

NÁDIA FAYEZ OMAR

Cirurgiã-Dentista

Distribuição de MT1-MMP na Região Odontogênica de Incisivos Inferiores de Ratos em Condições Funcionais de Erupção Normal e Alterada. Estudo Imunohistoquímico.

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Biologia Buco-Dental com área de concentração em Histologia e Embriologia.

Orientador: Pedro Duarte Novaes

PIRACICABA

2008

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

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª / 6159

Om1d Omar, Nádia Fayez.
Distribuição de MT1-MMP na região odontogênica de incisivos inferiores de ratos em condições funcionais de erupção normal e alterada. Estudo imunohistoquímico. / Nádia Fayez Omar. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2008.

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

1. Dentes – Erupção. 2. Metaloproteinases de matriz. 3. Imunohistoquímica. I. Novaes, Pedro Duarte. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: MT1-MMP distribution in the odontogenic region of lower incisors in rats with normal and altered eruption: An immunohistochemical study

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Tooth eruption. 2. Matrix metalloproteinases. 3. Immunohistochemistry

Área de Concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Mestre em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: José Merzel, Silvana Pasetto, Pedro Duarte Novaes

Data da Defesa: 18-02-2008

Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 18 de Fevereiro de 2008, considerou a candidata NÁDIA FAYEZ OMAR aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "P. Duarte Novaes".

PROF. DR. PEDRO DUARTE NOVAES

A handwritten signature in black ink, appearing to read "José Merzel".

PROF. DR. JOSÉ MERZEL

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Silvana Pasetto".

PROFa. DRa. SILVANA PASETTO

*À minha amada família:
meus pais Maria Helena e Taha,
e meus irmãos Omar e Najla,
dedico este trabalho.*

A família é o bem mais precioso do homem.

Agradecimento Especial

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes, pelos conhecimentos e questionamentos, pela confiança em mim depositada, pela amizade e por permitir que eu fizesse parte desta equipe.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba- UNICAMP, na pessoa do seu Diretor Professor Doutor Francisco Haiter Neto.

Ao coordenador do Programa de Pós Graduação Professor Doutor Fausto Berzin.

Aos professores da área de Histologia: Professor Doutor Sergio Line e Professora Doutora Darcy Tosello, pelo apreço e ajuda.

À Professora Doutora Silvana Pasetto, pelo legado da imunohistoquímica em nosso laboratório, pela ajuda constante e pela amizade.

À Professora Doutora Ana Paula de Souza, pela ajuda e disposição em todos os momentos.

À Doutoranda e colega de laboratório Cristiane R. Salmon, pela inestimável ajuda com amostras e material.

À Maria Aparecida Varella, técnica do laboratório de Histologia, pela amizade e constante auxílio no preparo de minhas lâminas.

À Bióloga Eliene Ap. Narvaes, por sua valiosa ajuda em todos os momentos, por sua determinação em ensinar e, sobretudo pela preciosa amizade e palavras incentivadoras e acolhedoras, carinho.

À Ivani Odas pelo carinho e amizade.

À Suzete e Joelma, pela ajuda junto a secretária do Depto de Morfologia.

À secretária da pós-graduação Raquel, pela ajuda e paciência.

Aos amigos da Histologia: Daniel, Denise, Liza, Maria Cristina e Cris Borges pela ajuda e amizade preciosa.

Aos todos os colegas da Histologia: Marisi, Alexandre, Marcos, Gilcy, Naila, Carol e Mariana pela convivência agradável.

Às amigas “Fisiológicas”: Rose, Luana, Karlita, Mari, Mariana Leite e Rafaela, pela acolhida, pela ajuda na adaptação em Piracicaba.

Aos amigos do coração: José, Juliana, Marcelo, Gilson, Glauce e Gustavo pela companhia e amizade, pelo carinho, por dias tão felizes...♥.

RESUMO

Metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de endopeptidases capazes de degradar muitos dos componentes estruturais da matriz extracelular, entre eles o colágeno. A presença de MMPs no folículo dentário estaria relacionada com a remodelação que ocorre neste tecido durante o processo de erupção dentária. A matriz metaloproteinase de membrana tipo 1 (MT1-MMP ou MMP-14) tem sido considerada uma importante metaloproteinase de superfície celular envolvida no desenvolvimento do dente e suas raízes, na formação do osso alveolar e no processo de erupção dentária. Este estudo teve por objetivo verificar a distribuição de MT1-MMP, por meio da técnica de imunohistoquímica, no folículo dentário da região odontogênica de incisivos inferiores de ratos, em condições de erupção normal e alterada experimentalmente. Foram utilizados ratos Lewis machos adultos, divididos em 3 grupos: normofuncional - em condição de erupção normal; grupo hiper e hipofuncional - onde o incisivo inferior esquerdo foi seccionado a cada dois dias, mantendo o dente em desocclusão (hipofuncional), o incisivo contralateral direito permaneceu em oclusão e em sobrecarga, sendo considerado em hiperfunção; grupo contido - onde o incisivo inferior esquerdo recebeu uma contenção a fim de impedir o processo eruptivo. Após o período experimental de 14 dias, os animais foram anestesiados e sacrificados por perfusão intracardíaca, as hemimandíbulas foram removidas e fixadas, e os fragmentos correspondentes à região destinada ao estudo (região odontogênica) foram retirados. Após a descalcificação em EDTA 10%, os fragmentos foram incluídos em parafina. Os cortes obtidos foram submetidos à técnica de imunohistoquímica. A MT1-MMP foi localizada na região de folículo dentário em todos os grupos estudados. No grupo normofuncional a intensidade de marcação foi moderada, apresentando uma distribuição mais intensa nas células próximas ao osso alveolar. O grupo hiperfuncional apresentou intensidade de marcação e distribuição semelhante ao grupo normofuncional. O grupo hipofuncional apresentou intensidade de marcação forte com extensão para as células próximas à papila dentária. O grupo contido apresentou intensidade de marcação fraca com distribuição difusa por toda área do folículo dentário. Os resultados sugerem que a condição funcional de erupção alterada (hipo, hiperfuncional e

contido) pode modificar a expressão da proteína MT1-MMP na região odontogênica de incisivos de ratos, demonstrando que esta molécula pode ter um importante papel no mecanismo de erupção dental.

ABSTRACT

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a growing family of endopeptidases that are capable of degrading many structural components of the extracellular matrix, including collagen. MMPs on the dental follicle may be related with remodeling that occurs in this tissue during dental eruption. MT1-MMP has been considered an important membrane-type matrix metalloproteinase involved in tooth and root development, in alveolar bone formation, and in the dental eruption process. The aim of this investigation was to verify the distribution of MT1-MMP, using immunohistochemical technique, in the dental follicle of odontogenic region of lower incisors of rats, with normal and altered eruption conditions. Male adult Lewis rats were used. They were separated in 3 groups: Normalfunctional teeth group - teeth with normal eruption condition; hyper- and hypofunctional teeth group - the left lower incisors were cut at the level of the interdental papilla each two days, keeping the teeth out of occlusion (hypofunctional teeth) and the contralateral right incisors remained with overload (hyperfunctional teeth); Restrain teeth group, the left lower incisors received a restraint to impede the eruption process. After fourteen days the animals were anesthetized and sacrificed by perfusion through the heart, the hemimandibles were removed and fixed, the fragments corresponding to the odontogenic region were removed. After descalcification in 10% EDTA they were embedded in paraffin. The sections were submitted to the immunohistochemical technique. MT1-MMP was distributed on the dental follicle area in all groups. In the normalfunctional teeth group the staining intensity was moderated, presenting a more concentrated distribution near the alveolar bone. The hyperfunctional teeth group showed staining intensity and distribution similar to the normalfunctional teeth group. The hypofunctional teeth group presented strong staining intensity with distribution extended to dental papilla. In the restrain teeth group the staining intensity was weak with diffuse distribution to all dental follicle area. The results suggest that the altered function condition eruption (hypo-, hyper-, and restrain tooth) may modify the MT1-MMP expression in rat incisor odontogenic region, demonstrating that this metalloproteinase may have an important role in the process of dental eruption.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
3 PROPOSIÇÃO	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
5 RESULTADOS	20
6 DISCUSSÃO	25
7 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32
ANEXO	41

1. INTRODUÇÃO

A odontogênese é o processo caracterizado pela interação entre ectomesênquima e células do epitélio oral. A histomorfogênese e citodiferenciação dental são acompanhadas por rápidas variações na organização celular e remodelação da matriz extracelular (Yoshida *et al.*, 2003). Durante o desenvolvimento do dente, a matriz orgânica é secretada, remodelada e finalmente mineralizada para formar a dentina e o esmalte (Caron *et al.*, 1998) e posteriormente ocorrer a erupção dentária. O mecanismo do processo eruptivo ainda é desconhecido, mas admite-se que seja multifatorial envolvendo a resistência e a remodelação dos tecidos periodontais. O folículo dentário, que dará origem ao ligamento periodontal, tem sido estudado e parece ter um papel importante na erupção dentária segundo estudos de Cahill & Marks (1980) e Marks & Cahill (1984).

Modificações químicas na composição do folículo como a produção de fatores de crescimento, entre eles o fator de crescimento epidermal (EGF), seu receptor (EGFr), e o fator estimulante de colônias (CSF-1), que segundo estudos do nosso laboratório utilizando imunohistoquímica estão presentes no folículo (Pasetto, 2005); além da presença de metaloproteinases, estariam relacionadas aos movimentos iniciais da erupção.

A remodelação da matriz extracelular ocorre pela ação de enzimas denominadas metaloproteinases (MMPs) que estão envolvidas na degradação e remodelação normal da matriz extracelular (Birkedal-Hansen, 1993a; Stamenkovic, 2003). Este processo de remodelação mantém o equilíbrio entre as moléculas produzidas e aquelas degradadas pelas MMPs (Sahlberg *et al.*, 1999).

As metaloproteinases de matriz são metalopeptidases dependentes de Zinco. Já foram identificadas mais de 20 metaloproteinases em tecidos humanos. Elas são agrupadas em categorias de acordo com a similaridade de seus domínios e afinidade por substratos. Recentes estudos têm encontrado MMPs em tecidos dentais de animais, como a MMP-2 e MMP-9 (Yoshida *et al.*, 2003; Goldberg *et al.*, 2003), e MMP-8 (Takahashi *et al.*, 2003).

A família das MMPs na última década se expandiu para receber a categoria das matriz metaloproteinases de membrana celular (MTs-MMP). Entre elas está a matriz

metaloproteinase de membrana celular tipo-1 (MT1-MMP/MMP-14), a primeira metaloproteinase de membrana celular descrita (Sato *et al.*, 1994) com a subsequente demonstração de que esta molécula pode funcionar como ativador de MMP-2 (Strongin *et al.*, 1995).

A MT1-MMP tem sido considerada a mais importante metaloproteinase da superfície celular, envolvida na digestão da matriz pericelular, e direta ou indiretamente na ativação de MMP-2 (Itoh *et al.*, 2001). Atribui-se a ela inúmeras funções como quebra de componentes da matriz extracelular incluindo colágeno (Ohuchi *et al.*, 1997) e laminina-5 (Koshikawa *et al.*, 2000). Estudos mostram o papel de MT1-MMP na migração celular pela clivagem de CD44 (molécula de adesão) (Kajita *et al.*, 2001), e pela quebra de laminina-5, componente da membrana basal (Koshikawa *et al.*, 2000), função esta onde também toma parte a MMP-2 (Giannelli *et al.*, 1997). MT1-MMP é essencial para a invasão de células tumorais segundo estudos de Hotary *et al.* (2003) os quais demonstraram que células cancerosas capazes de expressar MT1-MMP adquiriram potente atividade colagenolítica que permitia a proliferação celular numa matriz de colágeno tridimensional e, além disso, evidenciava o crescimento subcutâneo das células tumorais (Hotary *et al.*, 2003; Holmbeck *et al.*, 2003). MT1-MMP é indispensável para o crescimento e desenvolvimento normal, segundo estudo de Holmbeck *et al.* (1999), o qual mostrou que camundongos deficientes em MT1-MMP exibem uma variedade de patologias no tecido conjuntivo.

Outros estudos com camundongos deficientes em MT1-MMP mostraram que ocorre um retardo do crescimento da raiz, falha na erupção dental e subdesenvolvimento mandibular, indicando uma importante participação desta MMP no desenvolvimento do dente e na formação do osso alveolar (Beertsen *et al.*, 2002, 2003; Bartlett *et al.*, 2003).

Todos estes estudos mostraram a importância da MT1-MMP no desenvolvimento dos tecidos dentários de dentes de crescimento limitado.

Incisivos de roedores têm crescimento e erupção contínuos durante toda vida do animal e todos os estágios de desenvolvimento podem ser examinados se forem preparadas secções do dente desde a porção apical em direção a borda incisal. Estudos de Ohshima *et al.* (2005) têm descrito a morfologia da região mais apical (odontogênica) do incisivo de

roedores em cortes transversais, mostrando características morfológicas equivalentes às fases de botão, capuz e campânula do germe de um molar.

O dente incisivo de rato é um modelo onde a erupção pode ser facilmente alterada experimentalmente e estudada desde a formação dentária.

Alguns trabalhos relatam a distribuição de MT1-MMP em tecidos dentários (Caron *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 2003), mas essas observações são em dentes de crescimento limitado e em desenvolvimento. Não há relatos na literatura da localização de MT1-MMP em tecidos dentários nos dentes de crescimento e erupção contínuos e, em condições de erupção experimentalmente alteradas.

Como estudos na literatura mostram o papel essencial de MT1-MMP na erupção dentária (Beertsen *et al.*, 2002, 2003; Bartlett *et al.*, 2003) e no desenvolvimento dos tecidos conjuntivos propriamente ditos e derivados (Holmbeck *et al.*, 1999) em fetos de camundongos deficientes nessa metaloproteinase, surgiu o nosso interesse em estudar a expressão de MT1-MMP na região formadora (odontogênica) dos incisivos de ratos, por meio de imunohistoquímica, em condições alteradas de erupção.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Odontogênese e Erupção Dentária

No início da odontogênese ocorre a interação entre as células do epitélio oral (ectoderma) e do ectomesenquima subjacente, formando a banda epitelial primária. Por volta da sétima semana de vida intra uterina a banda epitelial primária prolifera e se divide em duas: lâmina vestibular, mais externa, que formará o vestíbulo e sulco vestibular, e lâmina dentária propriamente dita, futuro arco dentário, que irá formar os germes dentários.

A lâmina dentária prolifera para a formação do germe dentário, seguindo as etapas da odontogênese:

Broto ou botão: é o primórdio do órgão dentário. Formado por uma pequena invaginação do epitélio oral e ectomesênquima após a proliferação da lâmina dentária.

Capuz ou casquete: ocorre maior proliferação celular do botão com uma condensação de células ectomesenquimais na concavidade do capuz e, aumento da invaginação epitelial. A partir desta fase começam a se formar as estruturas que compõem o germe dentário, epitélio externo do órgão do esmalte, epitélio interno do órgão do esmalte, papila dentária e folículo dentário. O folículo dentário é uma cápsula de tecido conjuntivo ao redor do germe dentário, e é o responsável pela formação do periodonto de inserção do dente (ligamento periodontal, cimento e osso alveolar). Capilares penetram no folículo nesta fase de modo que a nutrição da porção epitelial do germe provem do folículo.

Sino ou campânula: aumenta ainda mais a invaginação no epitélio, porém diminui a proliferação celular. O epitélio interno e externo do órgão do esmalte formam a alça cervical. O germe separa-se do epitélio oral e da lâmina dentária, fenômenos morfogenéticos levam a determinação da forma da coroa do futuro dente.

Fase de coroa: a formação de dentina e esmalte inicia-se pela região das futuras cúspides e segue em direção a alça cervical, dando forma à futura coroa dentária.

Formação da raiz: no final da fase de coroa quando os eventos de diferenciação alcançam a alça cervical, os epitélios interno e externo do órgão do esmalte que constituem a alça cervical proliferam em sentido apical para induzir a formação da raiz do dente. A

formação da raiz ocorre enquanto o dente erupciona. O periodonto de inserção se forma durante a fase de raiz (Katchburian & Arana, 2004).

Entre as teorias da erupção dentária está o papel do folículo dentário. Estudos mostram o papel essencial do folículo dentário durante a erupção. Cahill & Marks (1980) realizaram um estudo cirúrgico em cães mostrando que a remoção do folículo dentário de pré-molares preveniu o dente de erupcionar. Em outro experimento, a remoção do dente e sua substituição por uma réplica de amálgama dental, porém preservando o folículo intacto, resultou na erupção do dente artificial (Marks & Cahill, 1984). Esses experimentos excluem muitas teorias de erupção, porque possíveis tecidos propostos como necessários para erupção tais como a polpa dentária e raiz, foram eliminados.

2.2 - Incisivos de ratos

Segundo Shour & Massler (1971), o dente é mais que um órgão mastigatório; suas propriedades peculiares são um valioso indicador biológico que reflete e registra, durante o seu desenvolvimento, as condições metabólicas do animal. Estes registros, diferentes daqueles em ossos, não são transitórios, mas são permanentemente gravados no esmalte e dentina, nos quais não ocorre reabsorção. Os ratos são monofiodontes (G. monos: único, phyo: crescer, odous – odont: dente), portanto apresentam uma única dentição. O arco dentário consiste de um incisivo e três molares em cada hemimandíbula e nos maxilares, compatibilizando dois tipos de dentes. Nos maxilares o incisivo está localizado anteriormente aos molares, estendendo-se na mandíbula, abaixo e além dos molares.

Os incisivos crescem, mineralizam-se e erupcionam continuamente por toda a vida do animal, demonstrando com isso, o completo ciclo vital do dente em desenvolvimento (a cada 40 ou 50 dias), desde o estágio mais incipiente até a maturação. Estes dentes são também continuamente desgastados na borda incisal pelo atrito a que são submetidos.

A borda incisal do dente aparece na cavidade bucal aproximadamente no oitavo dia de vida do animal, e este se desenvolve a partir de uma bainha elíptica denominada epitélio odontogênico, localizado na base (região intra-óssea), e inclui o tecido conjuntivo

da polpa primitiva. Este epitélio determina, em cortes transversais, o tamanho e contorno do futuro dente, proliferando durante toda a vida do animal.

Recentemente Ohshima e colaboradores (2005) descreveram a morfologia do compartimento epitelial apical (região odontogênica), em cortes seriados transversais do incisivo inferior de roedores, mostrando características morfológicas equivalentes aos estágios de botão, capuz e campânula no germe dentário de um molar.

2.3 - Erupção alterada experimentalmente

Existem trabalhos na literatura que relatam diferenças no periodonto dos dentes de animais em condições de erupção experimentalmente alteradas.

Komatsu, em 1988, avaliou as propriedades mecânicas do ligamento periodontal em dentes de rato impedidos e desimpedidos num experimento de oito dias, e observou que a força para extrair os dentes no grupo desimpedido estava marcadamente reduzida. Também verificou diferenças na espessura do ligamento periodontal, no perímetro da dentina e na parede do alvéolo entre os grupos estudados.

Em 1990, Short & Johnson, num experimento para avaliar o periodonto de ratos em condições de erupção alteradas por um período de três semanas, observaram que o número de fibras de Sharpey estava diminuído e seu diâmetro aumentado no grupo não funcional. Também observaram alteração na organização da deposição óssea no alvéolo, o que levou a diminuição da densidade mineral, sugerindo que esta condição poderia enfraquecer o suporte dental e permitir que o dente fosse extraído mais facilmente.

Silva & Merzel mais recentemente, em 2004, num experimento com incisivos de ratos em hiper e hipofunção, durante 14 dias, observaram diferenças na densidade das fibras de Sharpey, com diminuição delas nos incisivos hipofuncionais (desimpedidos).

Também existem relatos de alteração nos componentes da matriz extracelular do ligamento periodontal de dentes de animais submetidos a condições de erupção alteradas.

Kanoza *et al.*, 1980 avaliaram o metabolismo do colágeno no ligamento periodontal de dentes de ratos em condição de hipofunção. Observaram que ocorreu um

aumento na síntese de colágeno, sugerindo um aumento na remodelação desta área nas condições estudadas.

Em 1984, Van Den Bos & Tonino avaliaram a composição e metabolismo na matriz extracelular no ligamento periodontal de dentes incisivos de ratos em condição impedido e desimpedido, durante quinze dias. Os autores não observaram diferenças estatisticamente significantes nas quantidades de colágeno, proteínas não-colágenas, glicosaminoglicanas e conteúdo de água entre os grupos estudados; mas verificaram um aumento na quantidade de proteínas estruturais não colágenas no grupo hipofuncional (desimpedido).

Michaeli *et al.*, 1986 verificaram a resposta dos fibroblastos do ligamento periodontal em ratos com condições de erupção alteradas e observaram um aumento destas células no ligamento dos dentes desimpedidos, bem como aumento do ligamento relacionado ao dente no mesmo grupo.

Em 1993, Kirkhan *et al.* avaliaram o efeito da alteração da taxa de erupção no conteúdo das glicosaminoglicanas no ligamento periodontal em incisivos de ratos submetidos a condições de erupção alteradas experimentalmente durante três semanas. Os autores observaram que o conteúdo de glicosaminoglicanas sulfatadas aumentou quatro vezes no grupo hipofuncional e diminuiu na ausência de erupção (grupo contido), quando comparados ao grupo controle.

A degeneração progressiva no osso alveolar e no ligamento periodontal a longo prazo são evidentes nos locais com dentes não funcionais, uma vez que a função dental é importante para a manutenção do osso alveolar. A não funcionalidade dentária induz a atrofia do periodonto adjacente. Essa degeneração é aliviada pela hipofunção segundo estudo de Cohn, 1966.

Em nosso laboratório, um estudo mostra a deposição e reabsorção óssea que ocorre no alvéolo, em dentes incisivos inferiores de ratos que foram submetidos à contenção da erupção por método desenvolvido pelo laboratório, mostrando que a remodelação óssea responde as forças de contenção com mudanças no padrão da remodelação óssea (Salmon, 2004).

2.4 - Metaloproteinases de Matriz

A descoberta das metaloproteinases de matriz (MMPs) foi baseada na observação de que durante a metamorfose de anfíbios, a atividade colagenolítica tinha que estar presente para digerir o colágeno na cauda do girino. Fato este observado e descrito primeiramente por Gross & Lapiere, 1962.

Hoje as MMPs compreendem um grupo de mais de 20 metalopeptidases dependentes de zinco, e que estão envolvidas na degradação e remodelação normal da matriz extracelular (Birkedal-Hansen, 1993a; Stamenkovic, 2003; Itoh & Seike, 2006).

Estas enzimas regulam tanto eventos fisiológicos, como a reparação de feridas e eventos patológicos, como invasão tumoral e metástases, doença periodontal e artrite (Birkedal-Hansen, 1993b; Stamenkovick, 2003; Itoh & Seiki, 2004).

Baseado na sua afinidade por substratos ou pelos domínios estruturais similares elas são agrupadas em categorias: colagenases (MMP-1, -8, -13), gelatinases (MMP-2, -9), estromelisinases (MMP-3, -10, -11, -12), matrilisinases (MMP-7, -26), MMPs de membrana celular: MT-MMP (MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25) e outras MMPs (MMP-19, -20, -23, 28) (Birkedal-Hansen, 1993a; Nagase & Woessner, 1999; Vu & Werb, 2000; Visse & Nagase, 2003; De Souza *et al.*, 2005). A estrutura básica das MMPs inclui um peptídeo de sinalização, um pro-peptídeo, um domínio catalítico e um domínio C-terminal (*Hemopexin-like*) (Hernandez-Barrantes *et al.*, 2000; Seike, 2002).

Todas as MMPs são produzidas na forma latente (pro-MMP) requerendo ativação por atividade catalítica, um processo que é usualmente acompanhado por remoção proteolítica do domínio pro-peptídeo. Uma vez ativadas todas as MMPs são especificamente inibidas pelo grupo de inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) (Murphy & Willenbrock, 1995; Visse & Nagase, 2003).

2.5 - MT1-MMP/MMP-14

Na década de 90 a família MMP se expandiu para incluir a nova subfamília de MMPs ancoradas na membrana plasmática conhecidas como matriz metaloproteinases tipo

membrana (MT-MMPs) a qual inclui seis enzimas: MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, MT5-MMP e MT6-MMP (Nagase & Woessner, 1999; Vu & Werb, 2000; Visse & Nagase, 2003; De Souza *et al.*, 2005). As MT-MMPs estão ancoradas na membrana plasmática por meio de uma extensão hidrofóbica de aproximadamente 20 aminoácidos partindo do domínio catalítico exposto no espaço extracelular (Seiki, 2002).

MT1-MMP foi o primeiro membro a ser descrito por Sato e colaboradores em 1994, que a descreveram como uma nova MMP com um domínio transmembrana, identificada na membrana plasmática de células tumorais, e que poderia desencadear a invasão tumoral por meio da ativação da pro-MMP-2 (gelatinase A) na superfície da célula tumoral.

Em 1995, Strongin *et al.*, num estudo para verificar se MT1-MMP poderia atuar como ativador de pro-MMP-2, mostraram que MT1-MMP serve como receptor de superfície celular para o inibidor tecidual de MMPs tipo 2 (TIMP-2) formando assim um complexo que se liga a pro-MMP-2 levando a ativação desta.

Em 1996, Pei & Weiss demonstraram que além de ativar a pro-MMP-2, MT1-MMP também expressou atividade proteolítica contra um amplo numero de moléculas da matriz extracelular incluindo gelatina, fibronectina, laminina, vitronectina e a proteoglicana dermatam sulfato, ampliando desse modo o campo de atividade desta MMP.

Ohuchi e colaboradores em 1997 demonstraram pela primeira vez que MT1-MMP tem a capacidade de digerir colágeno intersticial e outros componentes da matriz extracelular, entre eles gelatina, proteoglicanas, fibronectina, vitronectina e laminina-1. MT1-MMP também ativa a MMP-2 e junto com ela tem maior atividade contra colágeno tipo I, e essa combinação pode ser crucial para degradação pericelular do colágeno na invasão tumoral cancerosa e nas metástases.

MT1-MMP tem sido recentemente demonstrada sendo o primeiro membro da família MMP indispensável para o crescimento e desenvolvimento normal. Camundongos deficientes em MT1-MMP exibiram uma variedade de patologias no tecido conjuntivo e menor tempo de vida segundo estudo de Holmbeck e colaboradores em 1999; neste estudo os animais knockout para o gene de MT1-MMP, no período neonatal, eram indistinguíveis dos animais normais, porém aos 5 dias o crescimento prejudicado se torna aparente, os

camundongos desenvolvem severas fibroses nos tecidos moles periesqueletais e mostram ossificação atrasada, osteopenia, artrite, nanismo, morrendo por volta de 7-12 semanas de idade. Estas alterações ocorrem devido ao fato de os fibroblastos derivados destes animais perderem a habilidade de degradar o colágeno tipo I.

Hernandez-Barrantes *et al.* (2000), em seu estudo sugerem que TIMP-2 poderia atuar como um regulador positivo da atividade de MT1-MMP pela promoção da disponibilidade de MT1-MMP ativa na superfície celular e, conseqüentemente, poderia então suportar a proteólise pericelular.

MT1-MMP atua na migração celular por meio de sua atuação sobre a molécula de laminina 5, o maior componente da membrana basal que suporta a migração de células tumorais e cancerosas. MT1-MMP cliva a cadeia $\gamma 2$ da laminina, promovendo assim a migração e/ou invasão celular (Koshikawa *et al.*, 2000). Função esta também atribuída a MMP-2 (Giannlli *et al.*, 1997).

Em 2001, Kajita e colaboradores demonstraram que MT1-MMP toma parte na migração celular por meio da atuação na molécula de adesão CD44, que esta co-localizada com MT1-MMP na superfície celular. MT1-MMP cliva a forma padrão da molécula de CD44, e promove a migração celular em linhagem de células de carcinoma de pâncreas e mama, e osteosarcoma.

Em 2003, Hotary e colaboradores demonstraram que MT1-MMP tem papel na invasão de células tumorais. Em seu estudo, utilizando linhagem de células tumorais, mostraram que MT1-MMP promove a invasão de células tumorais numa matriz de colágeno tridimensional, com a habilidade de inibir os sinais supressores do crescimento na matriz extracelular, promovendo o crescimento tumoral.

Lee *et al.*, em trabalhos de 2006 e 2007, mostraram por meio de microscopia confocal, microscopia eletrônica de transmissão e análises biomecânicas, que a degradação de substratos de colágeno pelos fibroblastos está correlacionada com a expressão de MT1-MMP. A MT1-MMP foi localizada nos locais de clivagem na superfície celular e também dentro das células. Em contraste com MT1-MMP, MMP-2 não foi requerida para fagocitose do colágeno. Análises similares de várias células de câncer de ovário, mama e fibrosarcoma indicaram que células altamente metastáticas também degradam colágeno

através da via que é mediada por MT1-MMP demonstrando, segundo os autores, um papel essencial para atividade catalítica de MT1-MMP na preparação das fibrilas colágenas para degradação fagocítica em células normais e transformadas.

2.6 - MT1-MMP nos tecidos dentários

Em 1998, Caron e colaboradores se interessaram em demonstrar a expressão e localização de MT1-MMP em tecidos dentários durante a formação dental, dentinogênese e amelogênese. Por meio de imunohistoquímica e Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) demonstraram que MT1-MMP estava altamente expressa nos tecidos de desenvolvimento dentários, incluindo órgão do esmalte e polpa dentária. MT1-MMP estava expressa na maioria dos tecidos não mineralizados sugerindo ampla distribuição tecidual. A imunohistoquímica revelou marcação para MT1-MMP na membrana plasmática de ameloblastos e odontoblastos adjacentes ao esmalte e à dentina em formação, e também nos processos dos odontoblastos dentro da dentina sugerindo papel auxiliar de MT1-MMP nos eventos de biomineralização.

Segundo estudos a MT1-MMP está envolvida no retardo do crescimento da raiz e na falha da erupção em dentes de camundongos que são deficientes em MT1-MMP (Beertsen *et al.*, 2002, 2003). Beertsen e colaboradores, em dois estudos, 2002 e 2003, utilizando camundongos deficientes em MT1-MMP, voltaram a atenção para o desenvolvimento dentário e observaram que a erupção e o alongamento radicular estavam severamente inibidos nos animais deficientes. A erupção dos molares em animais de 21 dias não foi completa, assim como o crescimento das raízes também não foi completo apresentando, em média, 1/3 do tamanho normal. Os autores atribuem esse ocorrido ao fato de existir uma deficiência na capacidade de remodelação no periodonto dos animais knockout que gerou uma força de resistência na estrutura e/ou formação das fibras colágenas, motivo pelo qual os molares não puderam erupcionar completamente. Também observaram que a deficiência de MT1-MMP leva a um acúmulo de fagossomos contendo colágeno, nos fibroblastos do ligamento periodontal, e não encontraram fagolisossomos, que são a próxima etapa no processo de degradação, indicando que MT1-MMP pode estar

envolvida na (pré-) digestão de fibrilas de colágeno. Os autores concluíram então que MT1-MMP leva à erupção dental, ao crescimento das raízes e à formação de osso alveolar, e também que esta enzima tem função na via intracelular de degradação do colágeno. Distúrbios na erupção e crescimento da raiz estão relacionados à inibição desta via.

Em 2003, Bartlet e colaboradores também investigaram a atividade de MT1-MMP no desenvolvimento dentário por meio de análises histológicas, radiográficas e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os autores utilizaram camundongos knockout para MT1-MMP e observaram que, aos 18 dias de desenvolvimento, havia diferenças significativas: os molares não tinham erupcionado ainda nos animais knockout e suas raízes estavam notadamente subdesenvolvidas. Ocorreu um atraso significativo no desenvolvimento dentário. Aos 25 dias ocorreu um atraso de aproximadamente 5 dias na erupção dentária. Nas avaliações radiográficas, aos 20 dias observaram-se mandíbulas pequenas e deformadas e, massa óssea reduzida. Nos molares que não haviam erupcionado observaram-se raízes curtas. Na MEV a estrutura da coroa, bem como dentina e esmalte dental estavam normais tanto em molares como incisivos.

Também em 2003, Yoshida *et al.* tiveram interesse em localizar MT1-MMP, entre outras moléculas, durante o desenvolvimento de molares de camundongos, por meio de imunohistoquímica e hibridização *in situ*. Os autores observaram que MT1-MMP estava expressa no epitélio dentário e mesênquima no estágio de botão, em alça cervical, odontoblastos e ameloblastos. Na análise de imunohistoquímica, MT1-MMP estava distribuída na superfície e dentro do epitélio dentário, e sobre o mesênquima dentário. Houve fortes sinais para MT1-MMP detectados em odontoblastos funcionais e em diferenciação; e moderada intensidade nos ameloblastos.

Kumamoto & Ooya em 2006, em seu estudo avaliaram a presença de MT1-MMP em espécimes de tumores ameloblásticos e germes dentários humanos normais, por meio de imunohistoquímica. Marcação imunohistoquímica para MT1-MMP foi detectada em membrana celular e citoplasma dos componentes celulares em tecidos odontogênicos normais e neoplásicos. No germe dentário normal a expressão de MT1-MMP foi forte no epitélio interno e externo do órgão do esmalte e lâmina dentária; e fraca no estrato

intermediário e retículo estrelado. Algumas células endoteliais na papila dentária e o folículo dentário estavam fracamente marcados.

Linsuwanont-Santiwong *et al.*, em 2006, num estudo para verificar uma possível associação de MT1-MMP na reabsorção radicular fisiológica dos dentes decíduos, por meio de RT-PCR e análises de Northern Blot, hibridização *in situ* e imunohistoquímica, utilizando germes bovinos, mostraram que houve alta expressão de RNAm de MT1-MMP nos tecidos de reabsorção radicular, entre a raiz do dente decíduo e seu sucessor permanente; bem como nos odontoclastos alinhados na camada de reabsorção na superfície dos tecidos radiculares nos locais de reabsorção da raiz. A imunohistoquímica confirmou a localização de MT1-MMP nos odontoclastos fortemente marcados.

Em 2007, Schwab *et al.*, verificaram a detecção imunohistoquímica de MT1-MMP durante as fases de capuz e campânula em molares de ratos normais. MT1-MMP estava distribuída no epitélio interno do órgão do esmalte na fase de capuz, e em órgão do esmalte e ameloblastos, e odontoblastos na papila dental durante a fase de campânula.

3. PROPOSIÇÃO

Estudar a imunoreatividade de MT1-MMP na região formadora (odontogênica) dos incisivos de ratos, por meio de imunohistoquímica, em condições de erupção normal e alterada experimentalmente: hiperfuncional, hipofuncional e contida.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 18 ratos machos, adultos da linhagem Lewis, pesando em média 350 gramas, os quais foram mantidos em gaiolas no Biotério do Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP, com temperatura variando entre 20 e 25° C e fotoperíodo claro-escuro de 12 horas. Os animais receberam água e ração *ad libitum*, estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (em Anexo).

Os animais foram divididos em 3 grupos com 6 ratos, cujos incisivos inferiores esquerdos e direitos foram submetidos a diferentes condições funcionais de erupção, durante 14 dias, a saber:

A - Grupo normofuncional: esse grupo foi considerado o grupo controle no qual tanto o incisivo esquerdo como direito estavam em oclusão e, portanto em condição normal de erupção (Fig. 1). A taxa de erupção foi medida durante todo período experimental, utilizando uma ocular milimetrada (Ernest Leitz wetzlar Germany 12,5x) adaptada à lupa estereoscópica, sendo utilizada para calibração uma régua milimetrada (Carl Zeiss 5+ ¹⁰⁰/₁₀₀ mm), medindo a distância da margem gengival até uma marca feita no dente com uma broca de alta rotação como descrito por Merzel *et al.* (2000).

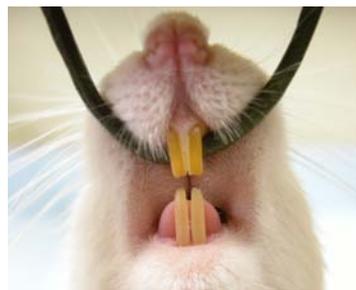


Figura 1 - Incisivos inferiores direito e esquerdo em oclusão normal.

B - Grupo hiper e hipofuncional: após anestesia dos animais com halotano (Cristália, Itapira-SP) os incisivos inferiores esquerdos foram seccionados, a cada dois dias,

na altura da papila interdental com uma broca diamantada montada em alta rotação. Este procedimento manteve o dente esquerdo desocluído e livre de forças mastigatórias, produzindo uma condição hipofuncional. Os incisivos direitos (contralaterais) permaneceram em oclusão e com sobrecarga mastigatória por estarem suportando a carga contra os dois antagonistas superiores durante os movimentos da mastigação, portanto em condição hiperfuncional (Michaeli & Weinreb, 1968) (Fig. 2). A taxa de erupção foi medida, durante todo o período experimental, medindo a distância da margem gengival até a extremidade incisal intacta, para o grupo hiperfuncional; ou até a incisal seccionada, para o grupo hipofuncional, utilizando o mesmo material descrito anteriormente.



Figura 2 - Incisivo inferior esquerdo seccionado

C - Grupo contido: os animais deste grupo foram anestesiados com injeção intramuscular de Ketamina (Francotar) na dosagem de 80mg/kg peso corporal associado ao relaxante muscular Cloridrato de Xylasina (Virbraxyl) na dosagem de 8mg/Kg de peso corporal. Após anestesia eles receberam uma contenção realizada com fio de aço nº 0,4 no incisivo inferior esquerdo. Assim sendo, foi feito um orifício com uma broca Carbide ¼ (Sorensen, KG, Brasil) na face labial do mesmo dente e, uma das extremidades do fio envolveu o primeiro molar inferior esquerdo enquanto a outra extremidade foi presa ao orifício e este preenchido com resina fotopolimerizável (3M, USA) (Fig. 3). Este procedimento produziu uma condição de contenção do processo eruptivo (Salmon, 2004). A taxa de erupção foi medida durante todo o período experimental, medindo a distância da margem gengival até a contenção, utilizando o mesmo material descrito anteriormente, com intuito de certificar se o tratamento foi efetivo, ou seja, limitou a erupção do incisivo.

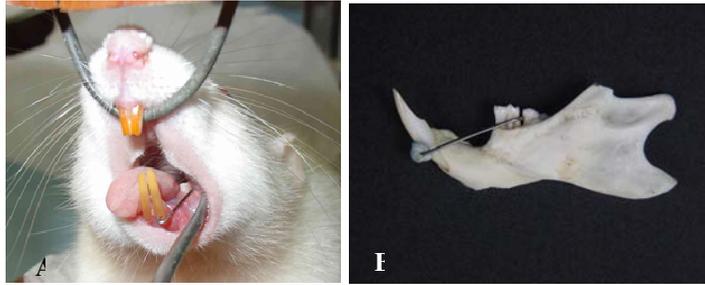


Figura 3 – A. Contenção no incisivo inferior esquerdo. B. Mandíbula dissecada mostrando a contenção no incisivo inferior esquerdo.

4.2 - Coleta e processamento de amostras

Todos os animais foram anestesiados e sacrificados por perfusão intracardíaca com solução fixadora de Karnovsky (1965), modificada com 4% de paraformaldeído, 0.5% de glutaraldeído e 0.2% de ácido pícrico em tampão fosfato 0,1M pH 7,4. As mandíbulas foram removidas, seccionadas em hemimandíbulas, dissecadas e armazenadas na mesma solução fixadora à 4° C por 48 h. Após esse período as peças foram lavadas em solução tampão fosfato (PBS) e divididas no sentido transversal em cortadeira (South Bay Technology Inc/ modelo 650) com disco diamantado para separar o segmento destinado ao estudo imunohistoquímico, que foi a região a partir do último molar, denominada região odontogênica, conforme esquema representado na Figura 4.

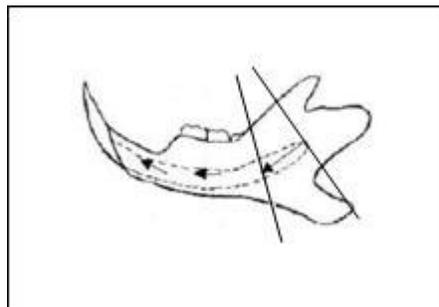


Figura 4 - Esquema da hemimandíbula mostrando a região de estudo e o sentido de obtenção dos cortes.

Na seqüência as peças foram descalcificadas em solução de ácido etileno diaminotetracético (EDTA) a 10% em tampão fosfato 0,01M pH 7,4, desidratadas em álcool e incluídas em parafina.

4.3 - Técnica imunohistoquímica

Preparo das lâminas

Antes da coleta dos cortes, as lâminas foram preparadas com organossilano (3-aminopropyltriethoxy-silano) (Sigma Chemical Co St Louis, USA), como segue:

As lâminas (Knitel Glasser, fosca) foram mergulhadas em uma solução de ácido clorídrico (HCL) (Merck) 1N, durante 20 min. Lavadas em água destilada e imersas em solução 3:1 de etanol absoluto (Merck) e ácido acético (Merck), durante 20 min, e posteriormente foram secas na estufa à 60 °C.

Após esse pré-tratamento as lâminas foram mergulhadas em 4 banhos rápidos da solução de organossilano a 6%; 3 banhos de acetona pura (Merck); 2 banhos de água destilada e colocadas para secar na estufa à 60 °C.

Imunohistoquímica

Cortes transversais com 4 µm de espessura foram obtidos da região odontogênica, em micrótomo automático (RM 2155 Leica), a partir da porção mais apical dos incisivos inferiores, como mostra a figura 4, correspondentes à fase de campânula, e coletados em lâminas preparadas como descrito anteriormente.

Os cortes foram desparafinizados com xilol, hidratados com álcool absoluto, 80%, 50% e água por 2 minutos cada, em seguida mergulhados em H₂O₂ 20 volumes (2x de 6 minutos) para inativar a atividade de peroxidase endógena existente no tecido. Após rápido enxágüe com água destilada e 5 minutos em PBS, foi realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas com albumina de soro bovino (BSA) 3% diluída em PBS durante 30 minutos. Após uma breve lavagem em PBS, os cortes foram incubados no anticorpo primário mouse anti-human-MT1-MMP monoclonal antibody (Chemicon), na diluição 1:1000 em PBS/BSA 1% por 16 horas à 4 °C. Em seguida, lavados em PBS (3x de 5 minutos) e submetidos ao “Kit” de amplificação LSAB +Sys, HRP (DAKOCYTO). O kit consiste de duas soluções: um frasco contendo biotina e outro contendo estreptoavidina

conjugada com peroxidase. Foi utilizado o tempo de 30 minutos, à 37 °C, com cada solução. Após a lavagem com PBS as lâminas foram reveladas com 3,3 diaminobenzidina (DAB) (Sigma), à 37° C por 3 minutos, seguido de lavagem em água destilada e contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 30 segundos. As lâminas foram montadas com Permont (Fisher Chemicals).

Cortes controles negativos foram submetidos ao mesmo tratamento omitindo-se somente o anticorpo primário. Como controles positivos foram utilizados cortes de carcinoma de mama, tecido que foi demonstrado expressando MT1-MMP (Jones *et al.*, 1999).

4.4 - Análise de resultados

Para a análise dos resultados imunohistoquímicos dois observadores examinaram separadamente as lâminas, com identificação oculta, avaliando a intensidade de marcação (precipitado marrom) no folículo dentário, através de unidades subjetivas (Wise *et al.*, 1992; Pasetto, 2005):

- (-) Ausência de marcação
- (+) Fraca intensidade de marcação
- (++) Moderada intensidade de marcação
- (+++) Forte intensidade de marcação

Foi feita uma seleção de 6 cortes de cada grupo, e o observador classificou a intensidade de marcação em cada corte. Depois os dados foram confrontados e cada grupo recebeu uma classificação de acordo com as unidades acima descritas.

A distribuição e intensidade de marcação na região do folículo dentário nos grupos estudados foram comparadas com a distribuição e a intensidade de marcação no grupo normofuncional.

5. RESULTADOS

5.1 - Taxa de erupção

A taxa de erupção no grupo normofuncional foi de 0,49mm/dia ($\pm 0,1$), considerada normal segundo a literatura (Michaeli *et al.*, 1986), e no grupo hipofuncional a taxa foi de 1mm/dia ($\pm 0,017$) (Michaeli *et al.*, 1986), aproximadamente o dobro da taxa do grupo normofuncional. No grupo hiperfuncional, a taxa foi de 0,55mm/dia ($\pm 0,09$), sendo semelhante ao grupo normofuncional. No grupo contido, a taxa foi de 0,04mm/dia ($\pm 0,02$) demonstrando que a contenção com fio de aço neste grupo foi eficiente em limitar a erupção no incisivo inferior esquerdo (Fig. 5).

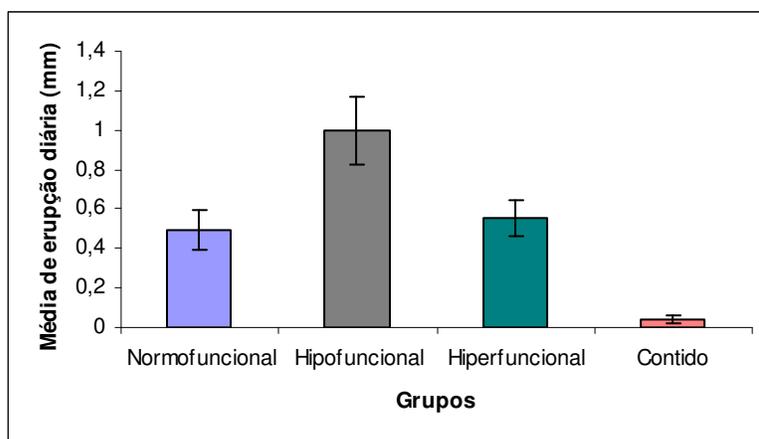


Figura 5 - Média e desvio padrão da taxa diária de erupção do incisivo nos grupos estudados.

A média de erupção diária nos grupos foi determinada apenas com intuito de comprovar as alterações na taxa de erupção provocadas pelo tratamento realizado.

5.2 - Análise da localização de MT1-MMP

A Figura 6A mostra um corte transversal da região odontogênica do incisivo de rato equivalente à fase de campânula. Observam-se as estruturas: osso alveolar (OA), folículo dentário (FD), órgão do esmalte (E), pré-odontoblastos (O) e papila dentária (PD). Indicamos ainda as faces lingual (LI) e labial (LA) da região odontogênica.

A Figura 7 mostra a marcação para MT1-MMP em todos os grupos estudados.

No grupo normofuncional (Fig. 7A), MT1-MMP foi detectada em toda a região do folículo dentário (FD) com intensidade de marcação moderada. Houve uma concentração da marcação nas células próximas ao osso alveolar, tanto na face lingual como labial da região odontogênica (setas).

No grupo hiperfuncional, MT1-MMP foi detectada em toda a região do folículo dentário (FD) com moderada intensidade de marcação, semelhante ao grupo normofuncional (Fig. 7B). Houve uma marcação concentrada nas células próximas ao osso alveolar na face lingual deste grupo (seta). A morfologia deste grupo, aparentemente, se assemelha com o grupo normofuncional.

Na figura 7C está representada a marcação para MT1-MMP no grupo hipofuncional, que apresentou distribuição de MT1-MMP por toda região de folículo dentário (FD) com intensidade de marcação forte, melhor evidenciada nas faces lingual e labial (setas), quando comparada com o grupo normofuncional. Em relação aos aspectos morfológicos, aparentemente este grupo apresentou o alvéolo dentário com tamanho aumentado e o germe com tamanho reduzido e, conseqüentemente, uma quantidade maior de tecido folicular (FD) quando comparado ao grupo normofuncional.

O grupo contido apresentou distribuição de MT1-MMP em toda região de folículo dentário (FD), com intensidade de marcação fraca, como pode ser visto na Figura 7D. Este grupo apresentou a região odontogênica com morfologia alterada, tendo seu órgão dentário completamente irregular. Observamos a presença de tecidos dentários mineralizados (asteriscos), aumento no tamanho do alvéolo e diminuição do tecido folicular (FD).

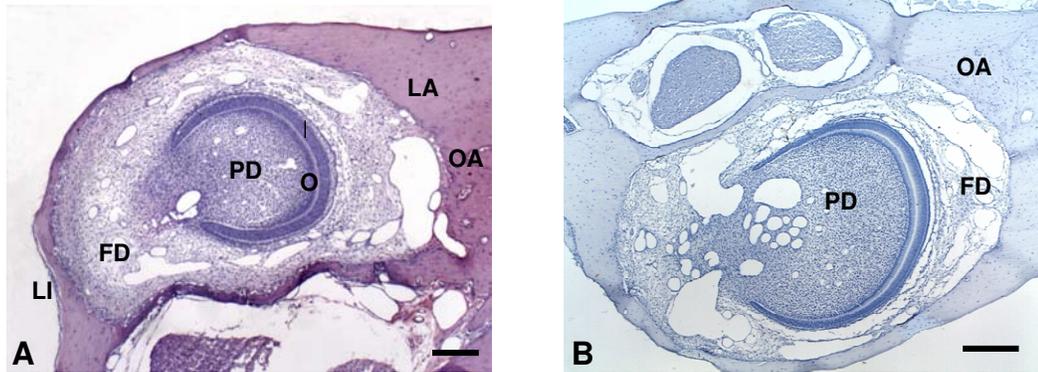


Figura 6 - Cortes transversais da região odontogênica de incisivo de rato, grupo normofuncional. A, Hematoxilina e Eosina. B, Controle negativo, hematoxilina de Harris. (PD) papila dentária, (O) pre-odontoblastos, (E) órgão do esmalte, (FD) folículo dentário, (OA) osso alveolar, (LI) face lingual, (LA) face labial. Barra 200µm.

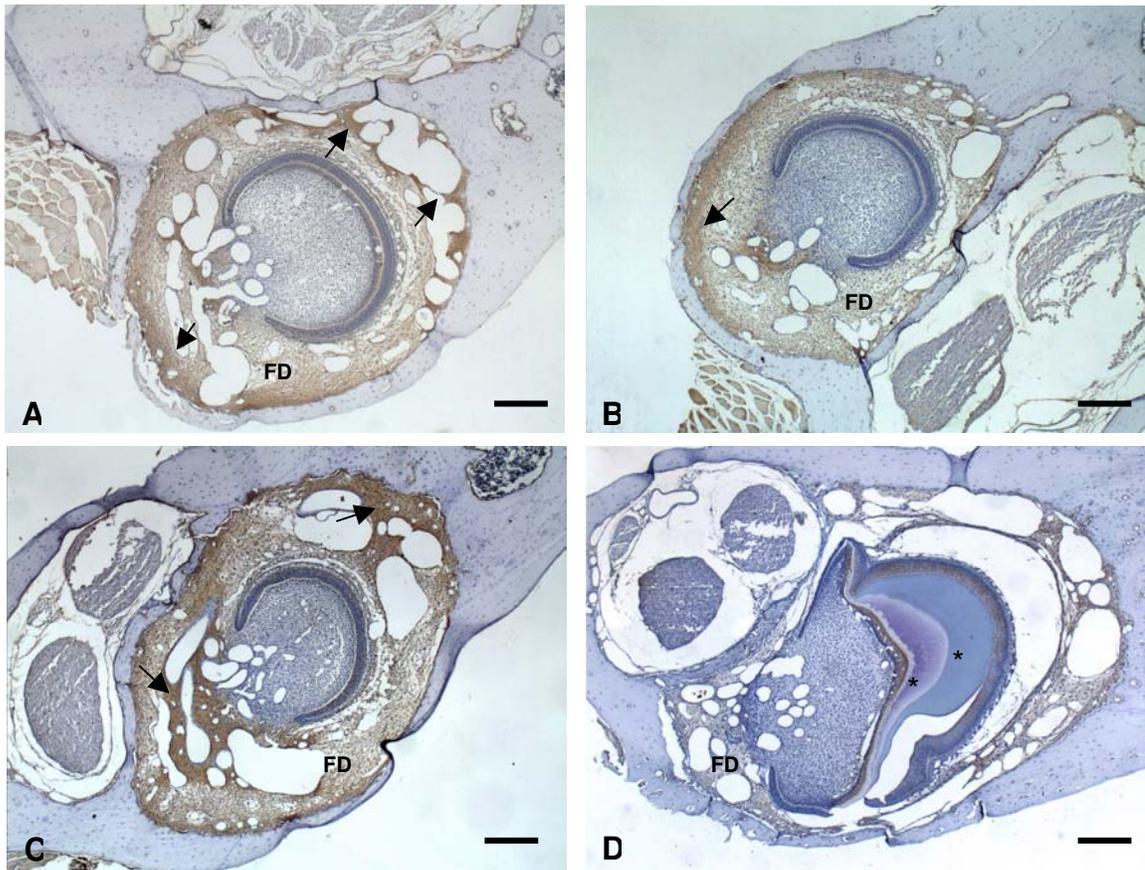


Figura 7 - Cortes transversais da região odontogênica mostrando a marcação para MT1-MMP. (A) Grupo controle. (B) Grupo hiperfuncional. (C) Grupo hipofuncional. (D) Grupo contido. As setas indicam áreas de maior intensidade de marcação. (*) Tecidos mineralizados. Barra 200µm.

Foi observado que na face lingual do folículo dentário houve maior diferença na distribuição da MT1-MMP entre os grupos. Assim descrevemos mais detalhadamente esta face, destacada nas figuras 8 e 9.

O grupo normofuncional apresentou intensidade de marcação moderada com distribuição difusa por toda face lingual, sendo mais intensa nas células próximas ao osso alveolar (Fig.9A).

O grupo hiperfuncional se assemelha com o grupo normofuncional, apresentou distribuição semelhante pela face lingual no folículo dental e intensidade de marcação moderada (Fig 9B).

O grupo hipofuncional mostrou distribuição de MT1-MMP em toda face lingual do folículo dentário, com intensidade forte (Fig. 9C), quando comparada com o grupo normofuncional, e extensão dessa marcação em direção à papila dentária (asterisco).

A marcação de MT1-MMP foi sempre fraca com distribuição difusa na face lingual do folículo em todos os animais do grupo contido (Fig. 9D).

Outros tecidos odontogênicos também apresentaram marcação: a expressão de MT1-MMP foi fraca ou ausente no órgão do esmalte; a papila dentária apresentou leve marcação; pré-odontoblastos foram fracamente marcados ou sem marcação. No grupo contido os ameloblastos e odontoblastos presentes apresentaram marcação para MT1-MMP.

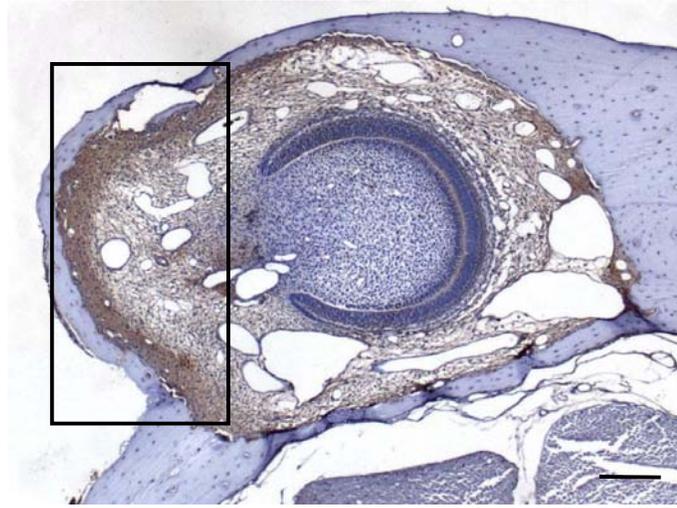


Figura 8 - Corte transversal da região odontogênica de animal do grupo normofuncional, mostrando a face lingual selecionada no retângulo. Barra 200 μ m.

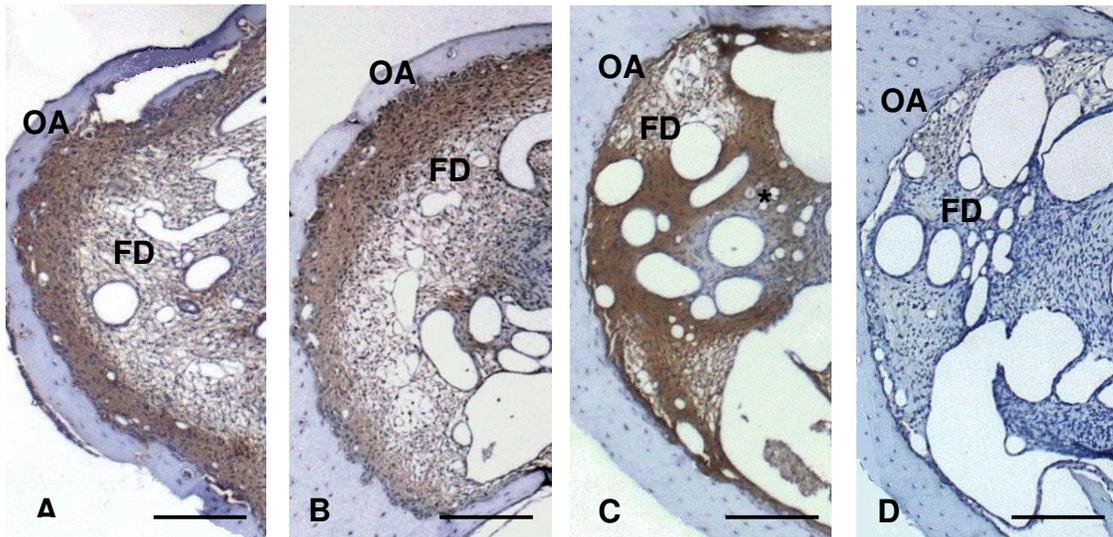


Figura 9 - Área selecionada no retângulo na figura 8. (A) Grupo normofuncional. (B) Grupo hiperfuncional. (C) Grupo hipofuncional. (D) Grupo contido. (OA) osso alveolar. (FD) folículo dentário. (*) Extensão da marcação em direção à papila dentária. Barra 200 μ m.

6. DISCUSSÃO

O tecido conjuntivo é constituído por diferentes tipos celulares e grande quantidade de matriz extracelular (MEC), a qual contém fibras colágenas e elásticas, glicoproteínas e enzimas conhecidas como metaloproteinases. Todos estes componentes formam uma rede essencial onde as células proliferam, diferenciam-se e migram para exercer suas diferentes funções.

A MEC tem como principal característica funcional sofrer um constante processo de remodelação tanto durante o desenvolvimento de vários órgãos quanto em tecidos adultos (Stamenkovic, 2003; Chin & Werb, 1997). Este processo de remodelação ocorre pela atividade de diferentes metaloproteinases (Birkedal-Hansen, 1993a; Stamenkovic, 2003), e entre elas destacamos a metaloproteinase presente na membrana celular conhecida por MT1-MMP/MMP-14 (Sato *et al.*, 1994). A MT1-MMP é uma metaloproteinase que tem marcada atividade sobre o colágeno tipo I, II, III entre outros componentes da matriz extracelular (Ohuchi *et al.*, 1997).

Em camundongos, cujo gene para a MT1-MMP foi silenciado, observaram-se severos defeitos no desenvolvimento do esqueleto e subdesenvolvimento mandibular (Holmbeck *et al.*, 1999), em dentes molares foi observado um retardo do crescimento da raiz e falha na erupção dentária, por causa de uma inadequada remodelação do colágeno no ligamento periodontal e folículo dentário (Beertsen *et al.*, 2002, 2003; Bartlet *et al.*, 2003). Estes autores mostraram também que há um acúmulo de fagossomos (sem a fusão com lisossomos) contendo colágeno nos fibroblastos do ligamento periodontal e do folículo dentário destes animais. Lee *et al.*, (2006, 2007) comprovaram que, na via de fagocitose, a degradação inicial das fibrilas colágenas ocorre nos fibroblastos e na presença de MT1-MMP.

Estes estudos citados utilizaram como metodologia o silenciamento do gene para a MT1-MMP durante o desenvolvimento e erupção dentária em molares que apresentam crescimento limitado.

Embora esta metodologia traga interessantes informações do papel do gene MT1-MMP, sabe-se que durante a formação do dente e seu processo de erupção outras

moléculas estão envolvidas, fazendo-se necessária uma avaliação dessas moléculas em condições normais e/ou alteradas de erupção, o que pode ser realizado em dentes que possuem crescimento e erupção contínuos como os incisivos de ratos. Neste contexto os resultados apresentados aqui mostram a distribuição de MT1-MMP na fase de campânula do incisivo (Ohshima *et al.*, 2005) em condições de erupção normal, hipofuncional, hiperfuncional e contida.

Yoshida *et al.*, (2003), estudaram a distribuição de MT1-MMP em molares de animais normais em todas as fases do desenvolvimento. De forma geral a marcação para MT1-MMP nas fases de botão e capuz estava na superfície e dentro do epitélio dentário e sobre o mesênquima dentário. Na fase de campânula inicial, a MT1-MMP estava gradualmente restrita a aspectos basais das células epiteliais. Na fase de campânula tardia, MT1-MMP estava presente no pólo apical de ameloblastos em diferenciação.

Kumamoto & Ooya (2006) verificaram a distribuição de MT1-MMP em germes dentários de molares humanos, no estágio inicial da mineralização da coroa, por meio de imunohistoquímica, e mostraram marcação fraca em folículo dentário.

Schwab *et al.*, 2007, verificaram MT1-MMP em molares de ratos na fase de campânula tardia, mostrando presença de MT1-MMP em órgão do esmalte, ameloblastos e odontoblastos.

Na fase correspondente à campânula no incisivo, o presente estudo mostrou marcação acentuada para MT1-MMP, na região de folículo dentário, em todos os grupos estudados. Não foi observada marcação nas células epiteliais. Marcação apreciável apenas foi encontrada em folículo dentário. Houve maior marcação na face lingual da região odontogênica do incisivo. Como existem diferenças funcionais com relação às forças mastigatórias entre molares e incisivos, a maior marcação na face lingual pode ser explicada por estas diferenças.

No incisivo do rato, durante a mastigação, as forças são exercidas na incisal do dente, de modo que no lado apical ocorre uma pressão na face lingual, onde a remodelação poderia estar acentuada. Durante o desenvolvimento dentário no incisivo do rato, essa face irá formar o análogo da raiz (Amar *et al.*, 1987). Na face lingual não ocorre a formação do esmalte, mas sim do cimento (Shour & Massler, 1971).

Nos animais normofuncionais do presente estudo a taxa de erupção foi 0,49mm/dia ($\pm 0,1$) considerada normal segundo estudos de Michaeli *et al.*, (1986).

No grupo hipofuncional, a intensidade de marcação foi forte no folículo quando comparada com a mesma região no grupo normofuncional, e a taxa de erupção estava acelerada (o dobro) quando comparada ao normofuncional. A taxa de erupção aumentada em condição de hipofunção já foi verificada também por Van Den Bos & Tonino, (1984) e Michaeli *et al.*, (1986). Em hipofunção foi demonstrado que ocorre um aumento na síntese do colágeno no ligamento periodontal (Kanoza *et al.*, 1980), acompanhado de um aumento dos fibroblastos (Michaeli *et al.*, 1986), bem como um aumento da proliferação celular (Zajicek *et al.*, 1972). Estes parâmetros avaliados nestes trabalhos, aliados aos resultados obtidos para a MT1-MMP no grupo hipofuncional, sugerem que também ocorre um aumento na remodelação da matriz extracelular. E ainda, somados aos resultados de estudos utilizando radioautografia, marcando núcleos de fibroblastos, os quais mostraram que estas células marcadas migram continuamente no ligamento periodontal e a taxa de seu movimento iguala-se àquelas da erupção do dente, seja hiperfuncional (impedido) ou hipofuncional (desimpedido) (Beertsen, 1975; Michaeli *et al.*, 1979), sugerem maior atividade de MT1-MMP, e neste grupo (hipofuncional) poderia explicar a maior intensidade de marcação.

A atividade das MMPs pode influenciar os eventos do desenvolvimento dentário por meio da ação destas enzimas na migração celular. A laminina-5, a qual é expressa em muitas membranas basais, está envolvida na adesão e migração celular. A laminina pode ser clivada diretamente por MT1-MMP (Koshikawa *et al.*, 2000) ou por meio da ativação da metaloproteinase de matriz-2 (MMP-2) (Giannelli *et al.*, 1997), e os fragmentos têm o potencial de induzir a mobilidade celular (Koshikawa *et al.*, 2000; Giannelli *et al.*, 1997). Mecanismo semelhante ocorre com a molécula de adesão CD44, que quando clivada por MT1-MMP promove a migração celular, em linhagem de células de carcinoma de pâncreas, mama e osteosarcoma (Kajita *et al.*, 2001).

A MT1-MMP tem sido demonstrada com papel essencial para a invasão de células tumorais segundo estudos de Hotary *et al.*, (2003) os quais demonstraram que

células cancerosas capazes de expressar MT1-MMP adquiriram potente atividade colagenolítica, que permitia a proliferação celular numa matriz de colágeno tridimensional e, além disso, evidenciava o crescimento subcutâneo das células tumorais (Hotary *et al.*, 2003; Holmbeck *et al.*, 2003). MT1-MMP tem papel na degradação pericelular durante a invasão tumoral (Itoh *et al.*, 2001). A invasão tumoral também tem sido demonstrada potencializada quando MT1-MMP esta associada à MMP-2 (Ohuchi *et al.*, 1997).

A MT1-MMP foi expressa nos tecidos embrionários durante a formação do camundongo (Apte *et al.*, 1997), e no osso e cartilagem durante a formação do esqueleto (Kinoh *et al.*, 1996). No decorrer da embriogênese as células migram para formar os arcos branquiais e posteriormente formar os diversos tecidos (Chin & Werb, 1997).

Quando as células são estimuladas a migrar, a MT1-MMP localiza-se na frente de migração, de acordo com a reestruturação do citoesqueleto de actina (Seiki, 2002)

Estudos mostram que os fibroblastos migram no ligamento periodontal durante a erupção dentária (Beertsen, 1975; Michaeli *et al.*, 1979), como descrito anteriormente.

Estes dados de migração celular, aliados aos resultados deste estudo, mostram que MT1-MMP exerce papel durante a migração celular, incluindo a migração que ocorre no processo de erupção dentária.

Com relação aos aspectos morfológicos neste grupo foi observado uma diminuição no tamanho do germe dental e aumento do alvéolo, com conseqüente aumento do espaço do folículo dentário, esses dados estão de acordo com a literatura, segundo estudos de Steigman *et al.*, 1989 o qual comprova estas alterações em dentes incisivos hipofuncionais nas primeiras três semanas de hipofunção.

O grupo hiperfuncional apresentou marcação e distribuição semelhante ao grupo normofuncional, o que pode ser explicado pelo fato de apesar de estar em sobrecarga mastigatória (Michaeli & Weinreb, 1968 apud Steigman, 1989) estes dentes apresentaram taxa de erupção semelhante ao grupo normofuncional e, por isso, a remodelação da matriz extracelular pode não ter se alterado com relação ao grupo normofuncional, não provocando diferenças na expressão de MT1-MMP.

No grupo contido a taxa de erupção estava marcadamente reduzida (\approx 10 vezes menor que o normofuncional) e este grupo apresentou marcação fraca. É provável, que com

a erupção praticamente ausente, a remodelação da matriz extracelular esteja diminuída e, baseados em observações a respeito da migração celular contínua que ocorre no ligamento periodontal (Beertsen, 1975; Michaeli *et al.*, 1979), pode-se supor que com a cessação da erupção também ocorra uma cessação da migração celular no grupo contido. Estes dados reunidos poderiam explicar a grande redução na marcação para MT1-MMP neste grupo quando comparado ao grupo normofuncional.

Um trabalho com dentes contidos, em nosso laboratório, mostrou que a instalação da contenção causa inicialmente uma força no sentido lingual na região incisal promovendo uma inclinação do incisivo (Salmon, 2004), o que conseqüentemente provoca um alívio na face lingual da região apical dos dentes contidos. Estes dados, aliados aos anteriores, também poderiam ajudar a explicar a fraca intensidade de marcação para MT1-MMP no grupo contido.

Com relação aos aspectos morfológicos, encontramos no grupo contido um germe com morfologia alterada, a presença de tecidos mineralizados, e aumento do tamanho do alvéolo, o que já foi descrito por Salmon, 2004.

A MT1-MMP já foi demonstrada como ativador de MMP-2 (Sato *et al.*, 1994; Strongin *et al.*, 1995). A localização de MMP-2 e MT1-MMP tem sido detectada temporal e espacialmente durante o desenvolvimento dentário, indicando que estas MMPs tem papel na morfogênese e erupção dentária (Chin & Werb, 1997; Sahlberg *et al.*, 1992; Caron *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 2003).

MMP-2 tem sido demonstrada com capacidade de degradar colágeno tipo IV (Kinoh *et al.*, 1996; Itoh & Seiki, 2006). Trabalhos mostram que a degradação de colágeno esta potencializada quando MT1-MMP e MMP-2 estão associadas nesta tarefa (Ohuchi *et al.*, 1997). No presente estudo, imunoreatividade para MT1-MMP foi detectada no folículo; é possível que MMP-2 também esteja distribuída pelo folículo dentário de maneira semelhante à MT1-MMP, já que MT1-MMP é ativador de MMP-2 (Sato *et al.*, 1994; Strongin *et al.*, 1995). Isso também pode ser estendido para o inibidor tecidual de MMPs tipo 2 (TIMP-2), uma vez que durante ativação de MMP-2, MT1-MMP forma um

complexo com TIMP-2 e pro-MMP-2 (Strongin *et al.*, 1995; Hernandez-Barrantes *et al.*, 2000; Itoh *et al.*, 2001).

A literatura mostra a distribuição de MMP-2 em incisivos de roedores, mas não menciona o folículo dentário (Goldberg *et al.*, 2003). Um trabalho em nosso laboratório mostra a distribuição de MMP-2 no ligamento periodontal de incisivos de roedores por meio de Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), e verifica que MMP-2 aumenta significativamente no ligamento do grupo hipofuncional (informação pessoal). Yoshida *et al.*, (2003) mostra a marcação para MMP-2 e TIMP-2 em molares de roedores utilizando imunohistoquímica. A marcação para MMP-2, na fase de campânula inicial, estava gradualmente restrita a aspectos basais das células epiteliais; na fase de campânula tardia MMP-2 estava presente no pólo apical de ameloblastos em diferenciação e fracamente em parte do epitélio dentário. Já TIMP-2, durante fase de botão, capuz e campânula, estava distribuída pelo mesênquima mandibular no lado lingual.

Yoshida e colaboradores (2003) verificaram a distribuição dos inibidores de MT1-MMP, TIMP-2 e -3, no lado lingual e labial de molares. No presente estudo, a intensidade de marcação para MT1-MMP mostrou-se aumentada no lado lingual, o que junto com os dados de Yoshida *et al.*, (2003), sugerem que os mecanismos reguladores da morfogênese dentária poderiam diferir entre o lado lingual e labial do dente.

Os genes para MT1-MMP e TIMP-2 estão co-expressos durante a embriogênese de camundongos, o que sugere uma via de regulação comum (Apte *et al.*, 1997), e um equilíbrio entre estas duas metaloproteinases, em condições de desenvolvimento normal.

É necessário investigar a distribuição de MMP-2 e TIMP-2 na região odontogênica de incisivos, em animais sob as mesmas condições, com a finalidade de melhor esclarecer os mecanismos de ação da tríade MT1-MMP+TIMP-2+MMP-2, durante o processo eruptivo.

No presente estudo, os resultados apresentados revelam importantes informações a respeito da proteína MT1-MMP, durante diferentes condições de erupção, podendo ser úteis no que diz respeito aos mecanismos de erupção dentária. A intensidade de marcação para MT1-MMP mostra diferenças nos grupos aqui estudados e sugere que essa intensidade acompanha a taxa de erupção segundo o tratamento realizado.

7. CONCLUSÃO

A condição funcional de erupção alterada (hipo, hiperfuncional e contido) modula a expressão da proteína MT1-MMP, na região odontogênica de incisivos de ratos, demonstrando que esta metaloproteinase pode ter um papel no mecanismo de erupção dentária.

REFERÊNCIAS*

Amar S, Karcher-Djuricic V, Meyer JM, Ruch JV. The lingual (root analogue) and the labial (crow analogue) mouse incisor dentin promotes ameloblast differentiation. *Arch Anat Microsc Morphol Exp.* 1987; 75: 229-239.

Apte SS, Fukai N, Beier DR, Olsen BR. The matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) gene is structurally distinct from other MMP genes and is co-expressed with the TIMP-2 gene during mouse embryogenesis. *J Biol Chem.* 1997; 272: 25511-25517.

Bartlett JD, Zhou Z, Skobe Z, Dobeck JM, Tryggvason K. Delayed tooth eruption in membrane type-1 matrix metalloproteinase deficient mice. *Connect Tiss Res.* 2003; 44 suppl 1: 300-304.

Beertsen W. Migration of fibroblasts in the periodontal ligament of the mouse incisor as revealed by autoradiography. *Arch Oral Biol.* 1975; 20: 650-666. *Apud* Michaeli Y, Steigman S, Yitschaky M, Weinreb M. The response of the fibroblast population in the periodontal ligament of the rat incisors to altered eruption rates. *J Periodontal Res.* 1986; 21(1): 86-94.

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

Beertsen W, Holmbeck K, Niehof A, Bianco P, Chrysovergis K, Birkedal-Hansen H, Everts V. Inhibition of molar eruption and root elongation in MT1-MMP-deficient mice. *Connect Tiss Res.* 2003; 44 Suppl. 1: 298-99.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodont Res.* 1993a; 28:500-10.

Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodont.* 1993b; 64: 474-84.

Chin JR & Werb Z. Matrix metalloproteinases regulate morphogenesis, migration and remodeling of epithelium, tongue skeletal muscle and cartilage in the mandibular arch. *Dev.* 1997, 124:1519-1530.

Cahill DR & Marks SCJr. Tooth eruption: Evidence for the central role of the dental follicle. *J Oral Pathol.* 1980; 9: 189-200.

Caron C, Xue J, Bartlett JD. Expression and localization of membrane type 1 matrix metalloproteinase in tooth tissues. *Matrix Biol.* 1998; 17: 501-511.

Cohn AS. Disuse atrophy of the periodontium in mice following partial loss of function. *Arch Oral Biol.* 1966; 11: 95-105. *Apud* Short E, Johnson RB. The effects of tooth eruption on adjacent alveolar bone and Sharpey's fibers of the rat periodontium. *Anat Rec.* 1990; 227:391-96.

De Souza AP, Da Silva RA, Da Silva MAD, Catanzaro-Guimarães AS, Line SRP. Matrix metalloproteinases. *Braz J Oral Sci.* 2005; 4(15): 884-890.

Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V. Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5. *Science.* 1997; 277: 225-228.

Goldberg M, Septier D, Bourd K, Hall R, Georg A, Goldberg H, Menashi S. Immunohistochemical localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in the forming rat incisor. *Connect Tiss Res.* 2003; 44: 143-153.

Gross J & Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci.* 1962; 48: 1014-1022.

Hernandez-Barrantes S, Toth M, Bernardo MM, Yurkova M, Gervasi DC, Raz Y *et al.* Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem.* 2000; 275(16):12080-89.

Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA *et al.* MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell.* 1999; 99:81-92.

Holmbeck K, Bianco P, Birkedal-Hansen H. MT1-MMP: a collagenase essential for tumor cell invasive growth. *Cancer Cell.* 2003; Aug: 83-84.

Hotary KB, Allen ED, Brooks PC, Datta NS, Long MW, Weiss SJ. Membrane type 1 matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. *Cell.* 2003; 114: 33-45.

Itoh Y & Seiki M. MT1-MMP: an enzyme with multidimensional regulation. *Trends Biochem Sci.* 2004; 29(6): 285-289.

Itoh Y & Seiki M. MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. *J Cell Physiol.* 2006; 206:1-8.

Itoh Y, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N *et al.* Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J.* 20(17): 4782-93. 2001.

Jones JL, Glinn P, Walker RA. Expression of MMP-2 e MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. *J Pathol.* 1999, 189: 161-168.

Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, Kinoh H *et al.* Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol.* 2001; 153: 893-904.

Kanoza RJ, Kelleher L, Sodek J, Melcher AH. A biochemical analysis of the effect of hypofunction on collagen metabolism in the rat molar periodontal ligament. *Arch Oral Biol.* 1980; 25(10):663-8.

Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol.* 1965; 27(2): 137-8.

Katchburian E & Arana V. *Histologia e embriologia oral.* 2. ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2004.

Kinoh H, Sato H, Tsunozuka Y, Takino T, Kawashima A, Okada Y *et al.* MT-MMP, the cell surface activator of proMMP-2 (pro-gelatinase A), is expressed with its substrate in Mouse tissue during embryogenesis. *J Cell Sci.* 1996, 109: 953-959.

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

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

Koshikawa N, Giannelli G, Cirulli V, Miyazaki K, Quaranta V. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J Cell Biol.* 2000; 148(3): 615-24.

Kumamoto H & Ooya K. Immunohistochemical detection of MT1-MMP, RECK, and EMMPRIN in ameloblastic tumors. *J Oral Pathol Med.* 2006; 35: 345-51.

Lee H, Overall CM, McCulloch CA, Sodek J. A critical role for the membrane type 1 matrix metalloproteinase in collagen phagocytosis. *Mol Biol Cell.* 2006; 17: 4812-26.

Lee H, Sodek KL, Hwang Q, Brown TJ, Ringuette M, Sodek J. Phagocytosis of collagen by fibroblasts and invasive cancer cells is mediated by MT1-MMP. *Biochem Soc Trans.* 2007; 35 (pt 4): 704-6.

Linsuwanont-Santiwong B, Takagi y, Ohya K, Shimokawa H. Expression of MT1-MMP during deciduos tooth resorption in odontoclasts. *J Bone Miner Metab.* 2006; 24: 447-53.

Marks SC Jr e Cahill DR. Experimental study in the dog of the non-active role of the root in the eruptive process. *Archs Oral Biol.* 1984; 29: 311-322.

Merzel J, Novaes PD, Furlan S. A histological study of root-resected and root-transected rat incisors when eruption ceases, shortly before they are exfoliated from the socket. *Arch Oral Biol.* 2000; 45(4): 315-322.

Michaeli Y, Zajicek G, Gineo I. Cell production in the normal and lathyrogenic rat periodontal ligament. *J Dent Res.* 1979; 58: 511-516. *Apud* Michaeli Y, Steigman S, Yitschaky M, Weinreb M. The response of the fibroblast population in the periodontal ligament of the rat incisors to altered eruption rates. *J Periodontal Res.* 1986; 21(1): 86-94.

Michaeli Y & Steigman S. Role of attrition and occlusal contact in the physiology of the rat incisor. III: Prevention of attrition and occlusal contact in the nonarticulating incisor. *J Dent Res.* 1968; 47: 633-640. *Apud* Steigman S, Michaeli Y, Yitzhaki M, Weinreb M. A three-dimensional evaluation of the effects of functional occlusal forces on the morphology of dental and periodontal tissues of the rat incisor. *J Dent Res.* 1989; 68: 1269-1274.

Michaeli Y, Steigman S, Yitschaky M, Weinreb M. The response of the fibroblast population in the periodontal ligament of the rat incisors to altered eruption rates. *J Periodontal Res.* 1986; 21(1): 86-94.

Murphy G & Willenbrock F. Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases. *Methods Enzimol.* 1995; 248: 496-510.

Nagase H & Woesser JRJr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999; 274: 21491-94.

Ohshima H, Nakasone N, Hashimoto E, Sakai H, Nakakura-Ohshima, Harada H. The eternal tooth germ is formed at the apical end of continuously growing teeth. *Arch Oral Biol.* 2005; 50: 153-157.

Ohuchi E, Imai K, Fuji Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem.* 1997; 272(4): 2446-2451.

Pasetto S. Distribuição do EGF, EGFr, TGF- β 1, IL-1 α e CSF-1 no periodonto de incisivos inferiores de ratos em condições funcionais de erupção normal e alterada. Estudo imunohistoquímico. [Tese] Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2005.

Pei D & Weiss SJ. Transmembrane-deletion mutants of the membrana-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix degrading activity. J Biol Chem. 1996; 271(15): 9135-40.

Sahlberg C, Reponen P, Tryggvason K, Thesleff I. Association between the expression of murine 72 kDa type IV collagenase by odontoblasts and basement membrane degradation during mouse tooth development. Arch Oral Biol. 1992; 37: 1021-30.

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

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

Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E *et al.* A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. Nature. 1994; 370(6484): 61-65.

Schwab W, Harada H, Goetz W, Nowicki M, WittM, Kasper M, Barth K. Immunocytochemical and biochemical detection of EMMPRIM in the rat tooth germ: differentiation-dependent co-expression with MMPs and co-localization with caveolin-1 in the membrane rafts of dental epithelial cells. Histochem Cell Biol. 2007; 128:195-203.

Seiki M. The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration. *Curr Opin Cell Biol.* 2002; 14:624-32.

Short E, Johnson RB. The effects of tooth eruption on adjacent alveolar bone and Sharpey's fibers of the rat periodontium. *Anat Rec.* 1990; 227:391-96.

Shour I & Massler M. The teeth. *In* Farris EJ & Griffith JQJR. Rat in laboratory investigation. 2 ed. New York: Hafner Publishing. 1971; 6: 105-135.

Silva MAJ, Merzel J. Alveolar bone Sharpey fibers of the rat incisor in normal and altered functional conditions examined by scanning electron microscopy. *Anat Rec.* 2004; 279: 792-97.

Stamenkovic I. Extracellular matrix remodeling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol.* 2003; 200: 448-464.

Steigman S, Michaeli Y, Yitzhaki M, Weinreb M. A three-dimensional evaluation of the effects of functional occlusal forces on the morphology of dental and periodontal tissues of the rat incisor. *J Dent Res.* 1989; 68:1269-1274.

Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem.* 1995; 270(10): 5331-5338.

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

Van den Bos T & Tonino GJM. Composition and metabolism of the extracellular matrix in the periodontal ligament of impeded and unimpeded rat incisors. *Archs Oral Biol.* 1984; 29:893-97.

Visse R & Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Cir Res.* 2003; 92: 827-839.

Vu TH & Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal phyology. *Genes & Dev.* 2000; 14: 2123-2133.

Wise GE, Lin F, Fan W. Localization of epidermal growth factor and its receptor in mandibular molars of the rat prior to and during prefunctional tooth eruption. *Dev Dyn.* 1992; 195: 121-126.

Yoshihara N, Yoshihara K, Stoetzel C, Perrin-Schmitt F, Cam Y, Ruch JV *et al.* Temporal gene expression and protein localization of matrix metalloproteinase and their inhibitors during mouse molar tooth development. *Dev Dyn.* 2003; 288: 105-123.

Zajicek G, Michaeli Y, Weinreb M M. Kinetics of the inner enamel epithelium in the adult rat incisor during accelerated eruption. *Cell Tissue Kinet.* 1972; 5: 35-39.

ANEXO



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

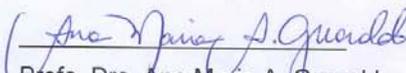
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1205-1, sobre "Distribuição de MT1-MMP na região odontogênica de incisivos inferiores de ratos em condições funcionais de erupção normal e alterada. Estudo imunohistoquímico", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes / Nádia Favez Omar, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em 27 de fevereiro de 2007.

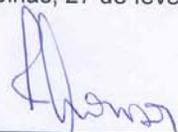
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1205-1, entitled "Analysis of the MT1-MMP in odontogenic region of lower incisors rat under normal and altered functions condition eruption. An imunohistochemistry study", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on February 27, 2007.

Campinas, 27 de fevereiro de 2007.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva