 6 days. Assays were performed in triplicate. The zymography showed that the MMP-2 activity was major with MMP-9, and, Z2 e Z3 produced a higher activity than MMP-2, when compared to Z1. Results of the zymography and proliferation test were compared by either ANOVA complemented by Tukey's test. The level of significance was 5% (p<0,05). Statistical analysis demonstrate difference between the groups in different days. The L3 obtained higher proliferation in the finish of the six days. L2 demonstrated higher growth than L1. Irradiated fibroblasts with the low power laser expressed a higher amount of MMP-2 activity and 6J/cm² produced a higher proliferation rate in the initial days.

Keywords: Low power laser. Metalloproteinases. Fibroblasts.

Lista de Figuras

Figura 1	Representação esquemática de comprimento e amplitude de onda.....	20
Figura 2	Mecanismo de ativação fotoquímica desencadeado pela irradiação com laser de baixa potência.....	22
Figura 3	Desenho esquemático da imagem ao microscópio invertido da câmara de Neubauer, marcadas com a letra L as quatro porções contadas.....	33
Figura 4	Demonstração dos grupos em triplicata e da irradiação do precipitado celular, tanto para a contagem, quanto para zimografia.....	35
Figura 5	Contagem celular obtida nos diferentes dias avaliados.....	39
Figura 6	Taxa de proliferação celular nos diferentes dias.....	40
Figura 7A	Imagem digitalizada por scanner mostrando as bandas da metaloproteinase 2 nos diferentes grupos.....	43
Figura 7B	Análise densitométrica das bandas da MMP-2 com o programa ImageJ 1.28.....	43
Figura 7C	Gráfico representativo dos dados gerados após a densitometria das bandas da MMP-2.....	43
Figura 8A	Imagem digitalizada por scanner mostrando as bandas da metaloproteinase 9 nos diferentes grupos.....	45
Figura 8B	Análise densitométrica das bandas da MMP-9 com o programa ImageJ 1.28.....	45
Figura 8C	Gráfico representativo dos dados gerados após a densitometria das bandas da MMP-9.....	45

Lista de Tabelas

Tabela 1	Diferentes tratamentos aplicados com o laser de baixa potência, para os diferentes grupos do ensaio de curva de crescimento.....	34
Tabela 2	Diferentes tratamentos aplicados com o laser de baixa potência, para os diferentes grupos no ensaio de zimografia.....	37
Tabela 3	Média e desvio padrão da proliferação celular de acordo com o grupo (contagem/dia e irradiação).....	38
Tabela 4	Média e desvio padrão da atividade da MMP-2 de acordo com o grupo.....	40
Tabela 5	Média e desvio padrão da atividade da MMP-9 de acordo com o grupo.....	40
Tabela 6	Média e desvio padrão da atividade da MMP-2 e MMP-9, após a soma dos valores dos grupos (sem irradiação, 3J/cm ² e 6J/cm ²)....	41

Lista de Abreviaturas e Siglas

-	Menos
%	Por cento
/	Por
®	Indicativo de marca registrada
μ	Micrômetro
μl	Microlitro
10 ⁴	Dez elevados à quarta potência
Ca ²⁺	Íon cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAT	Domínio catalítico
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cm ²	Centímetros quadrados
CO ₂	Gás carbônico
SFB	Soro Fetal Bovino
DMEM	Meio Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
et al.	E outros
Fig.	Figura
FOUFPel	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
g	Gramas
HC	Hidróxido de cálcio
HCl	Ácido clorídrico
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
kD	Quilodalton
LASER	Do inglês, <i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> , que em português significa, amplificação de luz por emissão estimulada de radiação.
LLLT	Do inglês, <i>Low Level Laser Therapy</i> , que em português significa, terapia com o laser de baixa potência.

M	Molar
mA	Miliampere
MASER	Do inglês, <i>Microave Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> , que em português significa, amplificação de microondas por emissão estimulada de radiação.
MEC	Matriz extracelular
mg/ml	Miligrama por mililitro
min	Minuto
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mm ³	Milímetro cúbico
MMP-2	Metaloproteinase da matriz 2
MMP-9	Metaloproteinase da matriz 9
MMPs	Metaloproteinases
mW	Miliwatts
NaCl	Cloreto de sódio
NaN ₃	Nitrato de sódio
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius
PBS	Tampão Fosfato Salino
pH	Potencial hidrogeniônico
PRO	Abreviação de pró-domínio
pro-MMP	Pró-metaloproteinase latente
Rpm	Rotação por minuto
s	Segundos
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
tab.	Tabela
TEMED	Tetrametiletilenodiamino
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz
TRIS	Tris-hidroxi-metil-aminometano
x	Veze
Zn ²⁺	Íon zinco

Sumário

RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1. Laser.....	19
2.2. Proteases.....	24
2.3. Metaloproteinases.....	25
2.4. Zimografia.....	29
3. PROPOSIÇÃO.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. Contagem celular.....	32
4.1.1. Obtenção das Amostras.....	32
4.1.2. Contagem Celular.....	33
4.1.3. Aplicação do Laser.....	34
4.1.4. Contagem celular dos grupos estudados.....	35
4.1.5. Estatística e Apresentação dos Resultados.....	36
4.2. Zimografia.....	36
4.2.1. Preparo das amostras para zimografia.....	36
4.2.4. Estatística e Apresentação dos Resultados.....	37
4.3. Comitê de Ética em Pesquisa.....	37
5. RESULTADOS.....	38
5.1. Contagem e taxa de proliferação celular.....	38
5.2. Zimografia.....	40
6. DISCUSSÃO.....	46
7. CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS.....	52
ANEXOS.....	58

1. INTRODUÇÃO

A polpa dentária é um tecido de origem mesenquimal, que possui uma camada periférica de odontoblastos, células responsáveis pela produção de dentina, e um tecido conjuntivo imunocompetente abrigando nervos e elementos vasculares (JONTELL et al., 1998). É um tecido conjuntivo frouxo caracterizado pela sua localização particular, quase totalmente enclausurado em tecido mineralizado.

Danos por estímulos mecânicos, químicos, térmicos e/ou microbianos, podem provocar respostas inflamatórias à polpa dentária (TZIAFAS et al., 2000; TZIAFAS, 2004). A inflamação da polpa dentária normalmente envolve complexas reações vasculares, linfáticas e teciduais locais. Durante o tratamento restaurador, a manutenção da atividade funcional da polpa proporciona capacidade de resposta dentinogênica aos estímulos biológicos e patológicos (TZIAFAS et al., 2000; TZIAFAS, 2004). Essa resposta pulpar se dá por meio da produção de dentina secundária, peritubular, reparativa e/ou reacional, por isso a sua manutenção é de extrema importância (TZIAFAS et al., 2000; TZIAFAS, 2004).

Quando há exposição do tecido pulpar, os fibroblastos apresentam potencialidade intrínseca para alongar, polarizar e secretar progressivamente matriz tubular em um padrão similar à pré-dentina, resultando na diferenciação de células e aquisição de fenótipo semelhante a odontoblastos, caracterizando desse modo, o processo de reparo (FEIT et al., 1970; FITZGERALD, 1979; SMITH e LESOT, 2001; TZIAFAS, 2004).

O fibroblasto é um componente celular abundante da polpa dentária humana. Acredita-se que essa célula possua um papel importante no remodelamento da matriz extracelular em condições normais e em condições patológicas (WERB, 1997; BULLARD et al., 1999). Autores têm identificado metaloproteinases (MMPs) nos tecidos dentais, principalmente 2 e 9, tanto em condições normais (GUSMAN et al., 2002; PALOSAARI et al., 2003), quanto em condições patológicas (GUSMAN et al., 2002), e essas enzimas ativas podem degradar a matriz extracelular pulpar, como também, o tecido periapical (O'BOSKEY e PANAGAKOS, 1998; SHIN et al., 2002). A atividade dessas proteases é regulada *in vivo* pela alteração da sua taxa de

síntese e degradação, ativação de pré ou pró-formas e de ligações com inibidores endógenos (FREDERIKS e MOOK, 2004).

As MMPs constituem uma família de mais de 23 endopeptidases zinco-dependentes relacionadas estrutural e funcionalmente (VU e WERB, 2000).. Coletivamente essas enzimas são responsáveis pelo metabolismo, *in vitro* e *in vivo*, dos componentes extracelulares, incluindo fibronectina, laminina, proteoglicanas, assim como, colágeno da membrana basal (SORSA et al., 2004). São também implicadas nos processos de remodelamento do tecido conjuntivo, no desenvolvimento embrionário, gravidez, crescimento, reparo tecidual, entre outros processos fisiológicos e/ou patológicos (KÄHÄRI e SAARIALHO-KERE, 1999; STERNLICHT e WERB, 2001; EGEBLAD e WERB, 2002; VISSE e NAGASE, 2003; CHAMBERS et al., 2002; BODE e MASKOS, 2003).

O laser de baixa potência tem sido amplamente empregado na área da saúde devido a seus efeitos biomoduladores, sendo considerado efetivo na aceleração da cicatrização de tecidos moles e no controle da sintomatologia dolorosa crônica (MESTER et al., 1985; WALSH, 1997; BASFORD, 1995). Na odontologia, o laser de baixa potência vem sendo utilizado como auxiliar terapêutico na hipersensibilidade dentinária, em lesões traumáticas da mucosa, gengivites, periodontites, pericementites, herpes simples, entre outros (NANAMI et al., 1993; BASFORD, 1995; NEIBURGER, 1997). A utilização do laser de baixa potência sobre o tecido pulpar exposto tem sido considerada uma ferramenta auxiliar, que pode apresentar benefícios quando utilizada no tratamento de pulpotomias e em capeamentos pulpares diretos (BASFORD, 1995; WALSH; 1997; MORITZ et al., 1998).

Um grande número de estudos tem demonstrado que o laser de baixa intensidade, quando aplicado em doses e potências apropriadas (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; PEREIRA et al., 2002; MARQUES et al., 2004; POURZARANDIAN et al., 2005), promove o aumento na proliferação de fibroblastos gengivais humanos em cultivo. Porém, quando utilizado em doses ou potências elevadas, ou muito baixas, o laser pode não exercer qualquer efeito sobre o cultivo, ou ainda, retardar a proliferação celular (PEREIRA et al., 2002). O laser de baixa potência tem sido relacionado também a alterações na síntese de proteínas, aumentando ou diminuindo a atividade metabólica das células (BASFORD, 1995).

Para o melhor estabelecimento do efeito da laserterapia no comportamento dos fibroblastos pulpares humanos *in vitro*, assim como, para um melhor

entendimento do papel das MMPs expressas pelos fibroblastos pulpaes, mais pesquisas devem ser realizadas. Pouco é conhecido a respeito da regulação da síntese e secreção das MMPs nas células pulpaes humanas, sobretudo em relação a aplicação do laser de baixa potência. Os fatores ou substâncias que regulam a síntese e secreção de MMPs podem ser importantes na patogênese das doenças pulpaes. Por isso, este estudo verificará o efeito do laser de baixa potência na proliferação celular e na atividade das MMPs 2 e 9 de fibroblastos pulpaes humanos em cultivo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Laser

A partir da teoria de emissão estimulada de radiação descrita por Albert Einstein (baseada na teoria de Max Planck) e publicada em 1917, foi desenvolvido o MASER (*Microave Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), que em português significa, amplificação de microondas por emissão estimulada de radiação. O MASER era um oscilador que operava na banda de ondas milimétricas, que deu origem, posteriormente, ao laser.

Os primeiros trabalhos sobre o MASER foram publicados em 1954 como resultado de investigações simultâneas e independentes de dois grupos de pesquisadores de diferentes países. Townes e seu grupo de pesquisa da Universidade de Columbia em Nova York e Basov e Prokhorov no Instituto Lebedev de Moscou. Esses trabalhos resultaram em um grande avanço para o surgimento do laser, assim como foram responsáveis pela premiação dos três autores citados anteriormente com o prêmio Nobel em 1964. Em 1958, Schawlow e Townes propuseram o desenvolvimento do “MASER ÓPTICO” ou laser, porém o primeiro a desenvolvê-lo foi Theodore H. Maiman em 1960, com o emissor de laser a rubi, que operava em um comprimento de onda de 694,3 nm. A partir de 1960 houve um grande esforço para o estabelecimento de avanços na tecnologia laser, o que permitiu, já em 1961 a utilização do laser em cirurgias oftálmicas com sucesso, e em 1963 o desenvolvimento do laser semicondutor por Alferov e Kroemer.

Laser é uma palavra que atualmente está incorporada ao vocabulário da língua portuguesa e significa, amplificação de luz por emissão estimulada de radiação. O laser é uma onda eletromagnética não ionizante, formada por um feixe de fótons de mesma frequência em coluna, com o comprimento de onda e fase, por isso, diferente da luz de uma lâmpada comum. Sendo uma forma de emissão luminosa, o laser está englobado dentro de um espectro de emissão eletromagnética, porém o laser se diferencia das demais formas de irradiação de ondas eletromagnéticas por características como: direcionalidade ou colimação (permite a obtenção de alta densidade de energia concentrada em pequenos pontos), coerência espacial e temporal (as ondas se propagam com a mesma fase

no espaço e no tempo) e monocromaticidade (emite radiações em um mesmo comprimento de onda) (BAXTER, 1994). A luz ou radiação eletromagnética de um laser representa um fluxo luminoso de alta intensidade de energia, que não existe na natureza e é produzida a partir de algum tipo de fonte de energia, que estimula um grande número de elétrons em repouso, os quais são capazes de produzir fótons de luz e este processo desencadeia uma ação repetida de emissão de energia, gerando uma luz intensa (BRUGNERA et al., 1991).

As radiações ópticas produzidas pelos diversos tipos de lasers têm basicamente as mesmas características, pois são geradas através do mesmo princípio. Entretanto pode-se trabalhar com o laser buscando resultados clínicos bastante específicos, pois, o que determina sua interação com o tecido é a densidade de potência óptica do sistema e seu comprimento de onda (AL-WATBAN e ZHANG, 1997) (Fig. 1). Os lasers utilizados para tratamento médico, odontológico e veterinário emitem radiações situadas na faixa das radiações visíveis, infravermelhas e ultravioletas.

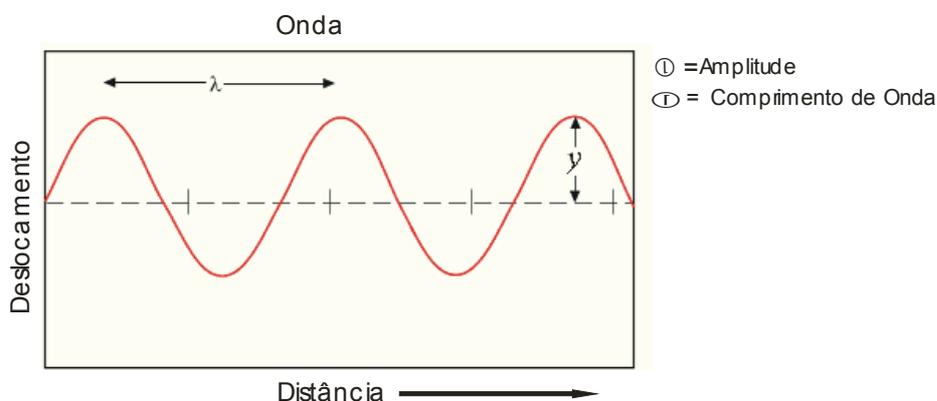


Figura 1 – Demonstração esquemática de comprimento e amplitude de onda.

Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Laser>

As primeiras publicações relacionadas à terapia com o laser de baixa potência datam de mais de 30 anos atrás. Desde então, a aplicação deste tipo de fonte luminosa nas ciências da saúde tem merecido um grande destaque. Em 1966, Endre Mester relatou casos clínicos onde havia utilizado a terapia com laser de baixa potência sobre úlceras crônicas nos membros inferiores com sucesso.

O laser pode operar em regime contínuo ou pulsado. A emissão contínua pode ser monitorada através de sua potência e em alguns equipamentos comerciais

podendo ser interrompida, de forma a alternar sua emissão entre os modos ligado e desligado.

O comprimento de onda direciona os efeitos terapêuticos específicos da laserterapia, pois é ele quem determina, quais biomoléculas específicas que absorverão a radiação, ocasionando uma interação fotobiológica. O primeiro efeito catalogado foi sua ação bioestimuladora, porém, a literatura menciona sua capacidade de também inibir a atividade celular, por isso, o termo mais adequado para a ação do laser de baixa potência parece ser biomodulação. Contudo, para se obter o efeito de bioestimulação é necessário uma densidade de energia de 1 a 4 J/cm² e uma potência de 10 mW a 90 mW (BASFOR et al, 1996).

Os lasers são classificados de acordo com a interação com o tecido alvo em questão. As radiações ópticas produzidas pelos lasers utilizados nas ciências da saúde trabalham buscando resultados clínicos bastante específicos. A célula tem um limiar de sobrevivência de acordo com a sua localização e seu estado fisiológico. Quando trabalhamos com o laser respeitando esse limiar, oferecemos uma baixa intensidade de energia, que será utilizada por ela de maneira a estimular sua membrana, suas mitocôndrias, além de outras estruturas celulares envolvidas em um processo chamado de bioestimulação. Ela trabalhará buscando um estado de normalização da região afetada, a esse processo chama-se laserterapia (KARU, 1999).

Suas principais indicações são os quadros patológicos onde se gostaria de lograr melhor qualidade e maior rapidez no processo reparacional (quadros de pós-operatório, reparação de tecido mole, ósseo e nervoso), quadros de edema instalado (onde se busca uma mediação do processo inflamatório), ou nos quadros de dor (crônica e aguda). O conhecimento dos parâmetros ópticos a partir dos quais será aplicado o laser são importantes para todo o tipo de terapia a laser, pois a porcentagem da incidência e penetração da luz sobre um determinado tecido ou célula com diferentes lasers é um fato decisivo para a seleção da dose de irradiação necessária para se produzir o efeito desejado.

A célula irradiada com laser de baixa densidade de energia tem maior capacidade de produzir ATP (adenosina trifosfato) (KARU et al., 1995). Esses incrementos de ATP favorecem um grande número de reações que interferem no metabolismo celular com a estimulação seletiva das mitocôndrias. Isso provoca um aumento na produção de ATP intracelular, acelerando as mitoses, facilitando o

aumento do consumo de oxigênio e ativação da respiração celular (KARU, 1989) (Fig. 2).

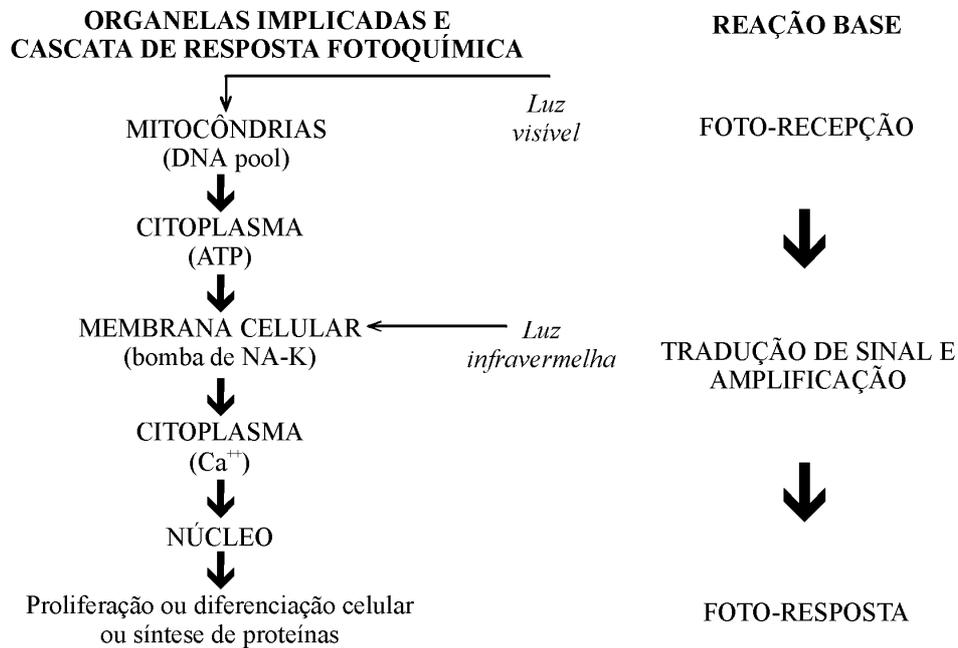


Figura 2 - Mecanismo de ativação fotoquímica desencadeado pela irradiação com laser de baixa potência.

Fonte: Karu, 1989

A terapia com laser de baixa potência, devido a sua luz monocromática, é capaz de alterar o comportamento celular sem provocar aquecimento significativo. Quando a luz laser incide em um tecido biológico, uma parte da luz é refletida, uma parte é espalhada dentro do tecido, uma parte da luz é absorvida e, finalmente, uma parte da luz pode ser transmitida ao longo de todo o tecido (KUTSCH, 1993).

A laserterapia não é baseada em aquecimento, ou seja, a energia dos fótons absorvidos não será transformada em calor, mas sim em efeitos fotoquímicos e fotobiológicos nas células e no tecido. Quando a luz encontra as células, se administrada na dose correta, certas funções celulares serão estimuladas e isto é particularmente evidente se a célula em questão apresenta sua função debilitada (ALMEIDA-LOPES et al., 1998).

Os lasers não-cirúrgicos, que são empregados com finalidades terapêuticas em odontologia são divididos em dois tipos: o laser de hélio-neônio que possui luz vermelha, sendo utilizado como raio terapêutico, ou como raio piloto em lasers

cirúrgicos invisíveis, e o laser diodo (infravermelho) que pode apresentar os modos de operação pulsátil ou contínuo e possui maior penetração nos tecidos biológicos.

Esses dois tipos de lasers produzem efeitos fotoquímicos que estão ligados à ação seletiva dos tecidos. Esse efeito biológico consiste fundamentalmente em energia luminosa depositada no tecido, que se transforma em energia vital, produzindo efeitos primários (diretos), efeitos secundários (indiretos) e efeitos terapêuticos gerais (BRUGNERA et al., 1991).

Alguns autores relatam que o laser de baixa potência possui efeitos antiinflamatórios, pois influencia mudanças metabólicas, energéticas e funcionais, que favorecem o aumento da resistência e vitalidade das células, levando-as à sua normalidade funcional com rapidez (PIMENTA, 1990).

Um dos primeiros efeitos relatados para o laser de baixa potência foi a sua capacidade de acelerar o reparo tecidual. Os estudos em laboratório têm dado suporte para o uso deste tipo de laser no processo de reparo. Muitas investigações encontraram que a irradiação estimula o crescimento capilar e a formação de tecido de granulação, além de alterar a produção de citocinas. Outros estudos têm demonstrado que o laser pode eliminar, inibir ou não ter efeito na função de uma variedade de microorganismos e células. Estudos em animais também têm sido utilizados para nortear os tratamentos (AL-WATBAN e ZHANG, 1997).

Estudos do efeito do laser de baixa intensidade de energia em cultivos celulares primários nos fornecem um modelo simples e informativo sobre os aspectos significativos do uso da terapia laser no sistema *in vitro*, fornecendo uma simulação mais acurada das condições *in vivo*. Vários tipos celulares têm sido usados para estes estudos em sistemas biológicos (WEBB et al, 1998).

Os estudos *in vitro* sobre fibroblastos humanos descrevem um efeito proliferativo e/ou ativador da síntese protéica, dependendo das características e parâmetros do laser utilizado como: comprimento de onda, forma de emissão, densidade de potência e densidade de energia utilizadas. Muitos autores trabalharam e continuam trabalhando *in vitro* com fibroblastos humanos, principal célula responsável no processo de reparo. Estes estudos se correlacionam com outros, que *in vivo* mostraram efeitos, tal como a redução do tempo de cicatrização de feridas dentro do extrato cutâneo e de mucosas (ROCHKIND et al., 1989; AL-WATBAN e ZHANG, 1997)

As pesquisas relacionadas ao uso do laser de baixa intensidade de energia nas áreas da saúde têm ganhado um grande destaque nas últimas décadas, o que também pode ser observado nas pesquisas do laser de baixa intensidade de energia e a odontologia (WALSH, 1997).

Na odontologia os lasers têm sido utilizados predominantemente em aplicações que são denominadas de terapia com laser de baixa intensidade ou bioestimulação, entretanto, ainda existe muita controvérsia sobre alguns dos procedimentos realizados ou indicados para o laser de baixa intensidade de energia.

O uso da LLLT na odontologia não é novo e a terapia com laser de baixa intensidade de energia já é bastante difundida no Japão e na Europa por pelo menos uns 15 anos. Na atualidade, os efeitos terapêuticos do laser são indicados para um grande número de alterações. Aceleração do reparo tecidual, atenuação da dor, modulação do sistema imune, normalização da função hormonal anormal e estimulação da liberação de endorfinas, são alguns dos usos que vêm sendo comprovados através de pesquisas.

O laser de baixa densidade de energia tem sido empregado na Odontologia devido a seus efeitos bioestimulatórios, sendo efetivo na aceleração da cicatrização de tecidos moles e no controle de sintomatologia dolorosa crônica (MESTER et al., 1985). Ele vem sendo utilizado como auxiliar terapêutico na hipersensibilidade dentinária, em lesões traumáticas da mucosa, gengivites, periodontites, pericementites, herpes simples entre outros (NANAMI et al., 1993; NEIBURGER, 1997). Na Odontologia, o tratamento pulpar pré-capeamento com a utilização de laser de baixa potência sobre o tecido pulpar exposto também tem sido investigado (MORITZ et al., 1998a, MORITZ et al., 1998b).

2.2. Proteases

Uma protease é uma enzima que cliva proteínas pela catálise hidrolítica das ligações peptídicas. As proteases têm alta especificidade, sendo assim, atuam em um número limitado de substratos (LOPEZ-OTIN e OVERALL, 2002). Elas podem ser divididas em endopeptidases ou proteinases e exopeptidases. A divisão se dá, de acordo com a posição da ligação peptídica clivada na cadeia. As endopeptidases ou proteinases clivam ligações peptídicas internas nas proteínas, já as exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas nas regiões N ou C terminal (FREDERIKS e MOOK, 2004).

As proteases podem ainda, ser classificadas como aspártico-proteases, cisteína-proteases, metalo-proteases, serina-proteases e treonina-proteases, levando em conta a natureza do centro catalítico ou sítio ativo. Inibidores seletivos podem ser usados para diferenciar essas classes de proteases entre si. A atividade da protease é regulada *in vivo* pela alteração da sua taxa de síntese e degradação, ativação de pré ou pró-formas e de ligações com inibidores endógenos (FREDERIKS e MOOK, 2004).

Distúrbios na expressão das proteases e em especial na sua atividade estão envolvidos em uma grande gama de condições patológicas, como doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, doenças articulares, infecções, câncer, entre outras. Por essa razão, as proteases possuem um potencial terapêutico bastante atrativo, e isso tem sido pesquisado exaustivamente na atualidade (LOPEZ-OTIN e OVERALL, 2002).

2.3. Metaloproteinases

Já se passaram mais de quarenta anos desde que o primeiro membro da família das metaloproteinases de matriz (MMPs) foi descrito. Conhecimentos estruturais, moleculares e bioquímicos têm contribuído para a elucidação de como se dá a atividade das MMPs, e como elas contribuem para vários processos fisiológicos e patológicos. Há pouco mais de quarenta anos atrás, quando Gross e Lapiere (1962) descreveram uma “atividade” que estava presente durante a metamorfose dos girinos (habilidade de degradar rígidas hastes de colágeno dos rabos para tornarem-se sapos), eles não imaginavam que estavam diante do nascimento de um promissor e novo campo na pesquisa biomédica. Essa atividade parecia ser uma degradação de colágeno intersticial por uma enzima que possuía uma habilidade singular para degradar a tripla-hélice de colágeno em pH neutro. Pouco se sabia, e nem mesmo imaginava-se, que essa pequena observação inicial poderia dar origem a um crescente conhecimento sobre um importante conjunto de enzimas (BRINCKERHOFF e MATRISIAN, 2002).

As MMPs constituem uma família de 23 endopeptidases zinco-dependentes relacionadas estrutural e funcionalmente. Coletivamente elas possuem habilidade para degradar, *in vitro* e *in vivo*, todas proteínas estruturais da matriz celular, assim como, colágeno intersticial, proteoglicanas e fibronectina. São também implicadas nos processos de remodelamento do tecido conjuntivo, no desenvolvimento

embrionário, gravidez, crescimento, reparo tecidual, entre outros. (BODE e MASKOS, 2003; VISSE e NAGASE, 2003; EGEBLAD e WERB, 2002; STERNLICHT e WERB, 2001; KÄHÄRI e SAARIALHO-KERE, 1999). Baseado na especificidade do substrato de ação elas podem ser classificadas em seis diferentes grupos: colagenases (MMP-1 e MMP-8), gelatinases ou colagenases do tipo IV (MMP-2 e MMP-9), estromelisinases (MMP-3, MMP-10, MMP-11 e MMP-20), matrilisinases (MMP-7), metaloelastases (MMP-12) e metaloproteases de matriz do tipo membrana (MT-MMPs (MMP-14, MMP-15, MMP-16 e MMP-17) (GUSMAN et al., 2003).

Em condições normais a atividade proteolítica das MMPs é regulada principalmente por seus inibidores protéicos endógenos, os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). A quebra da balança MMP-TIMP pode resultar em patologias como: artrite reumatóide e osteoartrite, aterosclerose, fibrose, enfisema pulmonar, crescimento tumoral e metástase. A inibição terapêutica das MMPs é um campo promissor para o tratamento dessas doenças, e o conhecimento estrutural das MMPs é, dessa forma, um conhecimento necessário para o desenho racional desses inibidores sintéticos (BODE e MASKOS, 2003).

As MMPs são sintetizadas como proteinases latentes com multidomínios, que são transportadas para a superfície celular onde elas continuam igualmente ligadas a membrana, ou são secretadas no espaço extracelular (BODE e MASKOS, 2003).

MMPs são sintetizadas com uma seqüência de sinal N-terminal, que é removido após a sua inserção no retículo endoplasmático, produzindo a pró-enzima latente. Todas as pro-MMPs possuem um N-terminal com aproximadamente 80 aminoácidos residuais no pró-domínio (PRO) e um domínio catalítico adjacente característico (CAT), com exceção das gelatinases A e B com a inserção de um domínio fibronectina tipo II, com aproximadamente 175 aminoácidos residuais.

A atividade catalítica das MMPs depende do Ca^{2+} e do Zn^{2+} . Todas as MMPs contêm Zn^{2+} no sítio catalítico e requerem Ca^{2+} para estabilidade e atividade, e a inibição se dá através dos TIMPs. Uma protease deve possuir características específicas para ser considerada uma MMP, como enumerado abaixo:

- 1 – Um domínio propetideo responsável pela latência das proenzimas, onde um resíduo-chave de cisteína forma uma ligação coordenada com o Zn^{2+} presente no domínio catalítico, daí mascarando o sítio ativo do zimogênio;

- 2 – Um domínio catalítico central essencial para a atividade enzimática que contém sítio de ligação para Ca^{2+} e Zn^{2+} ;

3 – Uma seqüência rica em prolina funcionando provavelmente como “dobradiça” e

4 – Uma seqüência carboxi-terminal adicional com repetições semelhantes a hemopexina.

Várias MMPs são encontradas no complexo dentino-pulpar normal e considera-se que estejam envolvidas em uma série de processos fisiológicos e patológicos, também na formação e manutenção do mesmo (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993). Além disso, essas enzimas têm sido associadas à degradação da matriz extracelular durante a progressão de cárie de dentina (TJÄDERHANE et al., 1998), assim como no reparo e reações de defesa em cáries envolvendo o complexo dentino-pulpar (PALOSSARI et al., 2000). As MMPs presentes no complexo dentino-pulpar maduro incluem: enamelisina (MMP-20) (LLANO et al., 1997), gelatinases (MMP-2, -9) (TJÄDERHANE et al., 1998) e colagenase-2 (MMP-8) (PALOSSARI et al., 2000).

MMP-2 e MMP-9 degradam principalmente colágeno fibrilar desnaturado, elastase e outros vários componentes da matriz extracelular. Essas enzimas podem potencializar a degradação da matriz extracelular por ativar a colagenase-3 (MMP-13) e colagenase neutrofílica. As MMPs são conhecidas por participarem na mineralização da matriz da pré-dentina. A inibição dessas enzimas pode interferir na calcificação da dentina reparativa (SATOYOSHI et al., 2001; FANCHON et al., 2004; BOURD-BOITTIN et al., 2004)

O´Boskey & Panagakos (1998) propuseram que citocinas estimulam a produção de elevados níveis de MMP-2 e MMP-9 em células humanas cultivadas por longo tempo e que essas MMPs podem desempenhar um papel na inflamação pulpar. Vários estudos demonstram a presença de elevados níveis dessas gelatinases (MMP-2 e MMP-9) em lesões pulpares e periapicais (GUSMAN et al., 2002; SHIN et al., 2002). As gelatinases são capazes de degradar colágeno intersticial desnaturado (gelatinas), elastina, fibronectina, entre outros. Além disso, estão envolvidas na renovação normal da matriz extracelular, na invasão tumoral e também, em processos de inflamação crônica. A produção em excesso de MMPs acarreta em uma aceleração na degradação da matriz extracelular associada com processos patológicos, como: artrite reumatóide, câncer e periodontite.

Na matriz extracelular (MEC) a atividade da MMP é controlada por inibidores específicos conhecidos como inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Os TIMPs são pequenas proteínas multifuncionais que regulam a função das MMPs, tanto na sua ativação, quanto na sua habilidade de hidrolisar um substrato particular. Pelo menos quatro membros da família dos inibidores teciduais de MMPs estão bem descritos na literatura. O TIMP-1 é mais efetivo que o TIMP-2 na inibição da MMP-1 e MMP-3. Em muitas células a MMP-9 é secretada em um complexo com o TIMP-1, enquanto, o TIMP-2 é associado com a MMP-2. Evidências experimentais têm sugerido que o TIMP-2 é dez vezes mais efetivo que o TIMP-1 na inibição da atividade da MMP-2. É o equilíbrio entre a produção de MMPs e TIMPs que mantém o ponto crítico de homeostase da MEC.

Estudos em dentes de porcos em desenvolvimento têm possibilitado uma melhor compreensão da função das MMPs no órgão do esmalte e papila dentária (BARTLETT et al., 1998). Evidências clínicas indicam que, dentes com saúde, quando comparados com dentes com pulpíte sintomática têm concentrações aumentadas de neuropeptídeos pró-inflamatórios nos tecidos pulpare, e de MMP-8 nos tecidos pulpare desses dentes (WAHLGREN et al., 2002). Evidências diretas do papel das MMPs na degradação pulpar são escassas. O primeiro relato do envolvimento da MMP-9 em pulpíte é de Gusman et al, 2002, onde foram encontrados altos níveis de MMP-9 em polpas inflamadas e uma correlação positiva com a atividade gelatinolítica, o que demonstra um sugestivo papel como mediador na degradação do tecido pulpar humano inflamado.

MMPs formam uma família de endopeptidases estruturalmente semelhantes mas geneticamente diferentes, expressas em baixo nível em tecidos normais, mas superexpressas durante inflamação (Birkedal-Hansen, 1995).

Odontoblastos e fibroblastos podem expressar MMP-8 (PALOSAARI et al 2000) como também outras MMPs (PANAGAKOS et al 1996, TAMURA et al 1996, LLANO et al 1997, TJÄDERHANE et al 1998), pois as células do complexo dentino-pulpar podem participar da remodelação da matriz e degradação durante os processos inflamatórios na polpa.

A descoberta do papel das MMPs nos processos fisiológicos não tem sido simples. Estudos *in vitro* sugerem que as MMPs podem afetar processos celulares fundamentais como a proliferação celular, sobrevivência, migração e morfogênese, os quais desempenham papéis importantes do desenvolvimento. Porém, muitos

processos que são afetados *in vitro* por alterações das MMPs, não demonstram uma relevante alteração funcional *in vivo*.

Da mesma forma, ainda existe uma série de dúvidas em relação ao papel do laser de baixa potência nos tecidos vivos, assim como, poucos são os relatos na literatura sobre os seus efeitos nas proteínas da matriz extracelular. Não existe também uma literatura abundante avaliando a expressão imunistoquímica e avaliação zimográfica das proteínas da matriz extracelular em células em cultivo. Sendo assim estudos dessa natureza podem ajudar a desvendar o papel do laser de baixa potência, além do comportamento das MMPs 2 e 9 nos fibroblastos pulpares humanos, contribuindo com o surgimento de novas investigações científicas e com a prática clínica odontológica.

2.4. Zimografia

A escolha por um ensaio para medir a atividade enzimática depende dos objetivos qualitativos e quantitativos do estudo. Isto é, principalmente importante no caso das MMPs, já que seus substratos naturais são normalmente proteínas insolúveis, misturas complexas de proteínas com macromoléculas associadas e componentes estruturais da matriz extracelular (LOMBARD et al., 2005). Na atualidade, a zimografia é uma das técnicas mais utilizadas para medir atividade enzimática (LOMBARD et al., 2005).

A zimografia oferece vantagens quando comparada a outros métodos, como o ELISA, já que não são necessários materiais caros, e as proteases com pesos moleculares diferentes mostram atividade para o mesmo substrato podendo ser detectada e quantificada em um único gel. Por exemplo, as MMPs são liberadas das células em uma forma proteolítica inativa (zimogênio), que é aproximadamente 10 kDa maior que a forma ativada. Por isso, o zimogênio ou pró-forma torna-se ativo durante o processo de desnaturação e renaturação. Após a eletroforese no gel a forma ativa e a forma original inativa degradam gelatina, e por essa razão, ambas as formas podem ser detectadas na zimografia. Além disso, as MMPs em solução muitas vezes estão associadas a inibidores teciduais endógenos de metaproteinasas (TIMPs). Durante a eletroforese o inibidor dissocia-se da metaloproteinase e não interfere na detecção da atividade enzimática. Por outro lado, o ELISA pode discriminar entre os complexos MMP/TIMP e MMPs livres, resultando na

determinação de uma potencial fração ativa (RATNIKOV et al., 2002; CATTERALL e CAWSTON, 2003).

O método Western Blot e a imunistoquímica são usados para determinar a quantidade e a localização da protease, respectivamente, mas não oferecem informação a respeito da atividade das proteases, pois as proteases são sintetizadas em uma pré-forma ou pró-forma inativa, que requer um processo proteolítico para ativação (FREDERIKS e MOOK, 2004). Em muitas circunstâncias, os procedimentos imunistoquímicos podem substituir os ensaios enzimáticos, mas eles não podem discriminar entre zimogênios e enzimas ativas (LOMBARD et al., 2005). Idealmente, seria melhor medir a atividade da MMP com suas proteínas nativas específicas como substrato, porém, a taxa de hidrólise é baixa e os métodos clássicos não são sensíveis o bastante. Por essa razão, os métodos atuais usam preferencialmente proteínas sintéticas (LOMBARD et al., 2005).

Um grande número de dados a respeito da atividade das MMPs têm sido obtidos pela zimografia. Essa técnica envolve a eletroforese de enzimas diretamente em um gel de poliacrilamida contendo o substrato co-polimerizado da protease. É um método que tem sido bastante utilizado, principalmente com gelatina como substrato. A eletroforese é geralmente realizada na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) (sodium dodecylsulfate), e as proteases são então renaturadas, ativando a hidrólise do substrato. Depois da coloração, as zonas de digestão podem ser evidenciadas e/ou quantificadas (LOMBARD et al., 2005).

A zimografia pode ser feita também de um modo reverso, desenvolvido para detectar a presença dos TIMPs. Neste caso, a proteinase é incorporada diretamente no conteúdo do gel. Oliver et al., (1997) utilizaram esse método para quantificar a atividade dos TIMPS com gelatina como substrato. Além disso, a zimografia tem sido aplicada para estudos *in situ*. Inicialmente, limitado aos tecidos moles e homogêneos, ele tem sido recentemente usado para mostrar a localização sub-lamelar das gelatinases nas camadas duras de epiderme e uma comparação tem sido feita com uma matriz de tecido conjuntivo mole. Com isso, os autores conseguem avaliar a influência da topografia tecidual na técnica (MUNGALL e POLLITT, 2001).

O maior desafio para o futuro dos ensaios com MMPs é o desenvolvimento de um método sensível, seletivo e rápido. Considerando as metodologias atuais, pode-

se afirmar que nenhuma delas completa integralmente esse requisitos. (LOMBARD et al., 2005).

3. PROPOSIÇÃO

- 1) Verificar o efeito de duas diferentes doses do laser de baixa potência, na proliferação celular de fibroblastos pulpares humanos *in vitro*.

- 2) Verificar se o laser de baixa potência, em duas diferentes doses, apresentará potencial para estimular ou inibir a atividade das MMPs 2 e 9 expressas pelos fibroblastos pulpares humanos *in vitro*, através do ensaio com o método da zimografia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Contagem celular

4.1.1. Obtenção das Amostras

Fibroblastos pulpaes humanos provenientes de uma cultura primária (FPH) congelados em nitrogênio líquido (-170°C) foram obtidos do Laboratório de Biologia Celular da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP (Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo). Para o descongelamento, uma cápsula criogênica contendo FPH foi agitada (\pm 60s) em banho-maria a 37°C.

O conteúdo da cápsula criogênica foi transferido para um tubo de ensaio contendo 3ml de meio de cultivo DMEM (Meio Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco) com soro fetal bovino (SFB) para a inativação da substância crioprotetora dimetilsulfóxido (DMSO). O tubo de ensaio foi centrifugado a 300 giros durante 5 min à temperatura ambiente (Centrifuga Excelsa Baby, modelo 206). O sobrenadante foi removido, e o precipitado ressuspendido em 1ml de DMEM e transferido para uma garrafa de cultivo de 25cm² previamente identificada, onde foram acrescentados 5ml de meio DMEM, contendo 10% de SFB e 1% de solução antibiótica-antimicótica. As células foram mantidas em DMEM, incubadas em incubadora (Forma Scientific) com controle de temperatura e pressão, em ambiente úmido a 37°C, fluxo de 95% de ar e 5% de CO₂. Para a manutenção da viabilidade celular a troca dos meios de cultivo das garrafas foi feita a cada dois ou três dias (FRESHNEY, 1998).

O crescimento celular foi acompanhado diariamente ao microscópio invertido de fase. Quando as células atingiram confluência (íntimo contato), foram lavadas com PBS (tampão fosfato salino) por duas vezes e destacadas do fundo do frasco com tripsina a 0,25% em tampão fosfato salino (PBS) e 1% de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).

Após esse passo, chamado de repicagem, as células foram divididas em frascos maiores com 75 cm². Desta forma, ocorreu uma ampliação quantitativa do número de células, permitindo a realização de todos os experimentos propostos, como uma quantidade de células suficiente. As células utilizadas neste estudo foram fibroblastos pulpaes humanos entre a terceira e a oitava passagens.

4.1.2. Contagem Celular

Antes da realização dos experimentos foi determinado o número de células existentes nos frascos. A finalidade dessa contagem é conhecer o número de células para uma divisão igualitária por grupo. A determinação do número de células foi realizada para o ensaio de contagem celular nos diferentes dias avaliados e para a zimografia. O número de células semeadas foi de 5×10^4 e 1×10^5 , respectivamente.

Para a determinação do número de células (contagem celular), elas foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas do seu substrato utilizando solução de tripsina a 0,25% em PBS e 1% de EDTA. O conteúdo de cada garrafa foi removido, colocado em tubo de ensaio contendo 4ml de DMEM e centrifugado. O sobrenadante dos tubos foi descartado e os precipitados ressuspensos em 1ml de PBS. Dessa suspensão celular 0,1ml foi dispensado em um tubo de ensaio com mais 0,8ml de PBS e 0,1ml de azul de Trypan a 0,4%. Fora do fluxo laminar, uma gota dessa mistura foi colocada na câmara de Neubauer e levada ao microscópio invertido de fase para realização da contagem do número de células. As células coradas em azul representaram células mortas, enquanto as células não coradas, células viáveis. Foram contados os 4 quadrantes das extremidades, como ilustrado na Fig. 3. O cálculo foi obtido pela fórmula onde o número total de células viáveis contadas foi multiplicado por 10^4 (pelo volume contado que é $0,1\text{mm}^3$ ou 10^4ml). Esse valor foi dividido pelo número de quadrados contados (nesse caso 4). A partir dessa fórmula obtivemos a quantidade aproximada de células presentes em cada frasco (FRESHNEY, 1998).

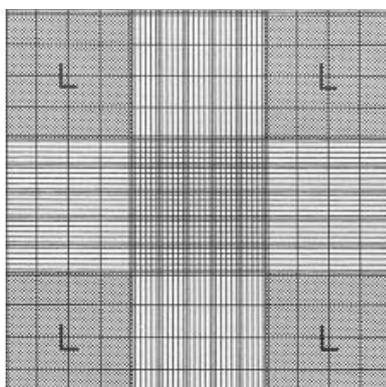


Figura 3 – Desenho esquemático da imagem ao microscópio invertido da câmara de Neubauer, marcadas com a letra L as quatro porções contadas.

Fonte: www.icrc.org

O número total de células presentes no frasco foi obtido através da equação abaixo:

$$\text{Número de células} = \frac{\text{número de células viáveis contadas} \times 10^4}{\text{número de quadrados usados para contagem}}$$

De acordo com a quantidade de células existentes foi adicionado DMEM suficiente a essa suspensão para obter-se a quantidade desejada de células por volume.

4.1.3. Aplicação do Laser

Para aplicação do laser foi utilizado um aparelho Twin-laser (MMOptics®) de aplicação pontual e com comprimento de onda na faixa do infravermelho próximo (780nm). Os diferentes grupos, as doses de energia, tempo de exposição e potência utilizadas são apresentados na tab. 1.

Tabela 1 – Diferentes tratamentos aplicados com o laser de baixa potência, para os diferentes grupos do ensaio de contagem celular.

Grupos	Potencia (mW)	Tempo de exposição (s)	Dose de energia (J/cm ²)
G 1	-	-	-
G 2	10	12	3
G 3	10	24	6

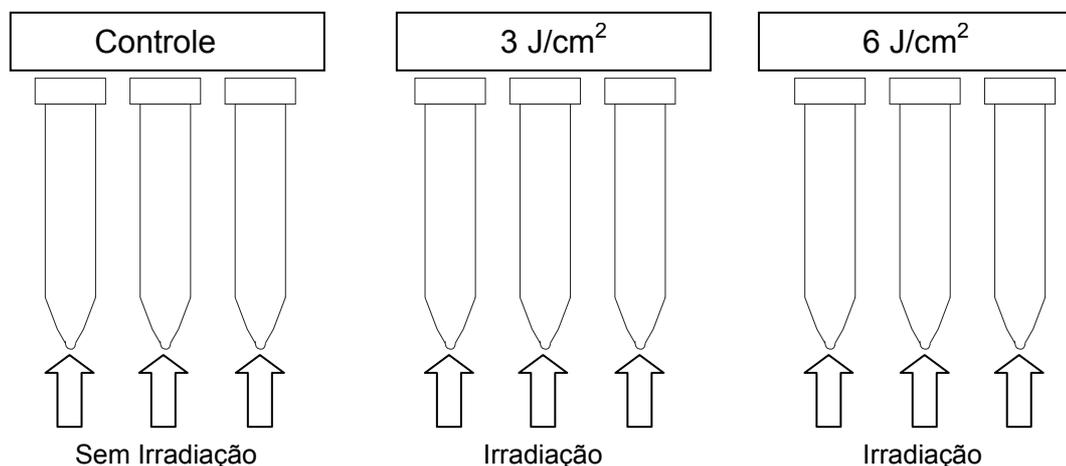
No caso do feixe de laser, a grandeza é a energia luminosa (medida em Joules) e a área é aquela abrangida pelo ângulo sólido formado pelo feixe sobre a superfície de aplicação (medida em cm²), que nesse aparelho de aplicação pontual, é fixa (4mm²). Essas dosagens (J/cm²) serão aplicadas calculando-se o tempo (s) necessário numa determinada potência de 10mW, onde $T = D/P \times A$ (T = tempo, D = dose, P = potência e A = área).

A aplicação de 3J/cm² foi realizada selecionando-se a potência (10mW) e calculando-se o tempo de aplicação. Nesta potência o aparelho é calibrado para mostrar-nos o tempo de 10 em 10s, portanto optou-se por selecionar 5J/cm² em 20s, parando o aparelho após 12s de aplicação, resultando a aplicação final na dosagem requerida. A aplicação de 6J/cm², no entanto, foi realizada selecionando-se, a

mesma potência descrita acima, porém, com duração de 24s, tempo necessário para a obtenção da dose de $6\text{J}/\text{cm}^2$.

Os grupos foram processados em triplicata e para cada tubo foi utilizada uma concentração de 5×10^4 células. As células foram centrifugadas e a irradiação ocorreu nos precipitados celulares (*pellets*), de baixo para cima, em um único ponto preestabelecido do lado de fora do tubo (Fig. 4), e em ambiente com obscuridade parcial para não ocorrer interferência da luz externa (Almeida-Lopes et al., 2001). O grupo controle sofreu a mesma manipulação, mas não foi irradiado.

Figura 4 – Demonstração dos grupos em triplicata e da irradiação do precipitado celular, tanto para a contagem, quanto para zimografia.



4.1.4. Contagem celular dos grupos estudados

Após a irradiação, as células foram ressuspensas em 1ml de DMEM. A suspensão celular foi replaqueada em placas de 6 poços (5×10^4 células por poço). A contagem celular foi realizada após 2, 4 e 6 dias com a utilização de câmara de Neubauer, como descrito na literatura (FRESHNEY, 1998). Diariamente as células eram observadas e o DMEM foi trocado a cada 2 dias.

Considerando que o laser tem sua indicação para situações onde as células estão sob estresse (KARU, 1989; ALMEIDA-LOPES et al., 2001), fez-se avaliação de fibroblastos pulpares humanos em déficit nutricional, 5% de soro fetal bovino, tanto para as culturas tratadas como para a cultura controle, segundo proposto por Almeida-Lopes et al., (2001).

As placas a serem contadas foram selecionadas e foi realizada a tripsinização e centrifugação para obtenção de um precipitado celular. Esse precipitado foi

ressuspendido em 1ml de PBS. Dessa suspensão celular 0,1ml foi dispensado em um tubo de ensaio com mais 0,8ml de PBS e 0,1ml de azul de Trypan a 0,4% (FRESHNEY, 1998). Foi colocada uma gota da suspensão na câmara de Neubauer e as células foram contadas. A quantidade de células presentes no frasco foi calculada pela equação apresentada anteriormente.

4.1.5. Estatística e Apresentação dos Resultados

Após a obtenção dos números absolutos, os dados foram submetidos à análise estatística com o *software* SigmaStat 3.0. O teste utilizado foi de análise de variância (ANOVA) de um critério. Para a comparação entre os grupos G1, G2 e G3 foi utilizado o teste complementar de Tukey.

Para a confecção do gráfico representativo da contagem e da taxa de proliferação celular, foi utilizado o *software* SigmaPlot 8.0

4.2. Zimografia

A zimografia é uma técnica usada para analisar a atividade das metaloproteinases da matriz em amostras biológicas complexas. Envolve a separação de proteínas por eletroforese, sob condição de denaturação (pelo SDS), mas não de redução, através de um gel de poliacrilamida contendo gelatina. As proteínas são renaturadas pela remoção do SDS, por um detergente não iônico como o Triton X-100, sendo o gel incubado em um tampão apropriado para cada proteinase a ser estudada. O gel é corado com *Coomassie Blue* e as atividades proteolíticas são observadas e detectadas como bandas claras em um fundo azul de gelatina não degradada (LOMBARD et al., 2005).

4.2.1. Preparo das amostras para zimografia

As células foram processadas da mesma forma relatada para os grupos do ensaio de proliferação celular (Fig. 4 e tab. 2). Porém, foram plaqueadas 1×10^5 células por poço para a zimografia. Após a irradiação, as células foram incubadas em estufa de CO₂ por 24h com DMEM e 10% de soro fetal bovino, logo após, o meio de incubação foi trocado por DMEM sem soro. As células ficaram com DMEM sem soro por mais 24h. Após essa fase inicial, o meio de cultivo condicionado pelas células foi separado, adicionado de 1% de inibidor de protease e congelado em

freezer – 80°C. O meio de cultivo condicionado foi congelado até a realização da zimografia, para conservação das metaloproteinases 2 e 9.

Tabela 2 – Demonstração dos diferentes tratamentos aplicados com o laser de baixa potência, para os diferentes grupos no ensaio de zimografia.

Grupos	Potencia (mW)	Tempo de exposição (s)	Dose de energia (J/cm ²)
Z 1	-	-	-
Z 2	10	12	3
Z 3	10	24	6

4.2.2. Preparo dos Reagentes para Zimografia (ANEXO A)

4.2.3. Preparo dos Géis para Zimografia (ANEXO B)

4.2.4. Estatística e Apresentação dos Resultados

Para a análise densitométrica da área e dos *pixels* referentes às bandas estudadas foi utilizado o programa ImageJ 1.28. (NIH – USA).

Os dados obtidos para cada metaloproteinase estudada (MMP-2 e MMP-9) foram submetidos à análise estatística com o *software* SigmaStat 3.0. O teste utilizado foi de análise de variância (ANOVA) de um critério. Para a comparação entre os grupos (sem irradiação, 3J/cm² e 6J/cm²) foi utilizado o teste complementar de Tukey.

A confecção dos gráficos de barras foi realizada no programa SigmaPlot 8.0.

Foi realizada ainda, a análise estatística para a diferença de atividade da MMP-2 e MMP-9. Para isso, foi utilizado o teste t de Student (SigmaStat 3.0).

4.3. Comitê de Ética em Pesquisa

Este trabalho teve seu projeto aprovado pelo CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (parecer nº 41/05 – ANEXO C).

5. RESULTADOS

5.1. Contagem e taxa de proliferação celular

Os dados coletados através da contagem celular em câmara de Neubauer (conforme aplicação da fórmula anteriormente demonstrada) foram tabulados em um banco de dados elaborado no programa Excel (versão 7.0) e a análise estatística realizada no programa SigmaStat (versão 3.1).

Para a variável contagem celular foram calculados a média e o desvio-padrão, nos diferentes dias (2, 4 e 6 dias) e grupos avaliados (G1=controle, G2=3J/cm² e G3=6J/cm²) (tab. 3). Os dados foram obtidos em triplicata e o experimento repetido três vezes. A normalidade da distribuição dos dados foi analisada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Como a distribuição dos dados foi normal, utilizou-se um teste paramétrico de análise de variância de um critério (ANOVA). O nível de significância (α) utilizado nos testes estatísticos foi de 5%. Para a verificação de diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado o teste complementar de Tukey.

Tabela 3 – Média e desvio padrão da proliferação celular de acordo com o grupo (contagem/dia e irradiação)

Dias	Grupos	Média**	Desvio padrão	Valor de P*
Dois dias	G1 (controle)	8,3 A	1,36	P<0,050
	G2 (3J/cm ²)	9,3 A	2,11	
	G3 (6J/cm ²)	12,0 B	1,94	
Quatro dias	G1 (controle)	14,2 C	1,92	P<0,050
	G2 (3J/cm ²)	16,7 D	1,33	
	G3 (6J/cm ²)	21,1 E	2,35	
Seis dias	G1 (controle)	24,5 F	2,95	P<0,050
	G2 (3J/cm ²)	27,1 FG	1,05	
	G3 (6J/cm ²)	29,7 G	2,31	

* valor de P para o teste de Tukey

** valores referentes ao número de células x 10⁴

** letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa

Quando os dados foram aplicados no programa SigmaPlot (8.0) foi gerado um gráfico de contagem celular nos diferentes dias. Observa-se que, a partir do *baseline* (início do experimento), quando 5×10^4 células foram semeadas em placas de 100mm de diâmetro, houve um aumento no número celular em todos os grupos avaliados, e em todos os dias avaliados (Fig. 5). A maior contagem foi obtida quando aplicadas as doses $6\text{J}/\text{cm}^2$, $3\text{J}/\text{cm}^2$ e sem irradiação (grupo controle), respectivamente, em todos os dias avaliados (Fig. 5)

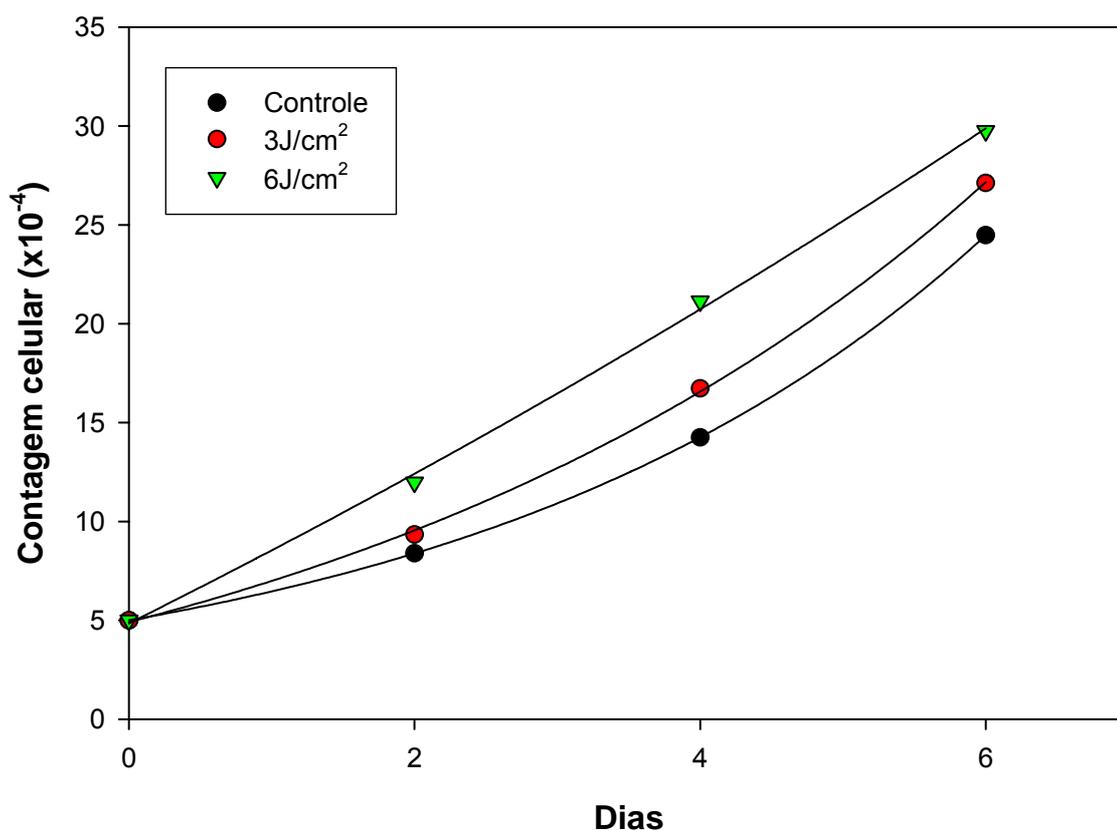


Figura 5 – Contagem celular obtida nos diferentes dias

O gráfico obtido após a aplicação do programa SigmaPlot (8.0) para as taxas de proliferação celular demonstrou que no segundo dia de avaliação, a taxa de proliferação produzida pela dose $6\text{J}/\text{cm}^2$ foi superior (o dobro), à dose $3\text{J}/\text{cm}^2$ e ao controle (Fig. 6). Na avaliação do quarto dia, observar-se que as doses $6\text{J}/\text{cm}^2$ e $3\text{J}/\text{cm}^2$ produziram taxas de proliferação muito parecidas, no entanto maiores que o grupo controle (Fig. 6). A análise do gráfico nos momentos após o sexto dia demonstra uma maior taxa de proliferação para os grupos controle e $3\text{J}/\text{cm}^2$, enquanto o grupo irradiado com $6\text{J}/\text{cm}^2$ tem uma taxa de proliferação menor (Fig. 6).

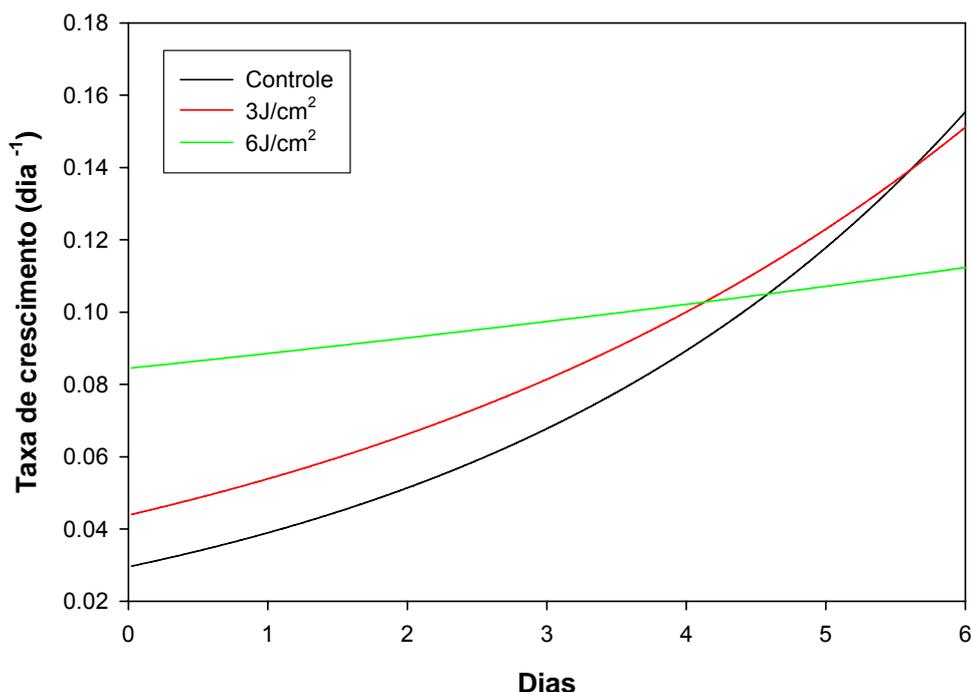


Figura 6 – Taxa de proliferação celular nos diferentes dias

5.2. Zimografia

A análise estatística dos dados obtidos através da utilização do programa ImageJ para a MMP-2 e MMP-9 não encontrou diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos (Z 1 = sem irradiação, Z 2 = 3J/cm² e Z 3 = 6 J/cm²) (tab. 4 e tab.5)

Tabela 4 – Média e desvio padrão da atividade da MMP-2 de acordo com o grupo

Doses	Grupos	Média*	Desvio padrão	Valor de P
Sem exposição	Z 1 (MMP-2)	10907,66 ♦	2381,560	0,030
3J/cm ²	Z 2 (MMP-2)	14145,33 ♦	3570,544	
6J/cm ²	Z 3 (MMP-2)	13636,33 ♦	121,001	

Análise de variância e teste Tukey

* Símbolos iguais representam que não houve diferença estatística entre os grupos

Tabela 5 – Média e desvio padrão da atividade da MMP-9 de acordo com o grupo

Doses	Grupos	Média*	Desvio padrão	Valor de P*
Sem exposição	Z 1 (MMP-9)	4101,33 ●	723,71	0,099
3J/cm ²	Z 2 (MMP-9)	2733,33 ●	1988,37	
6J/cm ²	Z 3 (MMP-9)	7013,66 ●	4058,11	

Análise de variância e teste Tukey

* Símbolos iguais representam que não houve diferença estatística entre os grupos

Na análise densitométrica, apesar do teste estatístico não apresentar diferença entre os grupos (sem irradiação, 3J/cm² e 6 J/cm²) (tab. 4 e tab. 5) os dados gerados pelo programa ImageJ demonstram que numericamente existe uma tendência de maior atividade da MMP-2 nos grupos de células irradiadas, quando comparados ao controle (Fig. 7C). Observa-se ainda, que a dose 3J/cm² produziu uma maior atividade da MMP-2 quando comparada com o grupo de 6 J/cm² e com o grupo controle (Fig. 7A e Fig. 7B). Na análise das bandas produzidas pela MMP-9 houve maior atividade no grupo irradiado com 6 J/cm², seguido do grupo controle e do grupo de 3J/cm², diferindo dos achados da MMP-2 (Fig. 8A e Fig. 8C).

Houve diferença estatisticamente significativa quando comparada a atividade da MMP-2 com a atividade da MMP-9, demonstrando uma maior atividade da MMP-2 (tab. 6), acompanhando a tendência visual e numérica, obtidas através da análise densitométrica (Fig. 7A e Fig. 8A).

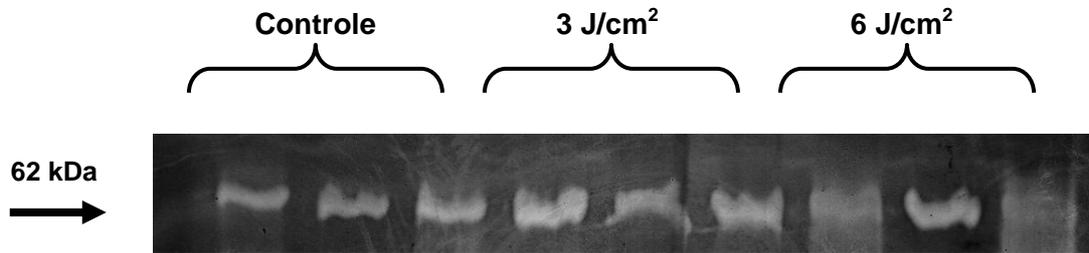
Tabela 6 – Média e desvio padrão da atividade da MMP-2 e MMP-9

Grupos	Média*	Desvio padrão	Valor de P*
MMP-2	12896,444 ▲	2623,397	P <0,001
MMP-9	4616,111 ■	2975,473	

* Símbolos diferentes representam diferença estatística significativa

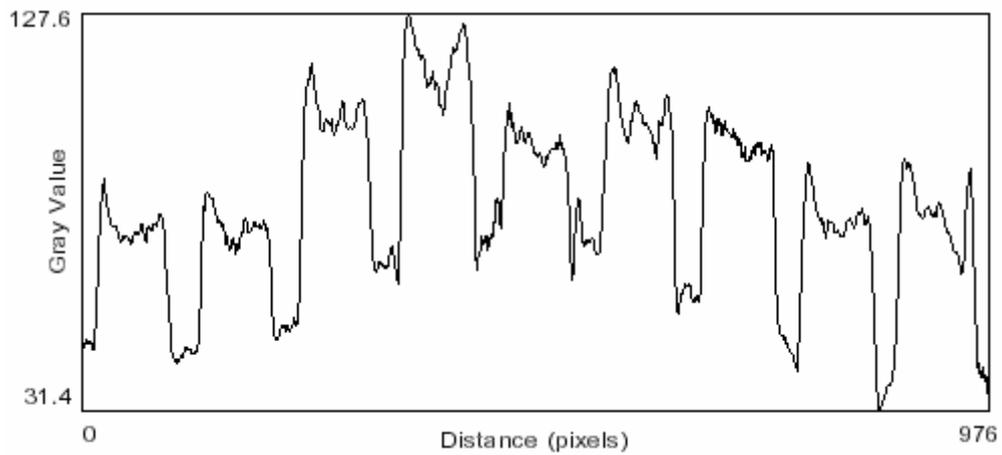
FIGURAS 7A, 7B E 7C

Metaloproteinase 2 (MMP-2)



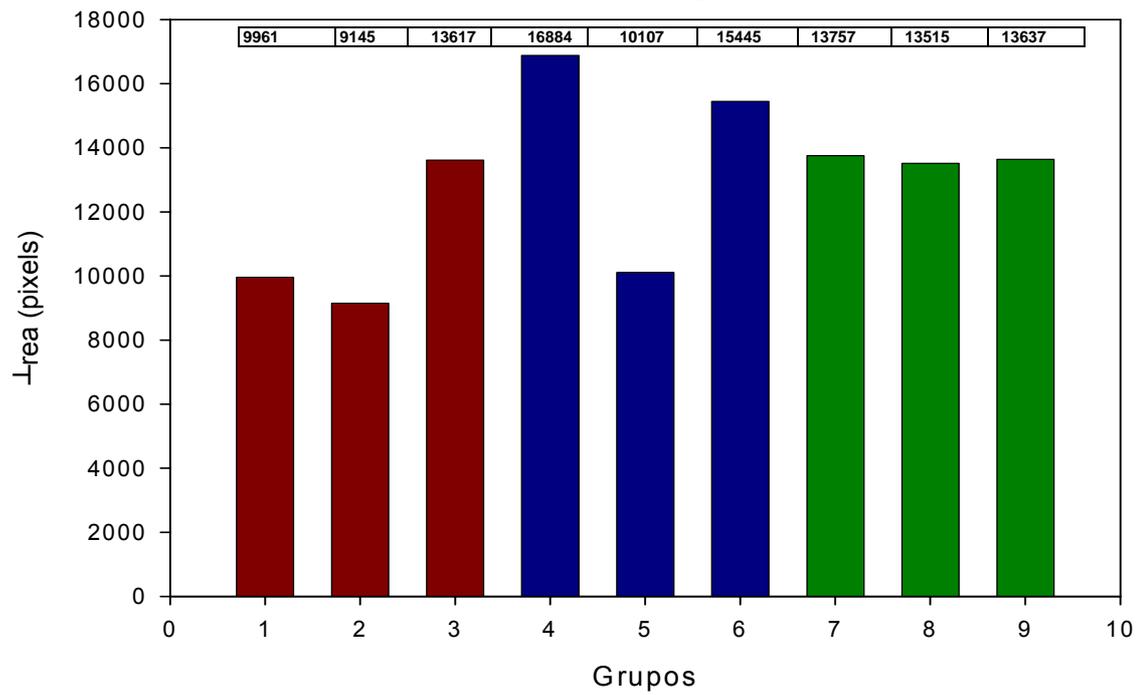
A

Análise densitométrica das bandas (ImageJ 1.28 – NIH/USA)



B

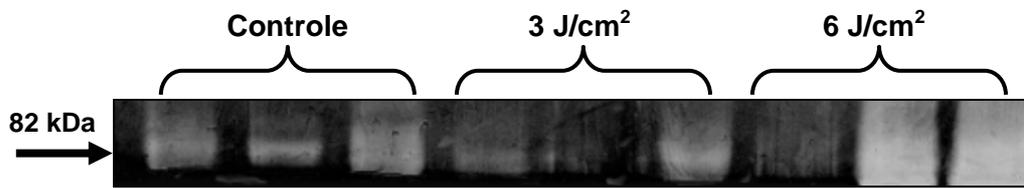
Gráfico Representativo (SigmaPlot 8.0)



C

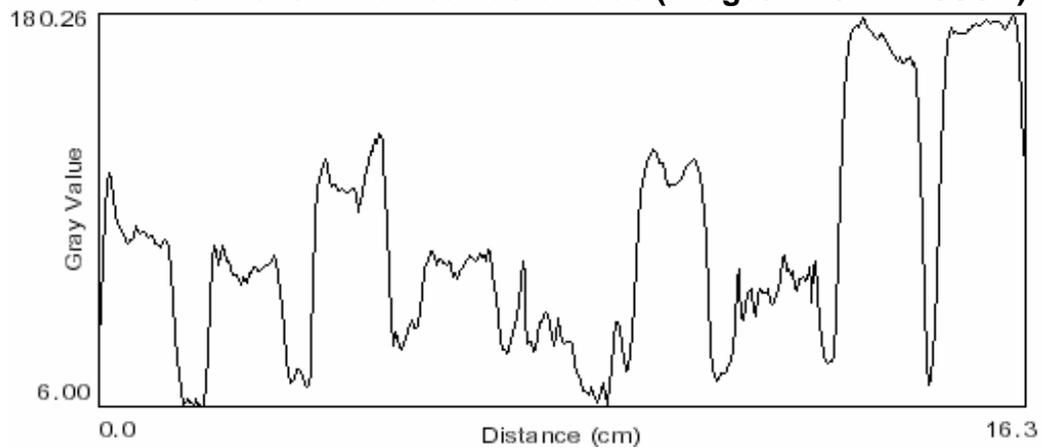
FIGURAS 8A, 8B E 8C

Metaloproteinase 9 (MMP-9)



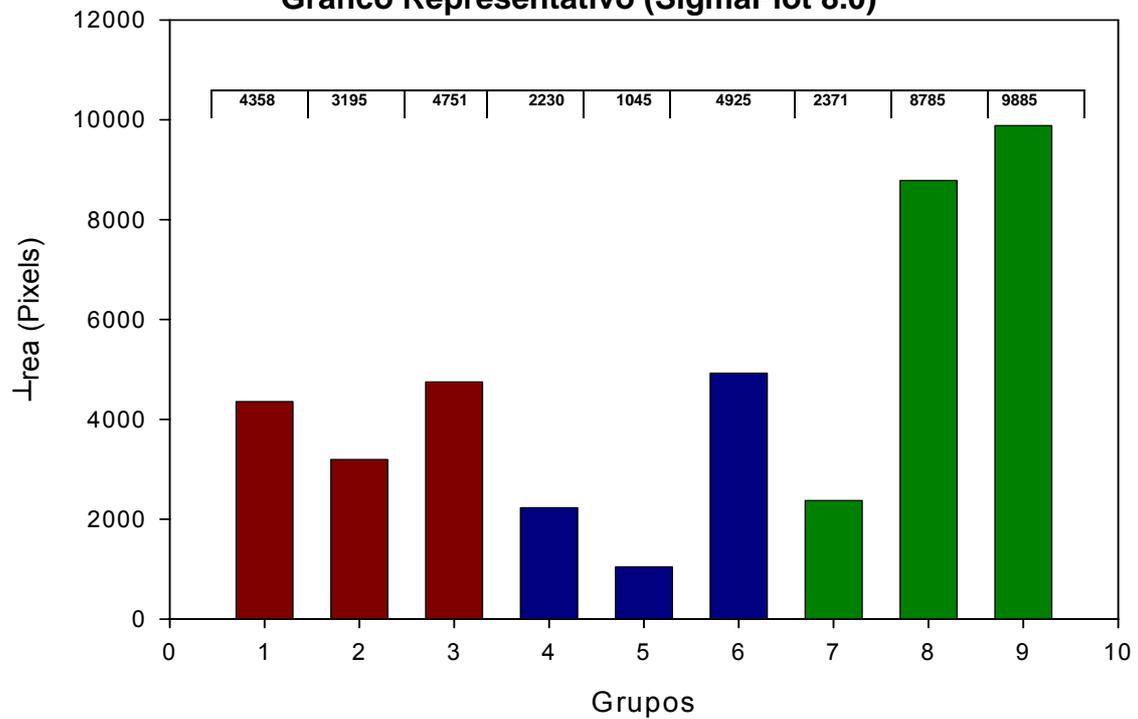
A

Análise densitométrica das bandas (ImageJ 1.28 – NIH/USA)



B

Gráfico Representativo (SigmaPlot 8.0)



C

6. DISCUSSÃO

Um considerável número de estudos tem avaliado o efeito dos lasers de baixa potência em cultivos celulares, principalmente observando o efeito de diferentes doses na taxa de proliferação celular (POURZARANDIAN et al., 2005; PEREIRA et al., 2002; ALMEIDA-LOPES et al., 2001; KREISLER et al., 2001).

No entanto, poucos estudos se dedicam a observar o efeito dos lasers de baixa potência em fibroblastos pulpare humanos. Os fibroblastos são as células mais abundantes do complexo dentino-pulpar (JONTELL et al., 1998). A maior parte dos trabalhos utiliza como modelo de estudo fibroblastos gengivais originários de linhagens primárias ou linhagens comerciais (POURZARANDIAN et al., 2005; PEREIRA et al., 2002; ALMEIDA-LOPES et al., 2001; KREISLER et al., 2001). É importante a utilização de linhagens celulares primárias humanas de polpa, já que o laser de baixa potência tem sido indicado como auxiliar no tratamento de pulpotomias e capeamentos pulpare diretos (WALSH, 1994) e células provenientes de cultivos primários revelam uma maior semelhança com as células *in vivo* (Freshney, 2000).

Em nosso trabalho, na tentativa de simular uma situação de estresse celular, as células foram cultivadas em déficit nutricional (5% de SFB). Essa condição é um modelo ideal para analisar o efeito da laserterapia em cultivos celulares (MARQUES et al., 2004; ALMEIDA-LOPES et al., 2001). De fato, a concentração de 5% de SFB não provocou a morte dos fibroblastos, permitindo o cultivo dessas células em déficit nutricional. Estudos relatam que o melhor crescimento celular ocorre com uma concentração de no mínimo 10% de soro fetal bovino (ALMEIDA-LOPES et al., 2001). Porém, até mesmo uma concentração de soro de 2,5% foi capaz de diminuir o crescimento celular sem matar as células cultivadas (PEREIRA et al., 2002).

Muitos estudos têm relatado que doses de $3\text{J}/\text{cm}^2$, ou próximas a essa densidade de energia, provocam uma maior contagem de células em cultivo, quando comparadas a grupos sem irradiação ou com doses maiores ($10 - 16\text{J}/\text{cm}^2$) (PEREIRA et al., 2002; HAWKINS e ABRAHAMSE, 2005; HAWKINS e ABRAHAMSE, 2006). Nosso estudo encontrou que $6\text{J}/\text{cm}^2$ produziu uma maior contagem celular e a diferença foi estatisticamente significativa (tab. 3 e Fig. 5). O

estudo de Hawkins e Abrahamse (2006), observou que a dose de $5\text{J}/\text{cm}^2$ produziu maior atividade mitocondrial e maior contagem celular foi de $5\text{J}/\text{cm}^2$, comparada com 0.5 e $2.5\text{J}/\text{cm}^2$. Este estudo sugere que o reparo tecidual com o auxílio do laser se dá de forma dose-dependente.

Altas doses (10 e $16\text{J}/\text{cm}^2$) têm sido associadas à diminuição da viabilidade celular, dano a membrana e DNA, como também à diminuição da proliferação (HAWKINS e ABRAHAMSE, 2006).

Por outro lado, alguns estudos demonstram que doses de $5\text{J}/\text{cm}^2$ ou acima desse valor, não apresentam efeito estimulador (PEREIRA et al., 2002). O que deixa claro que não existe consenso entre pesquisadores com relação aos efeitos dos lasers de baixa potência no aumento da contagem de células *in vitro*.

Essa variabilidade de resultados entre as pesquisas pode ser fruto das diferentes metodologias para o cultivo celular, principalmente no que diz respeito à quantidade de células plaqueadas inicialmente, assim como o tamanho das placas de cultivo utilizadas e o tipo celular, tal como, células provenientes de cultivo primário e linhagens comerciais. (FRESHNEY, 1998)

Na análise da Fig. 6 taxas de proliferação diferentes são observadas para todos os grupos avaliados. Nesse gráfico existe uma clara identificação de que a dose de $6\text{J}/\text{cm}^2$ produz uma taxa de proliferação bastante superior à dos outros dois grupos, mas que ela tende a equiparar-se com as outras doses no quarto dia. Após o quarto dia, a taxa de proliferação do grupo irradiado com $6\text{J}/\text{cm}^2$ torna-se menor que a dos outros grupos. Além disso, a maior taxa de proliferação no sexto dia passa a ser do grupo controle (não irradiado).

A proliferação celular resultante do estímulo pelo laser de baixa potência pode estar associada com a produção autócrina de fatores de crescimento, tal como o FGFb (KREISLER 2003). Estudos adicionam a estimulação de fotoreceptores da cadeia respiratória mitocondrial, aumento nos níveis de ATP e estabilização da membrana celular como promotores do aumento da proliferação celular (CONLAN, 1996).

Em nosso estudo não nos propomos a avaliar estas interações, mas diante do dado encontrado sobre a proliferação celular, podemos sugerir que, provavelmente haja uma interação dos fatores acima citados.

A Fig. 6 demonstra também, que os grupos controle e $3\text{J}/\text{cm}^2$, possuem uma taxa de proliferação inicial mais baixa que a do grupo irradiado com a dose $6\text{J}/\text{cm}^2$,

porém evoluem para uma taxa de proliferação exponencial, enquanto o grupo de $6\text{J}/\text{cm}^2$ mantém uma taxa constante. A dose de $6\text{J}/\text{cm}^2$ demonstrou uma ótima taxa de proliferação inicial, porém inibiu a proliferação celular nos dias decorrentes.

O exposto acima demonstra que o laser de baixa potência utilizado em nosso estudo, com a dose de $6\text{J}/\text{cm}^2$ promoveu a biomodulação da proliferação celular. Este efeito é desejado nos processos de reparo pulpar, após a realização de uma pulpotomia ou capeamento pulpar direto.

Com essa afirmativa não queremos dizer que essa relação de experimento, como cultivo celular, possa transpor-se totalmente para os experimentos *in vivo*. Entretanto, estes achados somam-se ao entendimento do reparo pulpar, com o laser de baixa potência atuando como auxiliar neste processo.

Não foram observados estudos avaliando realmente a taxa de proliferação celular. Muitos trabalhos fazem a contagem celular, obtêm a média da contagem e geram um gráfico que não pode ser considerado como uma curva de crescimento ou de proliferação. Kreisler et al (2001) avaliam um dado antagônico à taxa de proliferação, a taxa de sobrevivência, observando o número de células viáveis após irradiações com laser em altas doses e tempos prolongados. Uma taxa de proliferação celular deve ser resultado da razão entre o número de células após os tratamentos em seus diferentes grupos e tempo, dividido pelo número de células que foi semeado inicialmente (Fig. 6).

A taxa de proliferação permite uma análise da dinâmica da proliferação das células no período de tempo avaliado, o que pode ser observado na diferença entre a Fig.5 e Fig.6.

Estudos têm identificado uma série de alterações metabólicas em células irradiadas com laser de baixa potência. Aumento na síntese de colágeno, proteínas (BASFOR, 1995), na síntese de RNA e ATP (HAWKINS e ABRAHAMSE, 2006), são algumas das alterações relatadas pelos estudos. Neste sentido, optou-se por estudar a expressão das MMPs sob o efeito do laser de baixa potência em duas doses em fibroblastos pulpares humanos *in vitro*.

A escolha da metodologia utilizando o ensaio de zimografia justifica-se pela possibilidade de identificação da expressão e da atividade enzimática através desse método. Em adição, possibilita uma análise semiquantitativa das bandas produzidas.

Todos os grupos de fibroblastos pulpares avaliados em nosso estudo expressaram a MMP-2 e a MMP-9. As MMPs foram previamente identificadas em processos de desenvolvimento do órgão dental (SAHLBERG et al., 1999; GOLDBERG et al., 2003), assim como são encontradas principalmente, a MMP-2 e a MMP-9 na polpa dental de dentes sadios e inflamados (GUSMAN et al., 2002). Isto demonstra que as MMPs são proteínas constitutivas e estão sempre presentes neste tecido ricamente constituído por colágeno, na sua forma fisiológica ou patológica, uma vez que estão relacionadas à renovação das moléculas da matriz extracelular durante a cicatrização (SALO et al., 1994).

A expressão da MMP-2 não foi estimulada pelas duas doses avaliadas, quando considerada a análise estatística (tab. 4), entretanto, a análise das bandas mostra uma tendência de aumento de expressão e atividade nas células irradiadas (Fig. 7A, 7B e 7C). A dose de $3\text{J}/\text{cm}^2$ produziu maior expressão e atividade do que a dose de $6\text{J}/\text{cm}^2$ e grupo controle (Fig. 7A e 7C). Esse resultado é coerente com os encontrados na contagem celular, os quais mostraram que a dose $6\text{J}/\text{cm}^2$ produziu o maior número de células entre os grupos, seguida pelo grupo de $3\text{J}/\text{cm}^2$ e grupo controle. O que concorda com a afirmação de Chang et al., (2001) que mostra o acompanhamento do aumento da contagem celular pelo aumento produção das MMPs.

Não houve diferença estatisticamente significativa (tab. 5) para a MMP-9. O resultado encontrado referente à tendência mostrada pela análise das bandas demonstra que, apesar da sua menor identificação em tecidos normais e não inflamados (PALOSAARI et al., 2003), o laser de baixa potência também influenciou na sua atividade e expressão (Fig. 8A, 8B e 8C). Seguindo um padrão diferente do apresentado pela MMP-2, a dose de $3\text{J}/\text{cm}^2$ produziu uma menor expressão e atividade enzimática, do que o grupo de $6\text{J}/\text{cm}^2$ e o grupo controle, respectivamente. Este achado demonstra a biomodulação da expressão da MMP-9 pela dose de $3\text{J}/\text{cm}^2$, sendo um efeito desejado ao início do processo de reparo, uma vez que a MMP-9 está em maior concentração na área a ser remodelada pela presença do infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico (OVERALL et al., 1991).

A total inibição da MMP-9 não seria desejada, pois o reparo pulpar necessita da importante atividade desta enzima no processo de apoptose, revascularização e ossificação (NAGASE 1999). Santos et al., (2004), demonstram que o zinco proveniente do cimento de óxido de zinco e eugenol inibe efetivamente as

gelatinases. Porém, várias evidências indicam que a MMP-2 e a MMP-9 possuem um papel crucial na formação e remodelamento da matriz extracelular durante o processo de reparo (SALO et al., 1994).

A expressão da MMP-2 foi estatisticamente maior que a da MMP-9. Isso concorda com a literatura (GUSMAN et al., 2002), que identifica em tecidos pulparem saudáveis uma maior expressão da MMP-2 (PALOSAARI et al., 2003). Quando o tecido pulpar é acometido por processos inflamatórios, a expressão da MMP-9 é maior que a da MMP-2 (SHIN et al., 2002).

As interações moleculares decorrentes da irradiação de fibroblastos pulparem pelo laser empregado não são exploradas na literatura atual. Investigações utilizando fármacos e cultivo destas células demonstram relação com a expressão das MMPs (CHANG et al., 2001).

Considerando as limitações presentes neste estudo e apesar de não ser objetivo da pesquisa, podemos sugerir que a dose de $3\text{J}/\text{cm}^2$, produziu resultados *in vitro*, que simulam aspectos desejáveis ao processo de reparo pulpar *in vivo*.

Esta afirmação é baseada em nossos resultados, visto que a dosagem de irradiação de $3\text{J}/\text{cm}^2$ produziu aumento de proliferação celular, necessária para a aceleração do processo de reparo e biomodulação da MMP-2 e da MMP-9.

O resultado obtido do laser de baixa potência na biomodulação, principalmente no que tange à expressão das MMPs, foi satisfatório, pois em um processo de reparo não é desejável a inibição total destas enzimas. A atividade enzimática das MMPs é importante para a formação e remodelação das moléculas do tecido conjuntivo, tais como os colágenos, fibronectina, além de migração celular (SALO et al., 1994).

Como as MMPs são conhecidas por participar na mineralização e na formação adequada de tecidos dentários, como a mineralização da matriz da pré-dentina (FUKAE et al., 1994). A inibição destas enzimas poderia interferir com a calcificação da dentina reparativa .

Dessa forma, o reparo do complexo dentino-pulpar através da utilização de auxiliares biomoduladores, os quais seguem o equilíbrio fisiológico, deverá contribuir significativamente com o sucesso terapêutico pulpar. Neste estudo o laser comportou-se de maneira desejável, e de forma dose-dependente.

7. CONCLUSÕES

Baseados nos resultados do ensaio de contagem celular nos diferentes dias e na zimografia, concluímos que:

1) As duas doses de irradiação do laser de baixa potência (3 J/cm^2 e 6 J/cm^2) produziram aumento na proliferação celular em fibroblastos pulpares humanos *in vitro*.

2) O laser de baixa potência, nas doses 3 J/cm^2 e 6 J/cm^2 , apresentou efeito biomodulador da atividade das MMP-2 e MMP-9, quando comparado ao grupo controle (sem irradiação), em fibroblastos pulpares humanos *in vitro*.

Referências

ALMEIDA-LOPES, L.; RIGAU, J.; ZANGARO, R. A.; GUIDUGLI-NETO, J.; JAEGER, M. M. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers Surg Med**, v.29, n.2, p.179-84, 2001.

ALMEIDA-LOPES, L. **Aplicações clínicas do laser-não-cirúrgico**. In: Brugnera Jr A; Pinheiro ALB. *Laseres na odontologia moderna*. São Paulo: Pancast, 1998. p. 99-120.

AL-WATBAN, F. A.; ZHANG, X. Y. Comparison of wound healing process using Argon and Krypton lasers. **J Clin Laser Med Surg**, v.15, n.5, p.209-15, 1997.

BASFORD, J. R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. **Lasers Surg Med**, v.16, n.4, p.331-42, 1995.

BAXTER, G. D. **Therapeutic lasers-theory and practice**. Singapore: Churchill livingstone, 1994. p.1-21.

BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W. G. I.; BODDEN, M. K.; WINDSOR, L. J.; BIRKEDAL-HANSEN, B.; DECARLO, A.; ENGLER, J. A. Matrix metalloproteinases: a review. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.4, p.197-250, 1993.

BODE, W.; MASKOS, K. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. **Biol Chem**, v. 384, n.6, p.863-72, 2003.

BOURD-BOITTIN, K.; SEPTIER, D.; HALL, R.; GOLDBERG, M.; MENASHI, S. Immunolocalization of enamelysin (matrix metalloproteinase-20) in the forming rat incisor. **J Histochem Cytochem**, v.52, n.4, p.437-45, 2004.

BRINCKERHOFF, C. E.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.3, n.3, p.207-14, 2002.

BRUGNERA, JR. A.; VILLA, R. G.; GENOVESE, J. **Laser na Odontologia**. São Paulo: Pancast, 1991.

BULLARD, K. M.; MUDGETT, J.; SCHEUENSTUHL, H.; HUNT, T. K.; BANDA, M. J. Stromelysin-1-deficient fibroblasts display impaired contraction in vitro. **J Surg Res**, v.1, n.84, p.31-4, 1999.

CATTERALL, J. B.; CAWSTON, T. E. Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) and MMP inhibitors: bioassays and immunoassays applicable to cell culture medium, serum, and synovial fluid. **Methods Mol Biol**, v.225, p.353-64, 2003.

CHANG, Y. C.; YANG, S. F.; HSIEH, Y. S. Regulation of matrix metalloproteinase-2 production by cytokines and pharmacological agents in human pulp cell cultures. **J Endod**, v.27, n.11, p.679-82, 2001.

CHANG, Y. C.; YANG, S. F.; LAI, C. C.; LIU, J. Y.; HSIEH, Y. S. Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. **J Periodontal Res**, v.37, n.3, p.196-203, 2002.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, v.2, n.3, p.161-74, 2002.

FANCHON, S.; BOURD, K.; SEPTIER, D.; EVERTS, V.; BEERTSEN, W.; MENASHI, S.; GOLDBERG, M. Involvement of matrix metalloproteinases in the onset of dentin mineralization. **Eur J Oral Sci**, v.112, n.2, p.171-6, 2004.

FEIT, J.; METELOVA, M.; SINDELKA, Z. Incorporation of 3H thymidine into damaged pulp of rat incisors. **J Dent Res**, v.49, n.4, p.783-6.

FITZGERALD, M. Cellular mechanics of dentinal bridge repair using 3H-thymidine. **J Dent Res**, v.58, Spec Issue D, p.2198-206, 1979.

FREDERIKS, W. M.; MOOK, O. R. Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on in situ zymography of gelatinases: review and protocols. **J Histochem Cytochem**, v.52, n.6, p.711-22, 2004.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 4. ed. New York: Wiley-Liss, 1998.

GROSS, J.; LAPIERE, C. M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.15, n.48, p.1014-22, 1962.

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**, v.44, n.3-4, p.143-53, 2003.

GUSMAN, H.; SANTANA, R. B.; ZEHNDER, M. Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. **Eur J Oral Sci**, v.110, n.5, p.353-7, 2002. Erratum in: **Eur J Oral Sci**, v.111, n.3, p.284, 2003.

HAWKINS, D. H.; ABRAHAMSE, H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. **Lasers Surg Med**. v.1, n.38, p.74-83, 2006

JONTELL, M.; OKIJI, T.; DAHLGREN, U.; BERGENHOLTZ, G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.9, n.2, p.179-200, 1998.

KAHARI, V. M.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. **Ann Med**, v.31, n.1, p.34-45, 1999.

KARU T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys**, v.5, n.56, p.691-704, 1989.

KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDU, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **J Photochem Photobiol B**, v.27, n.3, p.219-23, 1995.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol B**, v.49, n.1, p.1-17, 1999.

KUTSCH, V. K. Lasers in dentistry: comparing wavelengths. **J Am Dent Assoc**, v.124, n.2, p.49-54, 1993.

LLANO, E.; PENDAS, A. M.; KNAUPER, V.; SORSA, T.; SALO, T.; SALIDO, E.; MURPHY, G.; SIMMER, J. P.; BARTLETT, J. D.; LOPEZ-OTIN, C. Identification and structural and functional characterization of human enamelysin (MMP-20). **Biochemistry**, v.36, n.49, p.15101-8, 1997.

LOMBARD, C.; SAULNIER, J.; WALLACH, J. Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: a review. **Biochimie**, v.87, n.3-4, p.265-72, 2005.

LOPEZ-OTIN, C.; OVERALL, C. M. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.3, n.7, p.509-19, 2002.

MARQUES, M. M.; PEREIRA, A. N.; FUJIHARA, N. A.; NOGUEIRA, F. N.; EDUARDO, C. P. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. **Lasers Surg Med**, v.34, n.3, p.260-5, 2004.

MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg Med**, v.5, n.1, p.31-9, 1985.

MORITZ, A.; SCHOOP, U.; GOHARKHAY, K.; SPERR, W. Advantages of a pulsed CO₂ laser in direct pulp capping: a long-term in vivo study. **Lasers Surg Med**, v.22, n.5, p.288-93, 1998.

MORITZ, A.; SCHOOP, U.; GOHARKHAY, K.; SPERR, W. The CO₂ laser as an aid in direct pulp capping. **J Endod**, v. 24, n. 4, p. 248-51, Apr. 1998.

MUNGALL, B. A.; POLLITT, C. C. In situ zymography: topographical considerations. **J Biochem Biophys Methods**, v.47, n.3, p.169-76, 2001.

NANAMI, T.; SHIBA, H.; IKEUCHI, S.; NAGAI, T.; ASANAMI, S.; SHIBATA, T. Clinical applications and basic studies of laser in dentistry and oral surgery. **Keio J Med**, v.42, n.4, p.199-201, 1993.

NEIBURGER, E. J. Accelerated healing of gingival incisions by the helium-neon diode laser: a preliminary study. **Gen Dent**, v.45, n.2, p.166-70, 1997.

NEIBURGER, E. J. Rapid healing of gingival incisions by the helium-neon diode laser. **J Mass Dent Soc**, v.48, n.1, p.8-13, 1999.

O'BOSKEY, F. J. JR.; PANAGAKOS, F. S. Cytokines stimulate matrix metalloproteinase production by human pulp cells during long-term culture. **J Endod**, v.24, n.1, p.7-10, 1998.

OLIVER, G. W.; LEFERSON, J. D.; STETLER-STEVENSON, W. G.; KLEINER, D. E. Quantitative reverse zymography: analysis of picogram amounts of metalloproteinase inhibitors using gelatinase A and B reverse zymograms. **Anal Biochem**, v.244, n.1, p.161-6, 1997.

PALOSAARI, H.; WAHLGREN, J.; LARMAS, M.; RONKA, H.; SORSA, T.; SALO, T.; TJADERHANE, L. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF-beta1. **J Dent Res**, v.79, n.1, p.77-84, 2000.

PANAGAKOS, F. S.; O'BOSKEY, J. F. JR.; RODRIGUEZ, E. Regulation of pulp cell matrix metalloproteinase production by cytokines and lipopolysaccharides. **J Endod**, v.7, n.22, p. 358-61, 1996.

PEREIRA, A. N.; EDUARDO, C. DE P.; MATSON, E.; MARQUES, MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. **Lasers Surg Med**, v.31, n.4, p.263-7, 2002.

PIMENTA, L. H. M. **Laser em medicina e biologia**. São Paulo: Roca, 1990.

POURZARANDIAN, A.; WATANABE, H.; RUWANPURA, S. M.; AOKI, A.; ISHIKAWA, I. Effect of low-level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. **J Periodontol**, v.76, n.2, p.187-93, 2005.

RATNIKOV, B. I.; DERYUGINA, E. I.; STRONGIN, A.Y. Gelatin zymography and substrate cleavage assays of matrix metalloproteinase-2 in breast carcinoma cells overexpressing membrane type-1 matrix metalloproteinase. **Lab Invest**, v.82, n.11, p.1583-90, 2002.

ROCHKIND, S.; ROUSSO, M.; NISSAN, M.; VILLARREAL, M.; BARR-NEA, L.; REES, D. G. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Lasers Surg Med**, v.9, n.2, p.174-82, 1989.

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**, v. 2, n.107, p.121-30, 1999.

SATOYOSHI, M.; KAWATA, A.; KOIZUMI, T.; INOUE, K.; ITOHARA, S.; TERANAKA, T.; MIKUNI-TAKAGAKI, Y. Matrix metalloproteinase-2 in dentin matrix mineralization. **J Endod**, v.27, n.7, p.462-6, 2001.

SHIN, S. J.; LEE, J. I.; BAEK, S. H.; LIM, S. S. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. **J Endod**, v.28, n.4, p.313-5, 2002.

SMITH, A. J.; LESOT, H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? **Crit Rev Oral Biol Med**, v.12, n.5, p.425-37, 2001.

SORSA, T.; TJADERHANE, L.; SALO, T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. **Oral Dis**, v.6, n.10, p.311-8, 2004.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.17, p. 463-516, 2001.

TAMURA M, NAGAOKA S, KAWAGOE M. Interleukin-1 alpha stimulates interstitial collagenase gene expression in human dental pulp fibroblast. **J Endod**, v.5, n.22, p.240-3, 1996.

TJADERHANE, L.; LARJAVA, H.; SORSA, T.; UITTO, V. J.; LARMAS, M.; SALO, T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. **J Dent Res**, v.77, n.8, p.1622-9, 1998.

TSAI, C. H.; HSIEH, Y. S.; YANG, S. F.; CHOU, M. Y.; CHANG, Y. C. Matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 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.5, p.710-6, 2003.

TZIAFAS, D.; SMITH, A. J.; LESOT, H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. **J Dent**, v.28, n.2, p.77-92, 2000.

TZIAFAS, D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. **Caries Res**, v.38, n.3, p.314-20, 2004.

VINCK, E. M.; CAGNIE, B. J.; CORNELISSEN, M. J.; DECLERCQ, H. A.; CAMBIER, D. C. Green light emitting diode irradiation enhances fibroblast growth impaired by high glucose level. **Photomed Laser Surg**, v.23, n.2, p.167-71, 2005.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**, v.92, n.8, p.827-39, 2003.

VU, T. H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes Dev**, v.17, n.14, p. 2123-33, 2000.

WAHLGREN, J.; SALO, T.; TERONEN, O.; LUOTO, H.; SORSA, T.; TJADERHANE, L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpal and periapical inflammation and periapical root-canal exudates. **Int Endod J**, v. 11, n.35, p.897-904, 2002.

WALSH, L. J. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. **Aust Dent J**, v.42, n.4, p.247-54, 1997.

WEBB, C.; DYSON, M.; LEWIS, W. H. Stimulatory effect of 660 nm low level laser energy on hypertrophic scar-derived fibroblasts: possible mechanisms for increase in cell counts. **Lasers Surg Med**, v.22, n.5, p.294-301, 1998.

ANEXOS

ANEXO A

Preparo dos Reagentes para Zimografia

Tampão inferior do gel 4X: 18,5g de TRIS base (Sigma), 0,4g de SDS (Bio-Rad), 50ml de água Milli-Q, ajustar o pH para 8,8 com HCl, num volume final de 100ml em água deionizada.

Tampão superior do gel 4X: 3g de TRIS base, 0,2g de SDS em 20ml de água Milli-Q, ajustar o pH para 6,8 com HCl, num volume final de 50ml com água Milli-Q.

Tampão da amostra de Laemmli 4X sem azul de bromofenol: 1g de SDS, 2,5g de glicerol (Sigma), 5ml do tampão superior do gel 4X, completando para 10ml com água Milli-Q.

Tampão de corrida: 0,025M TRIS, 0-19M glicina, 0,1% SDS, pH 8,3.

Gel de empilhamentos Laemmli (4% acrilamida): 1,5ml de solução de acrilamida-bisacrilamida a 30%, 6,1ml de água, 2,5ml do tampão superior do gel 4X, 100µl de persulfato de amônia a 10% preparado a fresco, 5µl TEMED.

Corante azul de Comassie: 5g de azul de Comassie em 600ml de água, filtrar, adicionar 300ml de álcool isopropil e 100ml de ácido acético.

Tampão de incubação: 50mM TRIS-HCl, pH 7,8 contendo 150mM de NaCl e 5mM CaCl₂.

ANEXO B

Preparo dos Géis para Zimografia

Foram dissolvidas 3mg/ml de gelatina (Sigma >90% de pureza) em água Milli-Q contendo 0,02% de azida sódica (NaN_3). Para o preparo da acrilamida-bisacrilamida a 30%, foram dissolvidas 29,2g de acrilamida e 0,8g de bisacrilamida em água Milli-Q, ajustando para um volume final de 100ml. Essa solução foi filtrada e estocada a 4°C protegida da luz (garrafa escura).

O tampão foi preparado para incubação do substrato gel que deu as condições necessárias para a atividade enzimática. Para observar a atividade das metaloproteinasas foi utilizada solução fosfato salina tamponada (PBS) contendo cálcio num pH 7,2.

De posse das soluções citadas anteriormente, foram preparados 14ml de acrilamida a 10% contendo 1mg/ml de gelatina. Após, foram misturados 4,66ml da solução de acrilamida-bisacrilamida a 30%, 3,5% do tampão inferior do gel 4X, 4,66ml de solução de 3mg/ml de gelatina e 1,04ml de água. A solução descansou por 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir, foram acrescentados 50 μ l de persulfato de amônia a 10%, preparado a fresco, e 7 μ l de TEMED. Esse gel de acrilamida a 10% dá a melhor resolução para enzimas com pesos moleculares entre 30 e 100 kD.

O gel foi aplicado entre as placas de vidro do aparelho de eletroforese evitando a formação de bolhas. O aparelho foi previamente selado na sua parte inferior com gel de agarose. Sobre o gel coloca-se água e espera-se a polimerização por 120 minutos.

Na hora de realizar a zimografia propriamente dita, foram preparados 10ml de gel de empilhamento de Laemmli. Esse gel foi colocado sobre o gel de gelatina já polimerizado, onde foi acondicionado um pente com 10 espaços. Esse gel levou 40 minutos para polimerizar. A seguir, sem ferver as amostras previamente preparadas com tampão de amostra de Laemmli, estas foram aplicadas ao gel e a eletroforese foi feita dentro da geladeira a 4°C, para reduzir a interação da enzima com o substrato e conseguir pesos moleculares mais acurados. Para o empilhamento foi utilizada corrente de 15mA e a seguir 20mA. Para a monitoração da corrida foram utilizados marcadores de peso molecular pré-corados (Amersham, Co., Arlington Heights, IL, EUA).

Terminada a eletroforese as proteínas foram renaturadas. Para isso, o SDS foi retirado do gel e imerso em solução de Triton X-100 a 2,5% em 50mM TRIS, pH 7,6, com movimentação suave por 60 minutos à temperatura ambiente, efetuando uma troca de solução na metade desse período. A seguir, o gel foi lavado 3 vezes com o tampão de incubação e a seguir, para permitir a atividade enzimática, o gel foi incubado a 37°C por 24h com movimentação suave. Para comprovar que as bandas obtidas eram realmente MMPs, metade de um dos géis foi mantido no tampão de incubação com 15mM de EDTA. Este quelante inibiu especificamente as MMPs, provocando bandas menos intensas no gel de gelatina.

Finalmente, o gel foi corado com a solução azul de Comassie por no mínimo 30 minutos com agitação e a seguir, descorado com metanol a 45% e ácido acético a 10%. Com isso obtivemos um gel com bandas claras ou transparentes contra um fundo azul.