



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Dalton José Sousa Costa

**Concentração de hidroxiprolina na matriz colágena durante
o envelhecimento: estudo bioquímico em gengivas saudáveis**

Rio de Janeiro

2008

Dalton José Sousa Costa

**Concentração de hidroxiprolina na matriz colágena durante o
envelhecimento: estudo bioquímico em gengivas saudáveis**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer

Rio de Janeiro

2008

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBB

C837 Costa, Dalton José Sousa.
Concentração de Hidroxiprolina na matriz colágena durante o envelhecimento: estudo bioquímico em gengivas saudáveis/ Dalton José Sousa Costa. – 2008.
52 f.

Orientador: Ricardo Guimarães Fischer.
Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia.

1. Gengiva. 2. Matriz extracelular. 3. Colágeno. 4. Envelhecimento. 5. Tecido elástico. 6. Bioquímica. I. Fischer, Ricardo Guimarães. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. III. Título.

CDU
616.314

Kárin Cardoso CRB/7 6287

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Dalton José Sousa Costa

Concentração de Hidroxiprolina na matriz colágena durante o envelhecimento: estudo bioquímico em gengivas saudáveis

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós- Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Periodontia.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2008.

Orientadores:

Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer
Faculdade de Odontologia – UERJ

Prof. Dr. Luiz Eduardo de Macedo Cardoso
Faculdade de Odontologia – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Marcelo da Silva Figueredo
Faculdade de Odontologia – UERJ

Prof. Dr. João Batista Gagno Intra
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Henrique Guilherme de Castro Teixeira
Universidade de Campinas

Prof. Dr. Écio de Oliveira Vieira
Faculdade de Odontologia – UERJ

Prof. Dra. Ana Luiza Bastos
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2008

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Altamiro e Dalva, meus verdadeiros amigos, mestres, exemplos de dignidade, pelo apoio incondicional, incentivo, suporte humano e carinho em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Ricardo Guimarães Fischer, exemplo de dedicação à odontologia, mestre e amigo, a quem devo grande parte de minha formação nesta especialidade. Obrigado pela oportunidade e confiança ao me receber como seu aluno de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo de Cardoso Macedo, pela oportunidade do convívio, por me receber em seu laboratório e possibilitar a elaboração deste trabalho.

À minha esposa Eliana Bassani Bezerra, companheira de todas as horas, demonstrando sempre amor, paciência, hoje e sempre.

Aos meus filhos Guilherme e Luisa, projeto de Deus em minha vida, que me fazem seguir.

Ao Prof. Dr. Cleto Firme, mais de 50 anos dedicados à Odontologia. Exemplo de mestre, profissional e cidadão.

Ao Professor Carlos Marcelo da Silva Figueredo, não só pelo ensinamento, mas também pelas instigações, discussões e debates.

Ao Professor Waldemar Silva Costa pela atenção, carinho e palavras de estímulo em latim ou Frances.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação e Pesquisa.

Aos pacientes que gentilmente cederam parte de si para a pesquisa e meu aprendizado.

À Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) pela ajuda e amizade.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Todos os homens buscam uma meta: sucesso e felicidade. O único modo de se obter sucesso verdadeiro é expressar-se completamente no serviço à sociedade. Em primeiro lugar, ter um ideal definido, claro, prático, uma meta. Em segundo lugar, ter os meios necessários a atingir seus objetivos. Em terceiro lugar, ajustar seus meios a esses objetivos.

Aristóteles

RESUMO

COSTA, Dalton José de Sousa. *Concentração de Hidroxiprolina na matriz colágena durante o envelhecimento: estudo bioquímico em gengivas saudáveis*. 2008. 52f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

O objetivo deste estudo foi examinar o colágeno total de gengivas humanas clinicamente sadias e sua relação com a idade. Biópsias gengivais foram obtidas de 28 pacientes (idade média $30,01 \pm 18,7$). As biópsias foram divididas em 3 grupos de idade: 10 a 15 anos (pré-puberdade), 16 a 35 anos (adultos jovens) e acima de 36 anos (adultos). A condição inflamatória dos tecidos foi analisada. Os tecidos foram processados para microscopia ótica e o colágeno foi examinado após as colorações realizadas com HE, tricromia de Gomori, picrossírios e fucsina e resorcina de Waigert com oxidação prévia. Análises bioquímicas de colágeno total foram realizadas usando os níveis de hidroxiprolina após hidrólise com HCl, neutralização com NaOH (pH 7.0) e centrifugações. O supernadante clarificado foi utilizado para determinar a concentração da hidroxiprolina em um espectrofotometro. Diferenças entre os grupos foram realizadas pelo teste Mann-Whitney test ($p < 0,05$). Os resultados indicam que a concentração de hidroxiprolina foi significativamente maior no grupo da pré-puberdade quando comparado com outros grupos ($p < 0,05$). Concluímos então que a concentração de hidroxiprolina em tecidos clinicamente sadios diminui com a idade adulta.

Palavras-chave: Gengiva. Matriz extracelular. Colágeno. Envelhecimento. Fibra elástica.
Bioquímica.

ABSTRAT

COSTA, Dalton José de Sousa. *Hydroxyproline concentration in the collagen matrix during aging: biochemical study in healthy gums*. 2008. 52f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

The aim of this study was to examine the age-dependent amounts of total collagens in healthy human gingival tissues. The gingival biopsies were obtained from 28 patients (mean age $30,01 \pm 18,7$). The biopsies were divided in 3 age groups: 10 to 15 years (prepubertal children), 16 to 35 years (young adults) and over 36 years (adults). The tissues were analyzed for the inflammatory condition. The tissues were routinely prepared for light microscopy examination and the collagen was evidenced by staining with HE, Gomori's trichrome, picrosirius red, and Weigert's resorcin fuchsin. Biochemical analyses total collagens were used levels of hydroxyproline by HCl hydrolysis, neutralized with NaOH (pH 7.0), centrifuged. The clear supernatant tractions were used for spectrophotometric determination of hydroxyproline. Differences between the groups were tested by Mann-Whitney test ($p < 0,05$). The results indicated that the concentration of hydroxyproline was significantly higher in the prepubertal group, as compared to the other groups ($p < 0,05$). In conclusion, it seems that the concentration of hydroxyproline in healthy periodontal tissues decreases in adult life.

Keywords: Gingiva. Extracellular matrix. Collagen. Aging. Elastic fiber. Biochemical.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fotomicrografia de uma biópsia considerada clinicamente normal mostrando o estado inflamatório com presença de vasos (HE 200X).....	34
Figura 2 -	Fotomicrografia mostrado em um aumento maior. Pode-se visualizar a presença de vasos e a integridade do tecido (HE 400X).....	35
Figura 3 -	Fotomicrografia da mesma biópsia mostrando os feixes de colágeno 1 e 3 na região próxima ao epitélio. Presença de vãos sanguíneos (PICR 400X)	35
Figura 4 -	Fotomicrografia da mesma biópsia mostrando os feixes de colágeno na região próxima ao epitélio. Presença de vasos sanguíneos (TRIC 400X) ..	36
Figura 5 -	Fotomicrografia da mesma biópsia mostrando os feixes de colágeno na região próxima ao epitélio. Presença de vasos sanguíneos - fina marcação ao redor dos vasos. Ausência de marcação, para fibras elásticas, próximo ao epitélio (WEIG 400X).....	36
Figura 6 -	Fotomicrografia em campo próximo da figura 5. Presença de vasos sanguíneos marcação (em roxo) para fibras elásticas ao redor dos vasos. Ausência de marcação, para fibras elásticas, próximo ao epitélio (WEIG 400X)	37
Gráfico 1 -	Correlação entre concentração de hidroxiprolina e a idade.....	37
Tabela 1 -	Dados relativos a idade e concentração de hidroxiprolina	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CFO	Conselho Federal de Odontologia
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
GAG	Glicosaminoglicanos
Arg	Arginina
Lys	Lisina
Asp	Ácido Aspártico
MEC	Matriz Extra Celular
Gly	Glicina
Pro	Prolina
HYP	Hidroxiprolina
SLRPs	Small leucine-rich proteoglycans
TGF- β	Fator de crescimento β
GAGs	Glicosaminoglicanos
bFGF	Fator de crescimento básico de fibroblastos
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
PBS	Profundidade de Bolsa a Sondagem
IG	Índice Gengival
IP	Índice de Placa
HCl	Ácido clorídrico
NaOH	Hidróxido de sódio
HE	Hematoxilina e Eosina
PICR	Picrosirius e Fucsina
TRIC	Tricrômico de Gomori
WEIG	Resorsina de Weigert

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1	Aspectos biológicos o envelhecimento	15
1.2	Alterações na cavidade bucal durante o envelhecimento	16
1.3	Levantamento bibliográfico	17
1.4	Aging (envelhecimento)	20
1.5	A matriz extracelular	21
1.6	O colágeno	22
1.7	Síntese da matriz não colagênica	25
2	OBJETIVO	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	Coloração de rotina	32
3.2	Aquisição e análise das imagens	32
3.3	Concentração de colágeno	32
3.4	Análise estatística	32
4	RESULTADOS	34
5	DISCUSSÃO	39
	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43
	ANEXOS	49

INTRODUÇÃO

A matriz extracelular constitui um complexo sistema integrado, responsável pela patofisiologia e pelas propriedades do tecido conjuntivo. A importância do Colágeno, no processo de cicatrização, tem sido descrita há muito tempo (AKALIN *et al.*, 1992). O processo de reparo da ferida é orquestrado pela matriz extracelular, quando as interleucinas e outros fatores do crescimento adquirem o papel principal, na regulamentação dos processos celulares. A resposta das citocinas está relacionada com a composição da matriz extracelular. Um distúrbio ou uma aberração nesses fatores podem conduzir a uma cicatrização anormal. A cicatrização é um processo altamente complexo, onde há a ação de fatores que são específicos ao indivíduo, tais como o status nutricional, idade, doença sistêmica e medicações, juntamente com o tamanho, a profundidade, a causa e a etiologia da ferida (PURNA e BABU, 2000).

Os componentes extracelulares da matriz, como a fibronectina, a laminina e o colágeno, estão ligados, entre si, através dos receptores de superfície específicos. Os componentes da matriz, sozinha ou em combinação, influenciam a adesão tecidual em relação ao crescimento, morfologia, migração, diferenciação, formação, extensão da vida e longevidade (PURNA e BABU, 2000). Os componentes moleculares da matriz extracelular são compostos, primeiramente, por colágenos, proteoglicanos, glicoproteínas, além de quantidades menores de outras proteínas. Fibronectina e a laminina são as glicoproteínas da matriz, que se ligam especificamente ao colágeno, promovendo adesão mesenquimal ao colágeno da membrana basal. O colágeno fornece a sustentação estrutural.

O crescimento, a morfologia e a diferenciação de uma variedade tecidual são dados pelo colágeno, talvez devido a sua atividade adesiva. Variações de quantidade de colágeno e de elastina ocorrem em muitas doenças e são frequentemente o único achado morfológico que pode ser relatado através de testes bioquímicos e sintomas clínicos (GOGLY *et al.*, 1997). Entre os vários tecidos conjuntivos, a pele tem sido considerada uma janela para a evolução de doenças inatas ou adquiridas. A pele humana possui fibras do sistema elástico, compostas por três tipos diferentes: fibras oxitalâmicas, orientadas perpendiculares à membrana basal da derme/epiderme; fibras elaunilicas, com orientação paralela à membrana basal da derme/epiderme; e, por último, a conexão entre as fibras oxitalâmicas e as fibras elásticas maduras, nas camadas mais profundas da pele. Por fim, o tecido gengival contém

componentes semelhantes à matriz extracelular de pele (GOGLY *et al.*, 1997).

Mudanças das propriedades físicas do colágeno, durante a senescência, foram descritas na pele, tendão e articulações, poucos estudos apresentam descrições de mudanças, em termos quantitativos, de colágeno total em tecido gengival humano.

A doença gengival inflamatória ocorre em todas as idades (RUSSEL, 1967). A Inflamação e a reação imune gengival podem parecer similares a outros processos, vistos em qualquer parte do corpo, mas há uma diferença importante: a anatomia do periodonto é o local único, no corpo, a possuir um poro (o epitélio juncional) que, durante todo o tempo, possui um exudato (fluido gengival) e escamação celular (MARIOTTI *et al.*, 1998). Sem o conhecimento das variações individuais e as mudanças em relação à idade, nenhuma variação significativa, na patologia, pode ser determinada em diferentes estágios de doença (AKALIN *et al.* 1992).

A expressão dos componentes colágenos e não colágenos da Matriz Extra Celular (MEC) do tecido gengival, durante o envelhecimento, pode ajudar a entender o seu papel funcional no desenvolvimento das doenças periodontais. Poucos estudos abordam esse tema e diversas questões ainda permanecem sem o devido esclarecimento, dentre elas, por exemplo, se a patogênese da doença periodontal está relacionada à expressão alterada das proteínas da MEC e qual (ou quais) seria(m) seu papel, durante o desenvolvimento dessa doença, ou, ainda, se essas alterações fazem parte do processo de envelhecimento (“aging”). Durante o envelhecimento, mudanças ocorrem na rede de colágeno (AKALIN *et al.* 1992).

O presente estudo foi conduzido para avaliar as variações bioquímicas de colágeno total no tecido gengival clinicamente saudável, em seres humanos masculinos de diferentes idades tendo em vista o processo de envelhecimento. Os resultados podem ter importância direta na patologia bucal, especialmente na patogênese da gengivite e/ou periodontite (COSTA *et al.*, 1998). Além disso, deve-se lembrar também que este tecido tem sido utilizado com sucesso em enxertos mucogengivais e até como enxerto autólogo para a reconstrução da uretra (BARBAGLI e LAZZERI, 2006). A melhor compreensão sobre as características bioquímicas do tecido gengival estudado permite um controle mais eficiente sobre diversos aspectos (como o prognóstico) destes enxertos assim como o melhor entendimento da patogênese das doenças periodontais.

A relevância do presente estudo deve-se ao fato de a determinação das estruturas

normais da matriz extracelular da gengiva humana não terem sido determinadas em diversas idades e as modificações que ocorrem com a idade não serem conhecidas. A hipótese é que existem variações na composição e/ou concentração de colágeno total entre indivíduos da mesma idade e que esta variação é ainda maior com o processo de envelhecimento. Este dado poderia ser utilizado para entender o processo natural de envelhecimento que ocorre na matriz extracelular do periodonto para que não se cometa o erro de se propor que certas variações de matriz, que podem ser um processo natural, sejam colocadas como causas da patologia da doença periodontal permitindo o melhor entendimento do processo inflamatório que ocorre na região periodontal, tanto na patogênese das doenças como no prognóstico de terapias cirúrgicas que utilizam este tecido como os enxertos e cirurgias plásticas reconstrutivas.

1 REVISÃO DE LITERATURA

A preocupação com o processo de envelhecimento, com a velhice e com os idosos permeia a história humana, sendo retratada em diferentes formas, desde manuscritos em papiros, que datam há cerca de 3000 a.C, até evidências em obras filosóficas, como “A República” de Platão e “De Senectute” de Cícero. Tratado como referência de interesse prioritário, pelas Ciências, o tema passou a constar em pesquisas e observações, ganhando incremento a partir do século XVIII, quando o número de obras, destinadas a explorar o tema *envelhecimento* passou a crescer em proporções geométricas. Atribui-se a Johann Bernard Von Fischer o primeiro tratado científico, em Geriatria, durante a Era Moderna (FREITAS *et al.*, 2002).

Etnologicamente é considerado idoso, o ser humano que ultrapassa 60 anos de idade, em países em desenvolvimento, ou 65 anos de idade, em países considerados desenvolvidos (FREITAS *et al.*, 2002).

Define-se ***Geriatria*** como a parte da medicina que estuda a prevenção e o tratamento das enfermidades inerentes aos idosos, sua reabilitação e sua reintegração social. E a ***Gerontologia*** como a ciência que estuda os fenômenos do processo de envelhecimento, considerando os seus vários aspectos: biopsicossocial, espiritual e histórico (FREITAS *et al.*, 2002).

A Odontogeriatria, enquanto especialidade odontológica, foi reconhecida pelo Conselho Federal de Odontologia (CFO) em 2001, incluindo-a entre as 19 especialidades já existentes. O Artigo 29, Seção IX, da Resolução CFO-12/2001 apresenta a seguinte definição para essa nova especialidade:

Odontogeriatria é a especialidade que se concentra no estudo dos fenômenos decorrentes do envelhecimento que também têm repercussão na boca e suas estruturas associadas, bem como a promoção de saúde, o diagnóstico, a prevenção e o tratamento de enfermidades bucais e do sistema estomatognático do idoso”. (CONSELHO, 2001, p. 1).

À medida que ocorrem os avanços tecnológicos, as sociedades humanas aumentam suas expectativas de vida, associadas à qualidade de suas existências, através da manutenção de boa saúde (conseqüentemente com indivíduos que conservam mais dentes em suas bocas), e, em razão disso, exigindo dos profissionais da área de saúde maior conhecimento sobre o

processo de envelhecimento.

1.1 Aspectos biológicos do envelhecimento

Nos países que apresentam índices satisfatórios de Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), a composição demográfica tem sido alterada pelo fenômeno de envelhecimento populacional, representado pelo aumento de indivíduos com mais de 60 anos na composição populacional. Tal fenômeno sugere a realização de novos estudos, destinados a melhor compreensão do processo normal de envelhecimento humano, bem como situações patológicas a que estão sujeitos indivíduos idosos, como forma de resguardar as peculiaridades desta faixa etária.

Autores como Miller, Davies e Kirwood, em 1998, apresentaram definições, em um simpósio, sobre senescência. Existia em comum em suas definições o caráter progressivo das alterações das células ao indivíduo, ocasionando transformações que aumentam a vulnerabilidade dos que envelhecem, sem, necessariamente, torná-los mais frágeis (FREITAS *et al.*, 2002).

Nos últimos 30 anos, houve um aumento significativo da produção de conhecimento visando elucidar os mecanismos envolvidos no processo de envelhecimento.

Inúmeros estudos, inicialmente, foram fundamentados a partir de modelos com alterações nos mecanismos infecciosos, imunológicos, endócrinos etc. Atualmente a busca se direciona para o conhecimento do processo molecular e celular das alterações, visto que ainda não se tem um modelo definido que consiga explicar todo o processo.

Algumas teorias estão sendo incluídas na literatura atual por apresentarem maiores evidências de descrição do processo biológico do envelhecimento. A teoria dos radicais livres sugere que produtos altamente reativos, oriundos do metabolismo oxidativo, podem reagir com constituintes celulares, como proteínas, DNA e lipídios, gerando moléculas alteradas que interferem na função celular. A teoria da glicosilação sugere que formas glicosiladas de colágeno se acumulam e causam disfunções no processo metabólico dos tecidos. A teoria da reparação do DNA sugere que fatores (exógenos e endógenos) interferem no mecanismo de mutações somáticas do DNA, na composição da membrana plasmática, na função mitocondrial, nas alterações imunológicas, na síntese e na degradação de proteínas, na perda

programada da capacidade mitótica dos fibroblastos, etc. Algumas dessas teorias e mecanismos são consideradas importantes para o entendimento da senescência, apesar de todas ainda não possuírem um modelo definitivo (FREITAS *et al.*, 2002).

O envelhecimento por si só não é sinônimo de doença (FREITAS *et al.*, 2002). Contudo, têm-se encontrado dificuldades para estabelecer a distinção entre senescência ou senectude (que resulta do somatório de alterações orgânicas, funcionais e psicológicas que são próprias do envelhecimento normal) e senilidade (que é caracterizada por determinadas modificações resultantes de afecções que, freqüentemente, acometem a pessoa idosa).

O exato limite entre esses dois estados não é preciso e caracteristicamente apresenta zonas de transição freqüentes, o que dificulta discriminar a cada um deles (FREITAS *et al.*, 2002).

1.2 Alterações na cavidade bucal durante o envelhecimento.

A mucosa bucal torna-se mais fina, lisa e seca, apresentando perda da elasticidade e aumento da suscetibilidade às lesões. A língua apresenta-se mais lisa ocorrendo perda das papilas filiformes, podendo apresentar alterações, no paladar, e sensação de queimação. A mucosa bucal diminui sua queratinização, havendo simplificação da estrutura epitelial, ocasionada, muitas vezes, por distúrbios alimentares. Os ossos e os dentes, por sofrerem atrito constante, podem apresentar alterações, em razão de desgaste e principalmente em decorrência da perda de dentes, atrofia do osso alveolar ou desgastes e recessões pelo uso. A produção de saliva diminui sem apresentar repercussão clínica importante. Essa redução assume grande importância em processos relacionados ao aumento da suscetibilidade dos idosos ao uso de medicações. Apesar de todas as alterações, relacionadas à senescência, as disfunções em dentes e cavidade bucal de idosos decorrem de doença periodontal ou cariosa e lesões de mucosas, causadas por condições inadequadas de higiene, alimentação e por doenças sistêmicas.

Os conceitos atuais de etiologia e de patogênese da doença periodontal são advindos, principalmente, de resultados epidemiológicos, de análises de autópsias, de material de biópsia, de ensaios clínicos e de experimentação animal. Alguns achados epidemiológicos, afirmam Kinane e Lindhe, revelam que a prevalência e a extensão da doença periodontal aumentam conforme a idade, estando, também, associada à inadequada higiene oral. Estudos

de prevalência evidenciaram a extensão e a severidade da doença, mostrando que poucos indivíduos, em cada grupo de idade, possuem destruição periodontal avançada e, desses, poucos são os sites severamente envolvidos (LINDE, 2005).

A gengiva normal é caracterizada, clinicamente, por apresentar sua cor rosa e consistência firme, margem exibindo um colarinho livre. As papilas interdentais são firmes e não sangram, mediante sondagem delicada, preenchendo todo o espaço abaixo do ponto de contato (LINDE, 2005).

1.3 Levantamento bibliográfico

As maiores mudanças no colágeno estão relacionadas à rigidez dos tecidos, quando as fibras ficam quebradiças (BAILAY, 1998). Algumas mudanças revelam-se claramente deletérias, em relação ao funcionamento do sistema locomotor, ao sistema elástico vascular e às propriedades de filtração realizadas pela membrana basal. Estudos recentes enfatizam a importância da interação célula-matriz, particularmente durante o desenvolvimento. Estudos preliminares indicam que a redução da eficiência da interação célula-matriz, durante o envelhecimento, afeta particularmente a membrana basal e suas funções.

Para entender as mudanças provocadas pela senescência, é essencial compreender o papel do colágeno na determinação das propriedades mecânicas do tecido; as mudanças que ocorrem na ligação entre as redes de fibrilas e tecidos, assim como a causa principal da mudança observada em propriedades mecânicas; o papel do colágeno na estrutura fibrosa e as mudanças na atividade e no tipo do colágeno, associadas com um tecido em particular.

A variação que ocorre, entre os diferentes tipos de colágeno, pode ser observada durante o desenvolvimento (REICHENBERGER, 1996). No entanto, a literatura é mais escassa no tocante à descrição do processo de mudanças, principalmente em relação às diferenças relacionadas à senescência. Estudos mais recentes mostram a existência de mudanças, qualitativas ou quantitativas, nos tecidos colágenos, durante o processo de envelhecimento (BASTOS *et al.*, 1999; BASTOS; SAMPAIO; CARDOSO, 2005, SILVA *et al.*, 2002).

A composição dos tecidos pode variar e alterar a proporção de colágenos diferentes em

um tecido em particular (BAILAY, 1998; MAROCLO *et al.*, 2005). Poucos estudos buscaram avaliar as mudanças na composição tecidual, durante o processo de envelhecimento, embora alguns fossem estudados durante o seu desenvolvimento. Por exemplo, a derme embrionária contém colágeno do tipo III, em, aproximadamente, 50%, reduzindo-se a, aproximadamente, 15%, durante o crescimento pós-natal (EPSTEIN, 1971). Entretanto, um estudo indicou que, durante as últimas décadas da vida, há um aumento na proporção de colágeno III na derme (LOVELL *et al.*, 1987). Esse efeito pode ser devido a uma perda ou a uma síntese reduzida do tipo colágeno de I ou um aumento no tipo colágeno de III, devido a uma mudança na expressão fenotípica dos fibroblastos do tecido envelhecido. O efeito de tais mudanças, no tipo do colágeno, nas propriedades funcionais da fibra, principalmente mecânicas, deve, ainda, ser estabelecido (BAILAY, 1998).

A taxa de metabolismo do colágeno varia, também, substancialmente, com a maturação e a senescência, embora a taxa de “turn over” total seja, comparativamente, lenta. A síntese do colágeno diminui firmemente com a maturação e, com o envelhecimento subsequente, pode cair 10 vezes, na maioria dos tecidos. A degradação do colágeno, por outro lado, foi relatada em estudos realizados com os ratos, em relação ao aumento da maturação, e, em consequência, a maioria do colágeno, recentemente sintetizado em ratos velhos, parece ser destinado à degradação (BAILAY, 1998).

As propriedades funcionais do tecido dependem da estrutura preliminar das moléculas do colágeno. Apesar de registrar taxa relativamente baixa de turn over do colágeno, as mudanças podem ser significativas, em termos de décadas de vida, enquanto a matriz está sendo renovada lentamente. Em relação ao indivíduo idoso é possível que a composição das fibras esteja alterada (BAILAY, 1998). Certamente, a extensão da hidroxilação e da glicosilação foi relatada em casos de diminuição da maturação (BARNES *et al.*, 1974; ROYCE e BARNES, 1985).

Essas modificações refletem mudanças na expressão fenotípica dos fibroblastos, dos osteoblastos e dos condroblastos dos vários tecidos conforme a idade. Ao mesmo tempo modificações das cadeias de aminoácidos, na pré ou pós-translação, podem afetar as interações da célula/matriz, exacerbando, para mais, o declínio das propriedades funcionais desses tecidos. Entretanto, pouco é sabido dos efeitos dessas mudanças (BAILAY, 1998).

O processo de isomerização nas proteínas (CLARKE, 1987), foi mostrado, conforme o

aumento de idade, especialmente em relação às proteínas de vida longa, como a dentina, o esmalte do dente (HELFMAN e BADA, 1975; MESTRES *et al.*, 1977). Recentemente, foi mostrado que, durante o processo de envelhecimento, o tipo colágeno tipo I submete-se ao b-b-isomerização de Asp-Gly-Gly dentro do C-telopeptídeo (FLEDELIUS *et al.*, 1997). Essa modificação foi demonstrada, no tecido ósseo, pela análise direta do osso e, indiretamente, através da urina.

As mudanças, com a idade, estão relacionadas principalmente às propriedades físicas. Tais mudanças, em propriedades mecânicas, devem envolver a polimerização das moléculas do colágeno, na fibra, com ligação cruzada inter-molecular. A teoria da ligação cruzada de envelhecimento apresenta um longo histórico. Bjorksten, em 1962, propôs uma teoria de envelhecimento, baseada na perda de função de todas as proteínas, pela ligação cruzada excessiva na reação com metabólitos do aldeído. Verzar, em 1957, foi o primeiro a realizar um estudo detalhado do envelhecimento do colágeno, passando a usar a tensão crescente, gerada pelo calor, para demonstrar, claramente, a presença das ligações transversais em função do processo de envelhecimento (BAILAY, 1998).

As mudanças mais dramáticas ocorrem entre o nascimento e a maturidade. Mas Rasmussen *et al.*, em 1964, relataram um aumento adicional, na tensão isométrica, relacionada à senescência (BAILAY, 1998). De fato, de acordo com a idade, a mudança, nas propriedades mecânicas, pode estar relacionada a dois mecanismos distintos de ligação cruzada da fibra, para dar forma a uma grande rede de polímero, através de dois mecanismos: um direto e específico e o outro, baseado em um método indireto, não específico. A ligação cruzada inicial das moléculas do colágeno durante o desenvolvimento, envolve uma ligação cruzada enzimática precisamente controlada, para dar forma às ligações transversais multivalentes estáveis. O reduzido turnover metabólico do colágeno permite que o segundo mecanismo indireto da ligação cruzada ocorra mediante a reação com a glicose e seus produtos de oxidação, através de um processo conhecido como **glicação**.

A Glicação, de fato, conforme mostrado, interfere nas interações entre a matriz e o colágeno-matriz. Para o exemplo, a glicação da membrana basal altera suas características com o heparan sulfato e laminina (SENSI *et al.*, 1989) e fibronectina (TARSIO; REGER; FURCHT, 1988) e glicação do colágeno IV altera o tipo de adesão e o espalhamento endotelial (HAITOGLOU *et al.*, 1992). De forma similar, a agregação de plaqueta e a adesão ao colágeno são dependentes da estrutura quaternária do colágeno (BARNES *et al.*, 1980) e

envolvem domínios específicos na molécula. A Glicação do colágeno aumenta a agregação plaquetária e aumenta o risco de o idoso contrair a doença trombótica. O óxido nítrico é um regulador-chave do tonus vascular. Os estudos demonstraram que a glicação extingue, indiretamente, sua atividade e obstrui especificamente o efeito antiproliferativo (HOGAN *et al.*, 1992). A resposta vasodilatadora do óxido nítrico foi relatada por estar correlacionada ao nível de idades (BUCALA *et al.*, 1991) embora a natureza e a posição dessas idades não fossem determinadas. É possível que a glicação do colágeno tipo IV, da membrana basal do endotélio, esteja contida nessas mudanças. Beiley, em 1998, supôs que as mudanças, envolvidas em todas essas reações, se constituam modificações das correntes laterais do amino-ácido existente, adições simples do glucose, para dar forma aos hexosyl-lysines e para anular, assim, a carga positiva do lysine, ou modificações oxidativas, tais como o carboxymethyl-carboxymethyl-lysine, que muda a carga do lysine da corrente lateral a um grupo carboxyl negativo. Mas outras modificações remanescentes provavelmente podem ser identificadas.

1.4 Aging (envelhecimento)

O termo “aging” aplica-se a todas as alterações da MEC, decorrentes do aumento de idade (BAILEY, 2001), às quais resultam de reações químicas, nas cadeias laterais de aminoácidos, como Arginina [Arg], Lisina [Lys] e Ácido Aspártico [Asp].

As alterações do “aging”, no tecido, são lentas e susceptíveis às mudanças relacionadas a idade (BAILEY, PAUL e KNOTT, 1998) e, em consequência, vários efeitos danosos podem ocorrer, entre eles a redução da renovação celular e a perda das propriedades físicas dos tecidos, o que diminui a sua flexibilidade e a sua permeabilidade, devido as ligações cruzadas intermoleculares e as modificações da cadeia lateral do colágeno. Essas mudanças típicas são aceleradas em indivíduos diabéticos, devido à hiperglicemia (BAILEY, 2001).

Várias doenças estão relacionadas ao “aging”, dentre elas, o diabetes, a arteriosclerose e a osteoporose (BAILEY, 2001).

Os efeitos do “aging” acometem todo o organismo, uma vez que as mudanças ocorrem na estrutura da proteína mais abundante no corpo humano – o colágeno. Dentre os processos que se modificam, com o envelhecimento do colágeno, pode-se citar a variação na

composição do tecido, envolvendo alterações na proporção de diferentes colágenos, em um tecido particular; a variação na intensidade em que ocorre o metabolismo do colágeno, embora a porcentagem de renovação celular total seja, comparativamente, baixa, pois a síntese de colágeno diminui regularmente, à medida que ocorre a maturação e, por outro lado, provoca o aumento da degradação (BAILEY, 2001).

A perda da flexibilidade dos tecidos está relacionada às ligações cruzadas do colágeno, que provê força estrutural e forma ao tecido (BAILEY; PAUL; KNOTT, 1998). As moléculas de tropocolágeno se agregam, espontaneamente, para formar microfibrila, desde a pequena forma tensil até a formação das ligações cruzadas, entre as moléculas adjacentes do tropocolágeno e microfibrilas adjacentes.

A formação das ligações cruzadas envolve mecanismos diferentes. O enzimático, que ocorre durante o desenvolvimento e a maturação e o não enzimático, extrínseco, com glicose (BAILEY, 2001). São essas ligações cruzadas que se encontram mais diretamente relacionadas ao processo de “aging”, alterando as propriedades do colágeno, modificando os tecidos e repercutindo em doenças como osteoporose e diabetes.

Uma modificação incomum é o aumento da isomerização do colágeno, mostrada pela análise direta de aminiácidos no tecido (BAILEY, 2001).

1.5 A matriz extracelular

A MEC pode ser definida como sendo um conjunto complexo de macromoléculas, que apresentam uma diversidade bioquímica e morfológica, ocupando, em maior ou menor grau, o espaço intersticial, interagindo com seus elementos celulares, desempenhando papel fundamental na fisiologia e na bioquímica dos tecidos (HARALSON, 1993; HAY, 1991).

As funções exercidas pela MEC eram, até há pouco tempo, consideradas de pouca importância: apenas como um componente orgânico inerte. Atualmente, a MEC é reconhecida pela sua importância em praticamente todos os fenômenos teciduais, sendo o substrato sobre o qual as células migram, se proliferam e se diferenciam (STREULI, 1999). A MEC representa um elemento estrutural estável, que provê suporte físico para a manutenção da arquitetura celular, função dinâmica mediada por mecanismos moleculares específicos, que interagem com o citoesqueleto celular. Possui, ainda, diferenças quantitativas e qualitativas, não só entre os diversos tipos de tecidos, mas, também, no próprio tecido. A MEC também está

relacionada à constante regulação e transporte de macromoléculas de seus componentes (“turnover”) (HAY, 1991). Tais eventos dependem de interações específicas, entre células e componentes da MEC, os quais influenciam o comportamento celular e mantêm a cito-arquitetura normal dos tecidos. É constituída por uma rede complexa de macromoléculas, onde os principais componentes são colágeno, elastina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e glicoproteínas (HARALSON, 1995 e HAY, 1991).

Mudanças recentes, que ampliam o conhecimento das funções da MEC, mostram sua possível relação com o desenvolvimento e a manutenção dos tecidos periodontais.

Segundo Ingram et al (1993) os componentes não colágenos da MEC participam de todos os mecanismos regulatórios que requerem interferência da matriz sobre a dinâmica celular. Sendo assim, alterações, nas relações entre as células e a MEC, podem interferir na integridade dos tecidos (MARTINEZ e ARAÚJO, 2004).

A composição da MEC dos tecidos conjuntivos compreende um grande grupo de proteínas fibrosas (colágeno e elastina), embebidas em um gel hidrofílico de polissacarídeos, associados ou não a glicoproteínas. As proteínas não fibrilares se subdividem em: a) glicoproteínas alongadas (fibronectina, laminina, tenascina, integrinas e outras), responsáveis pela aderência entre as células e a matriz e, ainda, outras interações; b) proteoglicanos, glicosaminoglicanos e outros eventuais componentes, como fatores de crescimento, citocinas, hormônios nutrientes e minerais que completam o tecido conjuntivo.

1.6 O colágeno

O Colágeno é uma proteína estrutural importante na vida dos vertebrados e corresponde a 25% de toda proteína do corpo humano, ou seja, 6% do peso corporal (IOZZO, 1998). Está presente na maioria dos tecidos (ossos, cartilagens, pele, veias, órgãos, gengiva, entre outros), conferindo integridade funcional e estrutural a esses. Como resultado do processo de síntese, são formados 19 tipos diferentes de cadeias alfa, que, por associação, em forma de trímeros, dão origem a, pelo menos, 27 tipos de colágenos (MYLLYHARJU e KIVIRIKKO, 2004); sendo o colágeno tipo 1 o mais abundante no corpo humano (IOZZO, 1998). 90% da matéria orgânica é formada por colágeno do tipo 1 e 3% do tipo V, cuja função ainda não é conhecida (GOLDBERG e SMITH, 2004).

A função do colágeno é manter a integridade estrutural do tecido e conferir-lhe resistência mecânica. As diferentes propriedades desses tecidos são, em parte, devido ao resultado de diferentes organizações das fibras de colágeno. Sua principal característica é a formação de fibras insolúveis com alta força elástica. Além de seu papel estrutural nos tecidos, o colágeno possui a função de orientar tecidos em desenvolvimento (BURGESON, 1987).

Ele está presente em vários tecidos, como pele, tendão, cartilagem, osso e gengiva. Representa, nos mamíferos, aproximadamente 25% das proteínas. Aproximadamente a metade do colágeno, presente no corpo humano, está localizada na pele (LEE; SINGLA; LEE, 2001).

A estrutura das moléculas de colágeno é que vai caracterizar a função dos vários tipos de tecido. Os principais grupos são os do tipo I,II,III e IV. O colágeno do tipo I é produzido pelos fibroblastos, conferindo a derme, tendões, ossos e pigmentos um grau de polimerização máxima, dando a esses tecidos a propriedade de resistir a tensões. O colágeno do tipo II é produzido pelos condrócitos, conferindo, às cartilagens, pequena polimerização das fibrilas, conferindo a propriedade de resistir à pressão. O colágeno do tipo III é produzido pelas células dos músculos lisos e células reticulares, conferindo ao músculo liso, tecido hematopoiético e nervos as suas propriedades, devido à média polimerização de suas finas fibrilas (JUQUEIRA e CARNEIRO, 2000).

Atualmente são conhecidos 27 tipos diferentes de colágeno (BOOT-HANDFORD e TUCKWELL, 2003), quimicamente distintos, que estão presentes nos vários tecidos. Todas as moléculas de colágeno contêm três cadeias α , que apresentam a seqüência Gly-X-Y se repetindo ao longo das cadeias. Em alguns tipos de colágeno, todas as cadeias α são idênticas, enquanto que, em outros, há duas ou três cadeias diferentes formando a hélice tripla.

Os colágenos do tipo I, II, III, V e XI são formados por três cadeias em hélice tripla contínua, enquanto os do tipo IX, XII, e XIV contêm cadeias pequenas e alguns domínios não helicoidais (LEE; SINGLA; LEE, 2001).

O Colágeno tipo I é formado por três cadeias α , sendo duas cadeias α_1 e uma cadeia α_2 , que se entrelaçam para formar uma estrutura chamada *tripla hélice* (CHAPMAN; TZAPHLIDOU; MEEK, 1990). Nas duas extremidades, dessa região helicoidal, há uma região não helicoidal, designada *telopeptídeo C-terminal e N-terminal*. Cada cadeia α é

formada por uma seqüência de aminoácidos, que representam uma glicina (Gly), em cada terceiro resíduo da cadeia, caracterizando, no Colágeno, uma estrutura tripla repetitiva, assumindo a forma: Gly – X – Y, onde X e Y podem ser Prolina(Pro) Hidroxiprolina(HYP) ou outro aminoácido, que pode ter natureza ácida, básica ou hidrofílica (BAILEY, 2001). As cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ apresentam 1056 e 1035 resíduos de aminoácidos, respectivamente, ao passo que, o telopeptídeo C-terminal apresenta 26 resíduos de aminoácidos e enquanto o N-terminal 16 (CHAPMAN; TZAPHLIDOU; MEEK, 1990). Essas fibrilas, após a impregnação, com sais de metais pesados, seguidos da observação pela Microscopia Eletrônica de Transmissão, são caracterizadas pela presença repetitiva de zonas claras e escuras, que formam a unidade estrutural do Colágeno. O modelo fibrilar quarto, alternado, definido por Smith, em 1963, define o tropocolágeno, unidade estrutural da molécula de colágeno (CHAPMAN; TZAPHLIDOU; MEEK, 1990). Essas moléculas, se organizam em número de cinco, de forma escalonada e alternada, em $\frac{1}{4}$ de seu comprimento, formando a microfibrila (KADLER, 1995). Essas microfibrilas se agregam, lateralmente e longitudinalmente, por um processo chamado fibrinogênese (WEINSTEIN e BUCKWALTER, 2000), formando as fibras de colágenos, que são mantidas por ligações cruzadas intermoleculares (ou interfibrilares) e intramoleculares (ou intrafibrilares) e, também, por interações eletrostáticas, que conferem estabilidade a essas moléculas (BAYLE *et al.*, 1998).

O Colágeno tipo I é o componente da MEC mais abundante. É comum ser encontrado no tecido conjuntivo periodontal, provendo o suporte mecânico na ligação do dente ao osso e à gengiva. (KADLER, 1995). Nos tecidos moles, atribui-se ao Colágeno a importante função mecânica de manter a forma dentro de limites que permitam o funcionamento normal do organismo ou do tecido, sob a ação de qualquer força que tente modificá-la (KADLER, 1995). Fibras colágenas possuem a função de mediar as forças mecânicas, entre os dentes e os tecidos, ao redor do mesmo e das células, regulando a remodelação “turnover” do ligamento periodontal e o osso. O Colágeno regula, ainda, a função celular, provisionando o substrato, para adesão e migração, e mediando a sinalização de eventos, através da ligação à receptores de superfície celular específicos (VOGEL, 2001).

A relação de “turnover” do Colágeno, na gengiva e no ligamento periodontal, é a mais rápida do corpo (SVOBODA; SHIGA; DEPORTER, 1981; SODEK; FERRIER, 1988), indicando a necessidade de uma rápida remodelação para suportar as demandas funcionais.

A organização do Colágeno parece ser crítica para a manutenção e a defesa dos

tecidos periodontais e alterações nas fibrilas colágenas podem predispor a doenças periodontais. A regulação da fibrinogênese do Colágeno tipo 1 é feita em vários níveis *in vivo*, envolvendo mecanismos celulares independentes e dependentes, incluindo a própria fabricação de monômeros procolágenos, por secreção, e a mediação celular de fibrinogênese, requerendo fibronectina (VELLING *et al.*, 2002). Além disso, a fibrinogênese é regulada por outras moléculas da matriz extracelular. Os pequenos proteoglicanos, ricos em leucina (SLRPs, do inglês: Small leucine-rich proteoglycans) compreendem um grupo de pelo menos 13 diferentes genes, produzidos na MEC dos tecidos. São proteoglicanos, proteínas não colágenas, compostos de um núcleo central e de uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos. A diferenciação das SLRPs se faz pela presença de um núcleo central, contendo uma ou mais repetição de leucina. Esse núcleo é responsável pela maioria das atividades funcionais dessas moléculas. Os membros da família SLRP se diferenciam, segundo números de repetição de leucina, aminoácidos substituídos e glicosilação. (IOZZO, 1997). Os quatro membros principais são: decorin, biglican fibromodulin e lumican. A presença dos SLRP no tecido conjuntivo parece limitar o crescimento das fibras colágenas, em diâmetro, e influenciar a interação com outros componentes da matriz, participando não somente da construção da MEC, mas, também, do controle da proliferação celular e da morfogênese tecidual (SCOTT, 1988). Os SLRPs têm sido identificados através da interação com colágenos do tipo I, II, e IV, além de fibronectina e TGF- β (SCHONHERR *et al.*, 1995).

1.7 Síntese da matriz não colagênica

As proteínas não fibrilares da MEC subdividem-se em: 1) glicoproteínas alongadas (destacando-se fibronectina, laminina, tenascina integrinas), responsáveis pela aderência entre as células e a matriz e outras interações; 2) proteoglicanos, glicosaminoglicanos e outros componentes eventuais, como fatores de crescimento, citocinas, hormônios, nutrientes e minerais, completando o conjunto supramolecular (IOZZO, 1998).

Os proteoglicanos são macromoléculas complexas encontradas em todos os tecidos. Sua estrutura é constituída por um corpo protéico central alongado, no qual se inserem, por ligação covalente, uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos. A carga elétrica dessas moléculas é altamente negativa e responsável por regular uma variedade de funções no tecido,

tais como: fibrilogênese, organização dos feixes colagênicos, modulação da atividade de fatores de crescimento, angiogênese, aderência celular e retenção hídrica (IOZZO, 1998).

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são polímeros lineares de dissacarídeos. Sua estrutura molecular contém, sempre e invariavelmente, uma hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina) e um ácido hexurônico (glucurônico ou idurônico) ou uma galactose, em seqüência não ramificada, que apresenta substituições de grupamentos sulfato em várias posições da cadeia polissacarídica (CARNEY; MUIR, 1988).

Os GAGs subdividem-se em quatro famílias, de acordo com a estrutura química de seus dissacarídeos: a) ácido hialurônico; b) condroitin sulfato e dermatan sulfato, c) queratan sulfato, d) heparan sulfato e heparina. Esses últimos têm a mesma estrutura básica de dissacarídeos poliméricos e sua diferenciação se deve à grande variedade de funções desempenhadas por cada um deles, de maneira independente e, em algumas situações, de forma conjunta.

Com exceção do ácido hialurônico, os demais GAGs encontram-se ligados a um corpo protéico, compondo a ampla variedade de proteoglicanos. A presença de radicais carboxila e sulfato (com exceção feita ao ácido hialurônico e à heparina) constitui o fator responsável pela carga negativa elevada dos GAGs, mantenedora de sua grande atratividade por cátions e hidrofília. Além disso, interações dos grupamentos ácidos, dessas moléculas, com radicais básicos do colágeno também exercem grande importância estrutural na MEC como um todo (CARNEY; MUIR, 1988).

No tecido gengival, as famílias condroitin sulfato, heparan sulfato, dermatan sulfato e ácido hialurônico foram identificadas por Bartold (1987). Posteriormente, proteoglicanos do tipo decorin, biglican, versican e perlecan foram caracterizados nesse tecido (BARTOLD, 1995; GNOATTO *et al.*, 2003; HAASE *et al.*, 1998; LARJAVA; HAKKINEN; RAHEMTULLA, 1992).

A grande variedade de proteoglicanos com estruturas constituídas por diferentes corpos protéicos e por diferentes famílias, tamanhos e números de GAGs certamente contribui para as distintas funções biológicas, atribuídas a esses compostos. O GAG heparina, entre as funções diversificadas que exerce, regula o metabolismo de glicoproteínas, como a trombina e o plasminogênio, que estão presentes nas membranas basais e acredita-se que desempenhem importantes funções no controle do fenótipo celular e angiogênese (BAR-SHAVIT *et al.*,

1993).

A interação dos proteoglicanos com substâncias específicas da MEC, de cada um dos tecidos de que lhe fazem parte, modula qualitativa e quantitativamente essas funções. Assim, a atividade, de cada um dessas macromoléculas, está relacionada não só à sua estrutura molecular, mas, também, com sua localização (HARDINGHAM; FOSANG, 1992).

Inicialmente, os proteoglicanos eram classificados com base nos GAGs que os compunham (POOLE, 1986), de modo que sua nomenclatura consistia na identificação da cadeia predominante nessas moléculas (por exemplo, proteoglicanos dermatan sulfato). A elaboração cada vez mais aprimorada das metodologias ligadas à biologia molecular permitiu o conhecimento das seqüências de aminoácidos dos corpos protéicos, de diversos proteoglicanos. Dessa forma, a classificação dos proteoglicanos passou a estar mais relacionada à composição protéica do corpo central ou à localização dessas macromoléculas ao tecido (HARDINGHAM; HENG; GRIBBON, 1999). Com base no último aspecto, os proteoglicanos são classificados em extracelulares (ou de MEC), de superfície celular e intracelular.

Os proteoglicanos extracelulares são organizadores da MEC e subdividem-se em interfibrilares (ou hialectanos), fibrilares (pequenos proteoglicanos ricos em leucina) e de membrana basal (IOZZO, 1998). Os interfibrilares localizam-se entre as malhas formadas pelos feixes de fibrilas colagênicas, configurando agregados de grande massa molecular que promovem pontes entre as células e a MEC. Destacam-se, nessa sub-classe os proteoglicanos dos tipos versicam, agrecam, neurocam e brevicam.

Os proteoglicanos fibrilares estão conectados por ligações covalentes às fibras e fibrilas colágenas, não formando agregados, possuindo regiões ricas em leucina e pequena massa molecular. Sua função principal está relacionada à fibrilogênese e à organização dos feixes colagênicos. Seus principais representantes são decorim, biglicam, fibromodulim e lumicam, tendo destaque nos tecidos periodontais (BARTOLD, 1995; HAASE *et al.*, 1998; LARJAVA; HAKKINEN; RAHEMTULLA, 1992).

Os proteoglicanos da membrana basal têm como principal representante o PG heparan sulfato, denominado perlecam, possuem grande massa molecular e são encontrados na maioria das membranas basais epiteliais e vasculares do organismo humano (MOHAN e SPIRO, 1991). Predominantemente do tipo heparan sulfato, podem, também, caracterizar-se

por possuir domínio(s) condroitin sulfato e, raramente, dermatan sulfato, como foi observado em estudo recente por Knox *et al.* (2005). Além de fornecer suporte estrutural à interface que separa os distintos tecidos, esse PG funciona como um arcabouço estrutural que guia e regula a angiogênese, mediante fatores de crescimento como o bFGF (WHITELOCK *et al.*, 1996).

Os proteoglicanos de superfície celular incluem a família dos sindecans e o betaglicam. Além desses, compreendem as famílias dos glipicans, CD44, a serglicina e a trombomodulina.

A família dos sindecans é constituída por quatro diferentes tipos conhecidos, expressos em uma variedade de células. Apresentam domínios intracelulares, transmembrânicos e extracelulares, sendo que, entre os últimos, são encontrados sítios de ligação aos GAGs sensíveis a diversas proteases (BERNFELD *et al.*, 1992). Assim como o perlecan, são proteoglicanos do tipo heparan sulfato e ligam-se por sua alta afinidade e por sua especificidade (CHERNOUSOV e CAREY, 1993), ao colágeno, à fibronectina, à trombospondina e à tenascina. Os GAGs, constituintes dos sindecans, variam de acordo com o tipo.

O betaglicam é também denominado receptor de fator de crescimento, transformador beta tipo III (TGF- β tipo III) e contém cadeias, tanto de heparan sulfato, quanto de condroitin sulfato (CHEIFETZ e MASSAGUE, 1989). Esse PG é encontrável na maioria das células do organismo e sua ligação ao fator de crescimento, ocorre em face de ser o seu corpo protéico. Suas cadeias de heparan sulfato ligam-se, por sua vez, ao fator de crescimento básico de fibroblastos – bFGF (LOPEZ-CASILLAS, WRANA e MASSAGUE, 1993). O betaglicam atua, portanto, como um importante reservatório de fatores de crescimento e suas funções relacionam-se, de certa maneira, aos sindecans.

A investigação sobre o componente não colagênico da MEC iniciou-se com as observações histológicas a partir de um acúmulo significativo de proteoglicanos e GAGs, em associação com os componentes colagênico e vascular aumentados (MARIANI *et al.*; 1993).

Outros estudos analisaram os GAGs, semiquantitativamente, no intuito de elucidar a sua participação na matriz alterada. São encontrados, na literatura, poucos trabalhos quantificando diretamente esses compostos, a partir de sua extração do tecido.

O primeiro deles foi publicado por Bartold (1989), analisando a incorporação de

prolina triçada por fibroblastos estimulados com Condroitin sulfato A. O autor não constatou aumento significativo na síntese de proteína e proteoglicanos. Barber, Savage e Seymour (1992), em um estudo similar, chegaram às mesmas conclusões.

Willershausen, Lemen e Schumacher (1992) verificaram que a CsA promoveu um aumento da síntese total de GAGs, em especial do ácido hialurônico, por fibroblastos gengivais, cultivados por 72 horas, bem como a longo prazo (6 semanas). Entretanto, esse aumento não foi proporcional à proliferação celular, representando, na verdade, um declínio relativo dessa matriz.

Mariotti *et al.* (1998) observaram a síntese de colágeno, diminuída em 37% pelos fibroblastos gengivais, estimulados com CsA, apesar de a síntese de proteína total permanecer inalterada, sugerindo a existência de aumento na proporção de matriz não colagênica.

Outros estudos, nessa linha de pesquisa, identificaram forte influência das condições de cultivo em análise da biossíntese. Zebrowski *et al.* (1994), analisando a incorporação de glicosamina triçada à MEC depositada, constataram que a exposição à CsA aumentava genericamente a síntese de GAGs por fibroblastos gengivais normais e, simultaneamente, de uma única linhagem, oriunda de um indivíduo diabético com CG induzido por CsA e nifedipina.

Newell e Irwin (1997) verificaram que a heterogeneidade entre as três linhagens de fibroblastos, derivados de CG induzido por CsA, e a estimulação das culturas com o fármaco promoveu um aumento na síntese de GAGs, restrito a duas das três linhagens e às culturas subconfluentes apenas. Recentemente, Stabellini *et al.* (2004) verificaram o componente de GAGs totais e frações sulfatadas, em maior quantidade, no CG induzido por CsA, em comparação com controles não afetados, em análise de microscopia eletrônica de transmissão e de biossíntese em culturas de fibroblastos. Entretanto, a suscetibilidade genética, inerente à linhagem do fibroblasto, também é ressaltada por esses autores e talvez possa justificar a grande variabilidade entre os estudos relatados.

Rocha *et al.* (2000) analisaram, por eletroforese e densitometria, a quantidade dos GAGs, em quatro indivíduos com CG induzido por CsA, após o seu isolamento por reação enzimática do tecido biopsiado. Não encontraram diferença em relação aos controles de gengiva normal. Posteriormente, analisaram a composição e a distribuição de peso molecular desses GAGs, comparativamente ao CG induzido por nifedipina e à gengiva normal, não

encontrando diferenças entre eles (MARTINS *et al.*, 2003).

Outros estudos publicados analisaram a síntese de GAGs por fibroblastos gengivais em culturas estimuladas pela CsA.

Vários estudos analisaram os GAGs, segundo técnicas semiquantitativas, tentando avaliar a sua participação na patogênese da doença periodontal ou as alterações da MEC. A literatura relaciona poucos trabalhos, que quantificam os componentes da MEC, de forma direta, a partir da extração de tecido em humanos.

2 OBJETIVO

Caracterizar a concentração do colágeno total, no tecido gengival humano considerado clinicamente sadio, em indivíduos com diferentes faixas etárias.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Após submeter o projeto de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa HUPE/UERJ “processo 380-CEP/HUPE” e ter sido aprovado em 02/05/2001 (Anexo-A) foram obtidas 28 amostras de pacientes homens com idade ($30,01 \pm 18,7$) variando entre 10 e 78 anos, sendo todos os pacientes clinicamente saudáveis. Os indivíduos que aceitaram participar do estudo, assinaram o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) (ANEXO B). Os participantes não eram fumantes e não tinham utilizado nenhum tipo de antibiótico durante os 6 meses anteriores à realização da pesquisa.

Os indivíduos foram, então, avaliados e os sítios considerados saudáveis, quando apresentaram Profundidade de Bolsa a Sondagem (PBS) <3 mm, Índice gengival (IG) (SILNESS E LOE, 1963) <1 , Índice de Placa (IP) (LOE E SILNESS, 1963) <1 . Após a avaliação, as biópsias foram removidas da região palatina do primeiro molar (Fig. 1). Todos os pacientes tiveram indicação cirúrgica para fins protéticos. Foram realizados retalhos de Widman modificado (LINDE, 2005) ou retalho reposicionado apicalmente (LINDE, 2005). As extrações de elementos dentários tinham indicação ortodôntica ou cirúrgica.

Após anestesia troncular a distância, com agulha média (B-D ®, Juiz de Fora, Brasil) e anestésico Lidocaina 2% (DFL ®, Rio de Janeiro, Brasil), os tecidos foram removidos com a incisão em forma de bisel interno, na crista gengival, até o tecido ósseo, utilizando uma lâmina de bisturi (Bard Parker número 15, tipo BD®, Rio de Janeiro, Brasil) e descoladas do dente com uma incisão paralela a 1 mm do mesmo, com objetivo de não incluir o epitélio juncional. Os tecidos foram coletados e armazenados, em acetona, sendo, uma outra amostra, fixada em formol tamponado. Foi utilizado um gengivótomo de Kirkland número 15 (Hu-Friedy ®, EUA) para auxiliar a remoção do tecido. As incisões foram suturadas com fio de seda Ethicon 4.0 (Ethicon - Johnson & Johnson ®).

Todas as amostras de tecidos foram fixadas em formol, impregnadas com parafina, cortadas e coradas com Hematoxilina e Eosina, para serem analisadas de acordo com a integridade do tecido. Essa técnica de coloração revelou a integridade estrutural do epitélio e o estado do infiltrado inflamatório das biópsias.

3.1 Coloração de rotina

Após fixado em formol 10% (pH 7.2), por mais de 24 horas, a 4°C, o tecido foi desidratado em álcoois com concentrações crescentes. A clarificação foi obtida através de dois banhos sucessivos em xilol, após o material ser imerso em dois banhos sucessivos de parafina, de uma hora cada, em estufa, com temperatura regulada em 58°C e, imediatamente, incluído em parafina. Os cortes foram feitos em micrótomo rotativo tipo Minot (American Optical 820 Rotary® EUA) com 5µm de espessura, montados em lâminas e corados pelas seguintes técnicas: Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Gomori (BANCROFT e COOK, 1994) Picrosirius (JUNQUEIRA, BIGNOLAS, BRENTANI, 1979) e Fucsina e Resorsina de Weigert com oxidação previa (BANCROFT e COOK, 1994).

3.2 Aquisição e análise das imagens

As imagens foram obtidas utilizando magnificação final de 40X, 100X, 200X, e 400X, utilizando-se um microscópio Olympus BX51 (fabricante), conectado a uma máquina fotográfica Olympus DP70 (12.5 megapixels) e um microcomputador, no qual as imagens foram digitalizadas, através do software Image Pro-plus (Media Cybernetics, USA), com resolução 2040 x 1536 pixels.

3.3 Concentração de colágeno total

A concentração tissular de colágeno total foi determinada pela dosagem do aminoácido hidroxiprolina. Amostras de tecido seco e delipidado foram hidrolisadas em HCl 6N por 18 h a 118°C (CARDOSO et al., 1992), e, em seguida, feita a dosagem colorimétrica da hidroxiprolina de acordo com o método de Bergman e Loxley (CARDOSO *et al.*, 1992). O resultado final foi expresso em microgramas de hidroxiprolina por miligrama de tecido seco.

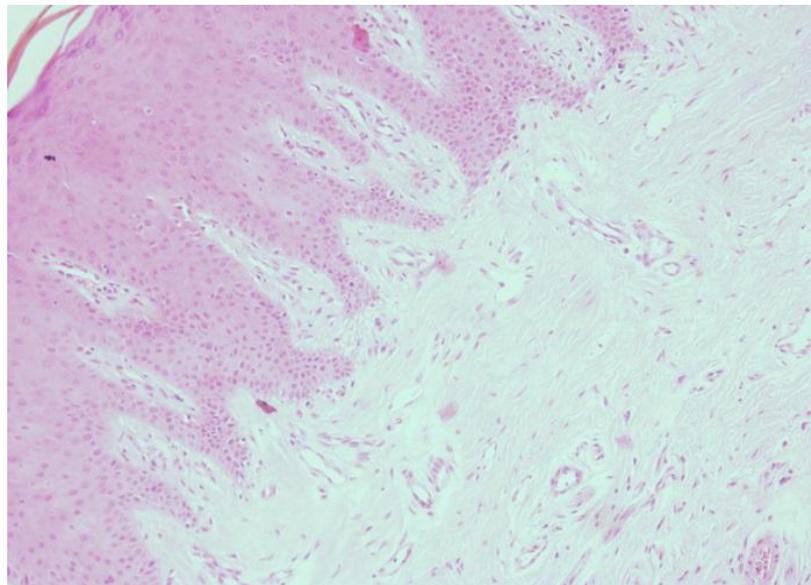
3.4 Análise estatística

A existência de correlação entre $\mu\text{g OH-pro/mg}$ e a idade foi determinada pelo cálculo do coeficiente de correlação linear, seguido por um teste T, para definir esse coeficiente, como descrito por Sokel e Rohlf (1995). A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$. Para comparar os dados quantitativos, o teste Mann-Whitney foi usado e considerado significativo quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram feitas no programa SPSS 11.0.

4 RESULTADOS

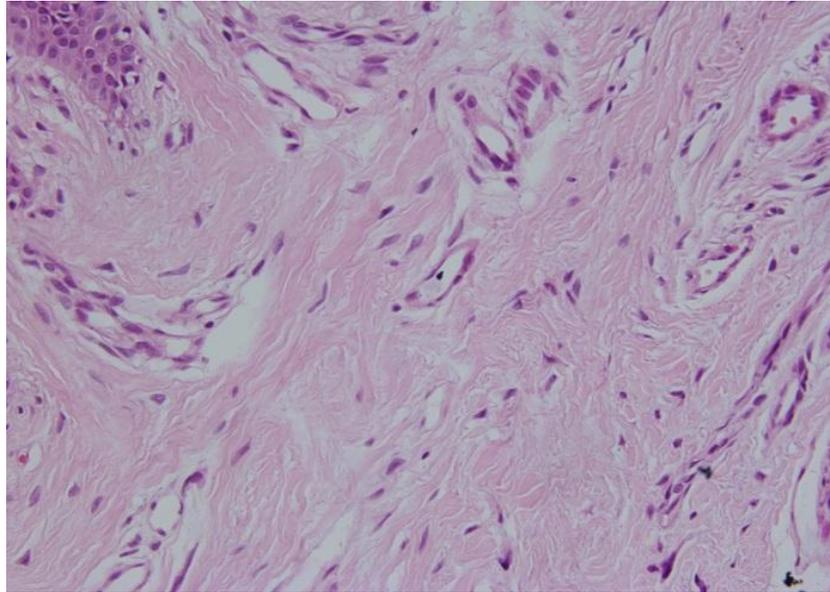
A avaliação histológica mostrou inflamação gengival, em todos os campos dos tecidos avaliados. As figuras 1 a 6 mostram fotomicrografias de gengiva humana clinicamente sadia de uma mesma espécie, com as seguintes colorações e magnificação: HE, 200X; HE 400X, PICR 400X; TRIC 400X; WEIG 400X; WEIG 400X. O tecido apresenta-se bem preservada, com as estruturas teciduais organizadas, onde se pode visualizar a integridade do epitélio, suas interdigitações papilares e o estroma conjuntivo com presença de vasos sanguíneos e alguma reação inflamatória. A análise das lâminas coradas com Picrosirius e Fucsina e Resorsina de Weigert, com oxidação prévia nos campos aleatoriamente escolhidos, não foi possível visualizar fibras do sistema elástico próximas ao epitélio, ocorrendo nas proximidades de vasos (ver figura 5).

Figura 1 - Fotomicrografia de uma biópsia considerada clinicamente normal mostrando o estado inflamatório com presença de vasos. HE 200X.



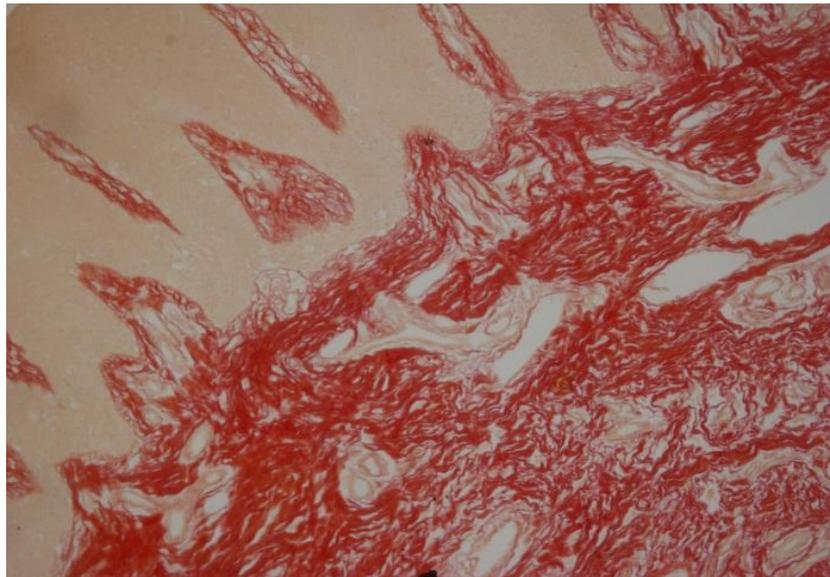
Fonte: o autor, 2008.

Figura 2 - Corte anterior mostrado em um aumento maior. Pode-se visualizar a presença de vasos e a integridade do tecido. HE 400X.



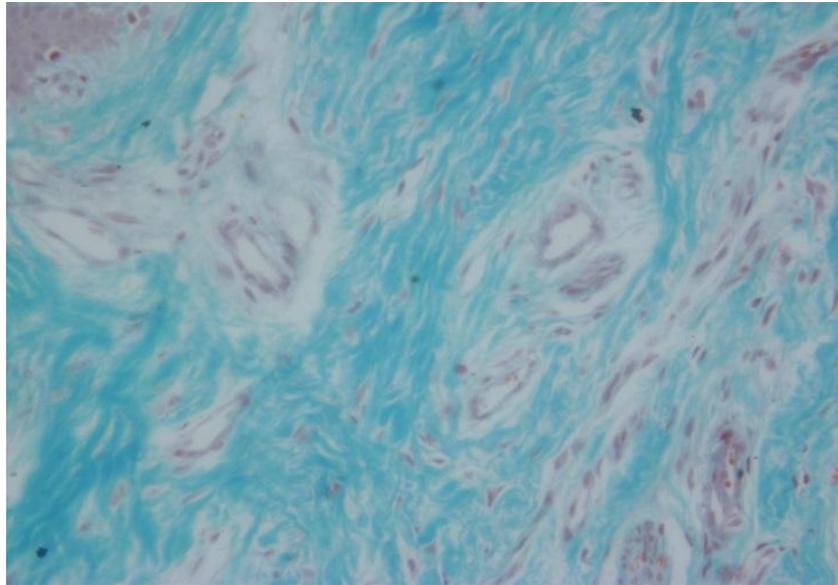
Fonte: O autor, 2008.

Figura 3 - Fotomicrografia da mesma biópsia mostrando os feixes de colágeno sugestivo 1 e 3 na região próxima ao epitélio. Presença de vasos sanguíneos. PICR 400X.



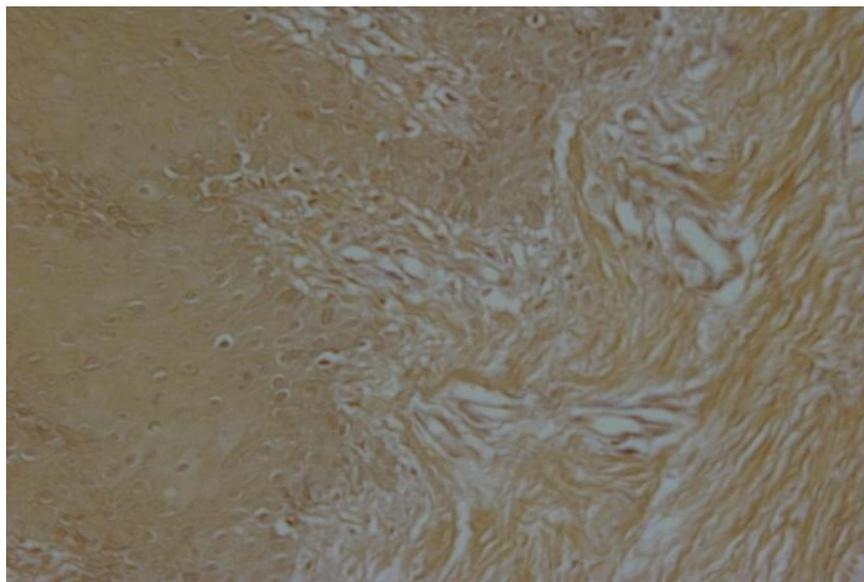
Fonte: O autor, 2008.

Figura 4 - Fotomicrografia da mesma biópsia mostrando os feixes de colágeno na região próxima ao epitélio. Presença de vasos sanguíneos. TRIC 400X.



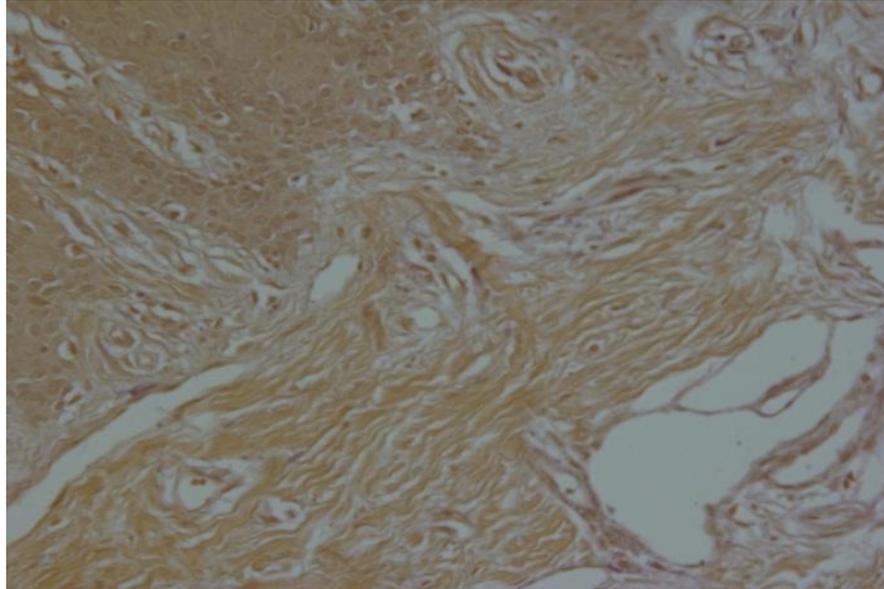
Fonte: O autor, 2008.

Figura 5 - Fotomicrografia da mesma biópsia mostrando os feixes de colágeno na região próxima ao epitélio. Presença de vasos sanguíneos fina marcação para fibras elásticas ao redor dos vasos. Ausência de marcação para fibras elásticas próximo ao epitélio. WEIG 400X.



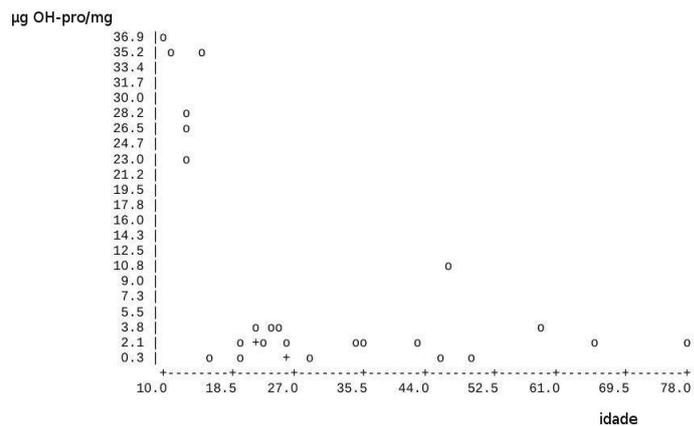
Fonte: O autor, 2008.

Figura 6 - Campo próximo ao da figura 5. Presença de vasos sanguíneos marcação (em roxo) para fibras elásticas ao redor dos vasos. Ausência de marcação para fibras elásticas próximo ao epitélio. WEIG 400X.



Fonte: O autor, 2008.

Gráfico 1 - Correlação entre concentração de hidroxiprolina e a idade ($p < 0,01$).



Fonte: O autor, 2008.

Tabela 1 - Desvio padrão entre a concentração de Hidroxiprolina e do peso seco das biópsias em diferentes grupos de idade.

Idade	n	µg OH-pro/mg (DP)	peso seco (DP)
<15	06	30,71 (5,87)*	5,51 (0,75)
16 a 35	14	1,67 (1,07)	11,05 (15,45)
> 35	08	2,98 (3,15)	9,81 (6,19)

* $p < 0,05$, quando comparado aos grupos 16 a 35 e > 35 anos.

Fonte: O autor, 2008.

A Tabela 1 mostra a idade, a concentração de hidroxiprolina, expressa em µg/mg de peso seco e o peso seco das biópsias com as médias aferidas. Houve uma concentração de hidroxiprolina significativamente maior no grupo de pacientes com idade <15 anos, quando comparada aos valores observados para os indivíduos entre 16 e 35 anos e pacientes com idade superior a 35 anos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre pacientes com idades entre 16 e 35 e pacientes com idade superior a 35 anos.

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que a concentração de hidroxiprolina, um marcador da quantidade total de colágeno, foi significativamente maior em indivíduos com periodonto clinicamente saudável, com idade menor que 15 anos, quando comparado a indivíduos com idades superiores. Akalin *et al* (1992), estudando os níveis de hidroxiprolina em fluido gengival e tecido gengival de indivíduos saudáveis, utilizaram uma amostra pequena, de apenas 15 pacientes, sendo nove mulheres, com idades entre 13 e 29 anos. Os autores concluíram que a concentração de hidroxiprolina, em idade mais nova é maior que na idade adulta, em tecidos gengivais, porém consideraram uma variação de idade muito pequena. O presente estudo utilizou uma amostra mais expressiva, em relação aos diferentes grupos de idade, mostrando que realmente a concentração de hidroxiprolina é maior no grupo de idade que compreende a pré-puberdade, quando comparado a adultos jovens e idosos. Além disso, o presente estudo incluiu apenas homens. A alteração hormonal feminina, durante o ciclo menstrual, altera o metabolismo do colágeno (MAROCLO *et al.*, 2005). No presente estudo, não houve diferença entre os grupos de idade, compreendidos pelos adultos jovens, adultos e idosos, fato também demonstrado em pele humana (WALLER E MAIBACK 2006). Estudos em outros tecidos demonstraram tendência semelhante a observada no presente estudo. A expressão de hidroxiprolina diminui de acordo com a idade na pele (GOGLY *et al.*, 1997), no corpo cavernoso de pênis (BASTOS, SAMPAIO e CARDOSO, 2005) e na próstata (BABINSKI *et al.*, 2007). Nesses estudos, a expressão de hidroxiprolina diminuiu de acordo com a idade, alcançando sua expressão máxima na infância.

Estudos “*in vitro*”, como o de Mariotti *et al* (1993), discutem as mudanças nas células gengivais humanas, durante o envelhecimento, e descrevem que o efeito da idade, na proliferação celular, não é significante entre os grupos de adultos e idosos. O efeito da idade no fenótipo de secreção das células, na produção de colágeno, não difere entre essas idades, diferentemente das proteínas não colágenas que possuem uma significativa redução de produção. O presente estudo “*in vivo*” confirma o anterior, pois não houve variação significativa entre os indivíduos que compreendem a faixa de adultos e idosos.

As dificuldades para a obtenção de um tecido gengival clinicamente saudável e sua respectiva validação, através de técnicas de análise morfológica e morfométrica, são

evidenciadas por diferentes autores. Gogly *et al.* (1997), analisando parâmetros morfométricos de gengivas, reconhecem essa dificuldade. Page e Schroeder (1976) descrevem o estado inflamatório dos tecidos gengivais/periodontais, durante desenvolvimento da doença gengival/periodontal. Bartold *et al* (2000) descreve os estados inflamatórios em sua revisão “A Biologia Celular e Molecular da Gengiva”. Baseado nessas premissas, após avaliação histológica do tecido gengival, em todos os campos dos cortes histológicos avaliados aleatoriamente, foram excluídas, do presente estudo, aquelas que apresentavam alterações vasculares e um intenso infiltrado inflamatório, quando considerado o tecido, em fase diferente da fase de gengiva clinicamente saudável, conforme descrito por Page e Schroeder (1976). As análises de colágeno foram realizadas após exclusão dessas amostras. O estado inflamatório do tecido avaliado interfere na expressão de hidroxiprolina e GAG dos tecidos, inclusive alterações hormonais, durante o ciclo menstrual (MAROCLO *et al.*, 2005). Por esse motivo, optou-se por considerar, durante a realização do presente estudo, apenas o material colhido em indivíduos do sexo masculino, como forma de minimizar as alterações existentes em material pertencente ao sexo feminino.

As peças de biópsias não são homogêneas, isso é, possuem quantidade de tecido epitelial e conjuntivo em proporções diferentes, o que afeta as dosagens de hidroxiprolina e GAG total. Por esse motivo as análises de GAG total e fração foram inviabilizadas e abandonadas. Análises clínicas de pacientes vivos, em diferentes idades ficam inviabilizadas, embora fosse possível a sua realização através de autópsias, por meio de exodontias e junto com os dentes fosse retirado uma porção do tecido gengival, possibilitando assim, padronizações como as utilizadas por Berglund; Stigbrand ; Carlsson (1991), em animais. As mensurações volumétricas, realizadas por esses autores, não são viáveis, neste estudo, pois as biópsias não possuem as referências utilizadas anteriormente pelos autores. A limitação de se utilizar autópsias ficaria relacionada às questões bioéticas cada vez mais presentes em nossa sociedade.

Poderia ter sido usada a decapagem, mediante a utilização de ácido forte, conforme descrito por Bartold *et al* (1983), para eliminar a parte epitelial dos tecidos e, assim, obter-se um tecido uniforme, sem a presença de tecido epitelial, onde as dosagens, tanto de colágeno e como GAG seriam unicamente aquelas presentes no tecido conjuntivo da gengiva. No entanto, dessa forma perderíamos a porção colágena presente na membrana basal do epitélio.

A relevância, do presente estudo, deve-se ao fato da determinação das estruturas

normais da matriz extracelular da gengiva humana não terem sido medidas, em diversas idades, não sendo perfeitamente conhecidas as modificações que ocorrem à medida que a idade avança.

A análise das lâminas coradas, (dados não apresentados aqui) com Picrosirius e Fucsina e Resorsina de Weigert, com oxidação prévia, nos campos aleatoriamente escolhidos, revelou poucas fibras do sistema elástico. Poucos campos apresentavam coloração positiva para o sistema de fibras elásticas, quando analisados 400X (figura 5 e 6). Não foi possível a realização de análises morfológicas, em fibras do sistema elástico, dada a existência de poucas amostras, contendo marcação positiva, registradas somente em algumas biópsias, referentes a pacientes que apresentavam menor idade. No tecido conjuntivo periodontal existe determinada quantidade de fibras do sistema elástico, mais conhecidas como fibras elásticas. Em diversas espécies, as fibras oxitalâmicas foram reconhecidas como um componente do sistema de fibras elásticas no ligamento periodontal (TSURUGA *et al.*, 2002). Entretanto, existe pouca informação disponível in “vivo”, mostrando as diferenciações das fibras elásticas em gengivas. As colorações Picrosirius e Fucsina e Resorsina de Weigert com oxidação prévia, são reconhecidas, na literatura, com especificidade para as fibras do sistema elástico, inclusive alguns relatam diferenciações dos tipos de colágeno 1 e 3. Entretanto, em tecidos clinicamente sadios, a que se refere o presente estudo, poucos foram os campos aleatoriamente escolhidos que apresentavam essa marcação na proximidade da lâmina basal. Marcações para fibras do sistema elástico, nesses campos, foram encontradas na proximidade de vasos.

CONCLUSÃO

A concentração de hidroxiprolina, nos tecidos periodontais saudáveis, diminui em adultos jovens e adultos.

No tecido gengival humano existe uma significativa correlação ou associação entre idade e concentração de hidroxiprolina.

REFERÊNCIAS

- AKALIN, F. A.; SENGÜN, D.; RENDA, N.; ERATALAY, K. CAĞLAYAN, G. 1992. Hydroxyproline and total protein levels in gingiva and gingival crevicular fluid in periodontally healthy human subjects. **The Journal of Nihon University School of Dentistry**, Tóquio, v. 32, ussue 3, pp. 172-177, sep. 1992. Doi: 10.2334/josnusd1959.34.172.
- BABINSKI, M. A.; COSTA, W. S.; SAMPAIO, F. J. B.; CARDOSO, L. E. M. Structural organization of fibrous connective tissue in the periacinar region of the transitional zone from normal human prostates as revealed by scanning electron microscopy. **BJU International**, v. 100, ussue 4, pp. 940-944, 2007. Doi: 10.1111/j.1464-410X.2007.07060.x.
- BAILEY, A.J. Molecular mechanisms of agein in connective tissues. **Mechanisms of ageing and development**, Limerik, v. 31, ussue 7, pp. 735-755, 2001. Doi: 10.1016/s0047-6374(01)00225-1.
- BAILEY, A. J.; PAUL, R. G.; KNOTT, L. Mechanisms of maturation and ageing collagen. **Mechanisms of ageing and development**, Limerik, v.106, ussue 1-2, pp. 1-56, 1998.
- BANCROFT, J. D.; COOK, H. C. **Manual of histology techniques and their diagnostic application**. London: Churchill Livingstone, 1994.
- BAR-SHAVIT, R. B.; ESKOHJIDO, Y.; FENTON, J. W.; ESKO, J. D.; VLODAVSKY, I. Thrombin adhesive properties: induction by plasmin and heparan sulfate. **The Journal of cell biology**. New york, v. 123, ussue 5, pp. 1279-1787, Dec 1993. doi: 10.1083/jcb.123.5.1279.
- BARBAGLI, G.; LAZZERI, M. Urethral reconstruction. **Current opinion in urology**, London, v. 16, ussue 6, pp. 391-395, nov. 2006. doi: 10.1097/01.mou.0000250277.44990.ab.
- BARBER, M. T.; SAVAGE, N. W.; SEYMOUR, J. G. The effect of cyclosporin and lipopolysaccharide on fibroblasts: implications for cyclosporin-induced gingival overgrowth. **J Periodontol**, v. 63, ussue 5, p. 397-404, May 1992. doi: 10.1902/jop.1992.63.5.397.
- BARTOLD, P. M. Proteoglycans of the periodontium: structure, role and function. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 22, ussue 6, pp. 431-444, nov. 1987. Doi: 10.1111/j.1600-0765.1987.tb02052.x.
- BARTOLD, P. M.; WIEBKIN, O. W.; THONARD, J. C. Proteoglycans of human gingival epithelium and connective tissue. **The Biochemical Journal**, London, v. 211, ussue 1, pp. 119-127, apr. 1983. Doi: 10.1042/bj2110119.
- BARTOLD, P. M. Turnover in periodontal connective tissues: dynamic homeostasis of cells, collagen and ground substances. **Oral diseases**, Copenhagen, v. 1, ussue, 4, pp. 238-253, Dec. 1995. doi: 10.1111/j.1601-0825.1995.tb00189.x.
- BARTOLD, P. M. Regulation of human gingival fibroblast growth and synthetic activity by cyclosporine-A in vitro. **Journal Periodontal Research**, Copenhagen, v. 24, ussue 5, pp: 314-321, Sep. 1989. doi: 10.1111/j.1600-0765.1989.tb00876.x.

- BASTOS, A. L.; COSTA, W. S.; CARDOSO, L. E.; SAMPAIO, F. J. Collagen and elastic fibers in the penis of human fetuses at 28 weeks post conception. **European Urology**, Basel, v. 36, issue 2, pp. 158-163, aug.1999. Doi: 10.1159/000067988.
- BASTOS, A. L.; SAMPAIO, F. J. B.; CARDOSO, L. E. M. Compositional changes of collagen and glycosaminoglycans in the tunica albuginea and corpus cavernosum from the human penis during the fetal and postnatal periods. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 173, issue 3, pp. 1039-1043, marc. 2005. Doi: 10.1097/01.ju.0000145592.32180.24.
- BERGLUND, E.; STIGBRAND, T.; CARLSSON, S. R. Isolation and characterization of a membrane glycoprotein from human brain with sequence similarities to cell adhesion proteins from chicken and mouse. **Eur J Biochem**, V. 197, issue 2, pp. 549-554, Apr 1991. doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb15943.x.
- BERNFIELD, M.; KOKENYESI, R.; KATO, M.; HINKES, M. T.; SPRING, J.; GALLO, R. L.; LOSE, E. J. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans, **Annual review of cell biology**, Palo Alto, v. 8, pp. 365-393, 1992. doi: 10.1146/annurev.cb.08.110192.002053.
- BOOT-HANDFORD, R. P.; TUCKWELL, D. S. Fibrillar collagen: the key to vertebrate evolution? A tale of molecular incest. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, Cambridge, v. 25, issue 2, pp. 142-151, Feb. 2003. doi: 10.1002/bies.10230.
- BUCALA, R.; TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, V. 87, issue 2, pp. 432-438, Feb 1991. doi: 10.1172/JCI115014.
- BURGESON, R. E. The collagens of skin. **Current problems in dermatology**, Basel, v. 17, pp. 61-75, 1987.
- CARDOSO, L. E. M.; ERLICH, R. B.; RUDGE, M. V. C.; PERAÇOLI, J. C.; MOURÃO, P. A. S. A comparative analysis of the glycosaminoglycans from human umbilical arteries in normal subjects and in pathological conditions affecting pregnancy. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v. 67, issue 5, pp. 588-595, 1992.
- CARNEY, S. L.; MUIR, H. The structure and function of cartilage proteoglycans. **Physiological reviews**, Washington, V. 68, issue 3, pp. 858-910, jul. 1988. doi: 10.1152/physrev.1988.68.3.858.
- CHERNOUSOV, M. A.; CAREY, D.J. J. N-syndecan (syndecan 3) from neonatal rat brain binds basic fibroblast growth factor **The Journal of biological chemistry**, New York, v. 268, issue 22, pp. 16810-16814, Aug 1993.
- CHAPMAN, J. A.; TZAPHLIDOU, M.; MEEK, K. M.; KADLER, K. E. The collagen fibril—a model system for studying the staining and fixation of a protein. **Electron microscopy reviews**, Oxford, v. 3, issue 1, pp. 143-182, 1990. doi: 10.1016/0892-0354(90)90018-n.
- CHEIFETZ, S.; MASSAGUÉ, J. J. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor proteoglycan. Cell surface expression and ligand binding in the absence of

glycosaminoglycan chains. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 264, ussue 20, pp. 12025-12028, jul. 1989.

CONSELHO FEDERAL DE ODONTOLOGIA. Resolução n. 12, 27 de dezembro de 2001. Dispõe sobre a nova especialidade Odontogeriatrics. Brasília, CFO, 27 dez. 2001.

FLEDELIUS, C.; JOHNSEN, A. H.; COOS, P. A.; BONDE, M.; QVIST, P. Characterization of urinary degradation products derived from type I collagen. Identification of a beta-isomerized Asp-Gly sequence within the C-terminal telopeptide (alpha1) region. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 272, ussue 15, pp. 9755-9763, apr. 1997. doi: 10.1074/jbc.272.15.9755.

FREITAS, E. V. PY, L.; CANÇADO, F. A. X.; DOL, J.; GORZONI, M. L. **Tratado de geriatria e gerontologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002.

GEE, W. F.; HOLTGREWE, H. L.; ALBERTSEN, P. C.; LITWIN, M. S.; MANYAK, M. J.; O'LEARY, M. P.; PAINTER, M. R. Practice trends in the diagnosis and management of benign prostatic hyperplasia in the United States. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 154, ussue 1, pp. 205-206, 1995.

GNOATTO, N.; LOTUFO, R. F. M.; TOFFOLETTO, O. MARQUEZINI, M. V. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 74, ussue 12, pp. 1747-1753, Dec 2003. doi: 10.1902/jop.2003.74.12.1747.

GOGLEY, B.; GODEAU, G.; GILBERT, S.; LEGRAND, J. M.; PELLAT, B.; GOLDBERG, M. Morphometric analysis of collagen and elastic fibers in normal skin and gingiva in relation to age. **Clinical oral investigations**, Berlin, v. 1, ussue 3, pp. 147-52. Sep. 1997. Doi: 10.1007/s007840050026.PMID: 9612155.

HAITOGLOU, C. D.; TSILIBARY, E. C.; BROWNLEE, M.; CHARONIS, A. S. Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glycosylated laminin/type IV collagen. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 267, ussue 18, pp. 12404-12407, 1992.

HARDINGHAM, T.; HENG, B. C.; GRIBBON, P. New approaches to the investigation of hyaluronan networks. **Biochemical Society transactions**, London, v. 27, ussue 2, pp. 124-127, Feb 1999. doi: 10.1042/bst0270124.

HELFMAN, J. L.; BADA, J. L. Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 72, ussue 8, pp. 2891-2894, aug. 1975. doi: 10.1073/pnas.72.8.2891.

IOZZO, R.V. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 67, pp. 609-652. 1998. Doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.609.

IOZZO, R. V. The family of small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, London, v. 32, ussue 2, pp. 141-174, 1997. Doi: 10.3109/10409239709108551.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochem Journal**, London, v. 11, ussue 4, pp. 447-455, jul. 1979. Doi: 10.1007/BF01002772.

KADLER, K. Extracellular matrix 1: fibril-forming collagens. **Protein Profile**, London, v. 2, ussue 5, pp. 491–619, 1995.

LARJAVA, H.; HÄKKINEN, L.; RAHEMTULLA, F. A biochemical analysis of human periodontal tissue proteoglycans. **The Biochemical journal**, London, v. 284, (pt 1) (pt 1), pp. 267-274, May 1992. doi: 10.1042/bj2840267.

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International journal of pharmaceutics**, Amsterdam, v. 221, ussue 1-2, pp. 1-22, jun. 2001. doi: 10.1016/s0378-5173(01)00691-3.

LÓPEZ-CASILLAS F.; WRANA, J. L.; MASSAGUÉ, L. Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. **Cell**, Cambridge, v. 73, ussue 7, pp. 1455-1444, jul. 1993.

LOVELL, C. R.; SMOLENSKI, K. A.; DUANCE, V. C.; LIGHT, N. D.; YOUNG, S.; DYSON, M. **The British journal of dermatology**, Oxford, v. 117, ussue 4, pp. 419-428, oct. 1987. doi: 10.1111/j.1365-2133.1987.tb04921.x.

MARIOTTI, A.; HASSELL, T.; JACOBS, D.; MANNING, C. J.; HEFTI, A. F. Cyclosporin A and hydroxycyclosporine (M-17) affect the secretory phenotype of human gingival fibroblasts. **Journal of oral pathology and medicine**, Copenhagen, v. 27, ussue 6, pp. 260-266, 1998.

MARIOTTI, S.; BARBESINO, G.; CATUREGLI, P.; BARTALENA, L.; SANSONI, P.; FAGNONI, F.; MONTI, D.; FAGIOLO, U.; FRANCESCHI, C.; PINCHERA, A. Complex alteration of thyroid function in healthy centenarians. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, New York v. 77, ussue 5, pp. 1130-1134, nov. 1993. doi: 10.1210/jcem.77.5.8077303.

MAROCLO, M. V. O.; PEREIRA, S. D.; SAMPAIO, F. J. B.; CARDOSO, L. E. M. Urinary glycosaminoglycan excretion during the menstrual cycle in normal young women. **The Journal of urology**, Baltimore, v. 173, ussue 5, pp. 1789-1792, may. 2005. doi: 10.1097/01.ju.0000154621.18695.b7.

MARTINEZ, E. F., ARAÚJO, V. C. In vitro immune expression of extracellular matrix proteins in dental pulpal and gingival human fibroblasts. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 37, ussue 11, pp. 749-755, nov. 2004. Doi: 10.1111/j.1365-2591.2004.00864.x.

MYLLYHARJU, J.; KIVIRIKKO, K. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. **Trends in genetics**, Cambridge, v. 20, ussue 1, pp. 33-43, jan. 2004. doi: 10.1016/j.tig.2003.11.004.

NEWELL, J. , IRWIN, C. R. Comparative effects of cyclosporin on glycosaminoglycan synthesis by gingival fibroblasts. **J Periodontol**, v. 68, ussue 5, pp. 443-447, May 1997. doi: 10.1902/jop.1997.68.5.443.

- POOLE, A. R. Proteoglycans in health and disease: structures and functions. **The Biochemical journal**, London, v. 236, issue 1, pp. 1-14, May 1986. doi: 10.1042/bj2360001.
- PURNA, S. K.; BABU, M. Collagen based dressings: a review. **Burns : journal of the International Society for Burn Injuries**, Netherlands, v. 26, issue 1, pp. 54-62, feb. 2000. Doi: 10.1016/s0305-4179(99)00103-5.
- ROYCE, P. M.; BARNES, M. J. Failure of highly purified lysyl hydroxylase to hydroxylate lysyl residues in the non-helical regions of collagen. **The Biochemical journal**, London, v. 230, issue 2, pp. 475-480, sep. 1985. doi: 10.1042/bj2300475.
- RUSSEL, A. L. Epidemology of periodontal disease. **International Dental Journal**, London, v. 17, issue 2, pp. 282-296, 1967.
- SCHÖNHERR, E.; H HAUSSER, H.; BEAVAN, L.; KRESSE, H. Decorin-type I collagen interaction. Presence of separate core protein-binding domains. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 270, issue 15, pp. 8877-8883, apr. 1995. doi: 10.1074/jbc.270.15.8877.
- SCOTT, J. E. Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. **The Biochemical journal**, London, v. 252, issue 2, pp. 313-323, jun. 1988. doi: 10.1042/bj2520313.
- SENSI, M.; PRICI, F.; ROSSI, M. G. De; BRUNO, M. R.; MORANO, S.; CAPUOZZO, E.; MARIO, U. D. Formation and ways of detecting advanced glycation end-products in isolated human glomerular basement membrane and human serum albumin nonenzymatically glycosylated in vitro. **The Journal of diabetic complications**, New York, v. 3, issue 2, pp. 88-91, apr-jun, 1989. doi: 10.1016/0891-6632(89)90017-2.
- SILVA, E. A. da; SAMPAIO, F. J. B.; ORTIZ, V.; CARDOSO, L. E. de M. Regional differences in the extracellular matrix of the human spongy urethra as evidenced by the composition of glycosaminoglycans and collagen. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 167, pp. 2183-2183, 2002.
- SILVA, E. A. da; SAMPAIO, F. J. B.; DORNAS, M. C.; DAMIÃO, R.; CARDOSO, L. E. M. Extracellular matrix changes in urethral stricture disease. **The Journal of Urology**, Baltimore, v.168, issue 2, pp. 805-807, aug. 2002.
- SODEK, J.; FERRIER, J. M. Collagen remodeling in rat periodontal tissues: compensation for precursor reutilization confirms rapid turnover of collagen. **Collagen and Related Research**, Stuttgart, v. 8, issue 1, pp. 11-21, 1988. Doi: 10.1016/s0174-173x(88)80032-3.
- STABELLINI, G.; CALASTRINI, C.; MARIANI, G.; GIOIA, M.; CARAMELLI, E.; GAGLIANO, N.; DELLAVIA, C.; MOSCHENI, C.; VIZZOTTO, L.; CALVI, E. M. Extracellular glycosaminoglycan changes in healthy and overgrown gingiva fibroblasts after cyclosporin A and cytokine treatments. **J Oral Pathol Med**, Oxford, v. 33, issue 6, pp. 346-353, jul. 2004. 2004. doi: 10.1111/j.1600-0714.2004.00217.x.
- SVOBODA, E. L.; SHIGA, A.; DEPORTER, D. A. A stereologic analysis of collagen phagocytosis by fibroblasts in three soft connective tissues with differing rates of collagen

turnover. **The Anatomical Record**, New York, v. 199, ussue 4, pp. 473-480, apr.1981. Doi: 10.1002/ar.1091990404.

TARSIO, J. F.; REGER, L. A.; FURCHT, L. T. Molecular mechanisms in basement membrane complications of diabetes. Alterations in heparin, laminin, and type IV collagen association. **Diabetes**, New York, v. 37, ussue 5, pp. 532-539, may 1988. doi: 10.2337/diab.37.5.532.

VELLING, T.; RISTELI, J.; WENNERBERG, K.; MOSHER, D. F.; JOHANSSON, S. Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins alpha 11beta 1 and alpha 2beta 1. **The Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, ussue 4, pp. 37377-37381, Oct. 2002. Doi: 10.1074/jbc.M206286200.

VOGEL, W. F. Collagen receptor signaling in health and disease. **European Journal of Dermatology**, Montrouge, v. 11, ussue 6, pp. 506–514, nov-dec. 2001.

WHITELOCK, J. M.; MURDOCH, A. D.; IOZZO, R. V.; UNDERWOOD, P. A. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 271, ussue 17, pp. 10079-10086, Apr 1996. doi: 10.1074/jbc.271.17.10079.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



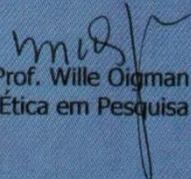
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rio de Janeiro, 02 de maio de 2001

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof.: Wille Oigman
Para: Dr. Dalton José Souza Costa

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (380-CEP/HUPE) "PADRÃO DOS GLICOSAMINOGLICANOS NA GENGIVA HUMANA SADIA EM PACIENTES COM DIFERENTES IDADES " dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º 251 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 07 de agosto de 1997, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.


Prof. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
AV. VINTE E OITO DE SETEMBRO, 77 TÉRREO - VILA ISABEL - CEP 20551-030
TELEFAX- 587-6675 – EMAIL: cocipe@uerj.br

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO

EU, _____, CONCORDO VOLUNTARIAMENTE EM PARTICIPAR DA PESQUISA INTITULADA “PADRÃO DAS GLICOSAMINOGLICANAS NA GENGIVA HUMANA SADIA EM PACIENTES COM DIFERENTES IDADES”. CONFIRMO QUE A NATUREZA E AS IMPLICAÇÕES DA PESQUISA ME FORAM EXPLICADAS E QUE EU COMPREENDI E ACEITEI. EU ENTENDO QUE MEU CONSENTIMENTO É INTEIRAMENTE VOLUNTÁRIO E QUE EU POSSO ABANDONAR A PESQUISA POR QUALQUER RAZÃO E A QUALQUER TEMPO E QUE ISSO NÃO ACARRETERÁ QUALQUER PREJUÍZO À MINHA SAÚDE ORAL.

Assinatura do voluntário

Nome em letra de forma

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____.

Declaração do Pesquisador:

Declaro haver explicado a natureza, as implicações e os riscos da pesquisa supra citada ao paciente acima descrito.

Assinatura

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____.

ANEXO C – Diagrama de um corte vertical sobre um dente mostrando as incisões

Fig-1 DIAGRAMA DE UM CORTE VERTICAL SOBRE UM DENTE MOSTRANDO AS INCISÕES.

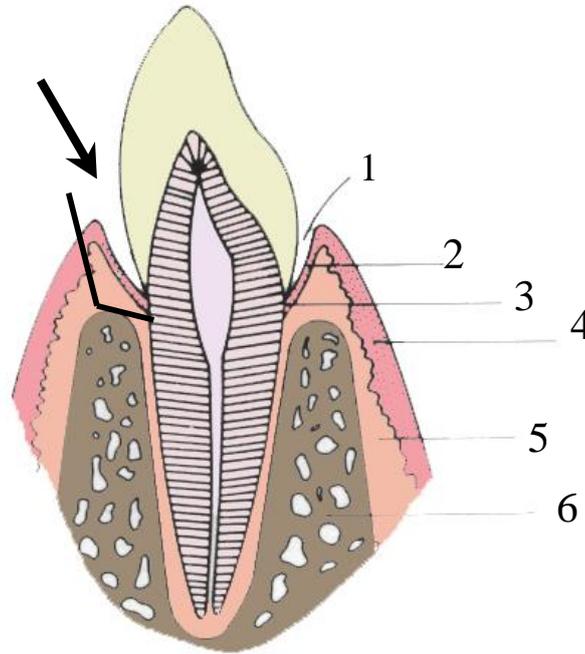


Diagrama de um corte vertical sobre um dente passando pelas suas estruturas de suporte. (1) sulco gengival; (2) epitélio sulcular; (3) epitélio juncional; (4) epitélio oral; (5) tecido conjuntivo; (6) osso alveolar. As biópsias foram coletadas e armazenadas, após anestesia troncular a distância, e os tecidos removidos, com a incisão em forma de bisel interno na crista gengival até o tecido osseo, utilizando uma lâmina de bisturi numero 15 e descoladas do dente com uma incisão paralela ao dente tentando preservar o epitélio juncional.