

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



ANA CLÁUDIA CARDOSO DE OLIVEIRA DEMARCHI

**EXPRESSÃO TEMPORAL E ESPACIAL DE RECK,
METALOPROTEINASE-2 E METALOPROTEINASE-9
DURANTE A PALATOGÊNESE EM CAMUNDONGOS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Ana Cláudia Cardoso de Oliveira
Demarchi
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para
obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional
e Molecular, área de concentração Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

Campinas, 2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

D391e

Demarchi, Ana Cláudia Cardoso de Oliveira
Expressão temporal e espacial de RECK,
metaloproteinase-2 e metaloproteinase-9 durante a
palatogênese em camundongos / Ana Cláudia Cardoso de
Oliveira Demarchi. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: José Mauro Granjeiro.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. RECK. 2. Metaloproteinase. 3. Palatogênese. 4.
Matriz extracelular. I. Granjeiro, José Mauro. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Temporal and spatial expression of RECK, metaloproteinase-2 and metaloproteinase-9 during palatogenesis in mice.

Palavras-chave em inglês: RECK; Metalloproteinases; Palatogenesis; Extracellular matrix.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: José Mauro Granjeiro, Hiroshi Aoyama, Sérgio Marangoni, Jesus Carlos Andreo, Maria das Graças da Silva Valenzuela.

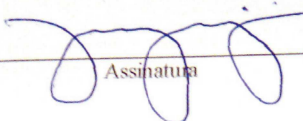
Data da defesa: 03/09/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

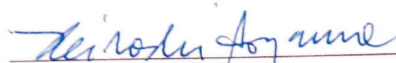
Campinas, 3 de setembro de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro (Orientador)
Instituto de Biologia da Unicamp


Assinatura

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama
Instituto de Biologia da Unicamp


Assinatura

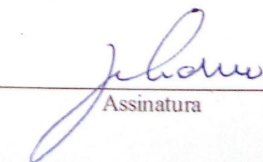
Prof. Dr. Sérgio Marangoni
Instituto de Biologia da Unicamp


Assinatura

Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes
Departamento de Patologia Bucal da USP – São Paulo


Assinatura

Profª. Dra. Maria das Graças da Silva Valenzuela
Instituto de Química da USP – São Paulo


Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novalles
Instituto de Biologia da Unicamp


Assinatura

Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo
Departamento de Anatomia da USP – Bauru

Assinatura

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira
Departamento de Bioquímica da USP - Bauru

Assinatura

“Se partires um dia rumo a Ítaca,
faze votos de que o caminho seja longo,
repleto de aventura, repleto de saber.
Nem Minotauros, nem Medusas,
nem o colérico Posídon te intimidem;
eles no teu caminho jamais encontrarás
se ativo for teu pensamento,
se sutil emoção teu corpo e teu espírito tocar.
Nem Minotauros, nem Medusas,
nem o bravo Posídon hás de ver,
se tu mesmo não os levars dentro da alma,
se tua alma não os puser diante de ti.
Tem todo o tempo Ítaca na mente.
Faze votos de que o caminho seja longo.
Estás predestinado a ali chegar.
Mas não apresses a viagem nunca.
Melhor muitos anos levars de jornada
e fundares na Ilha velho enfim,
rico de quanto ganhastes no caminho,
sem esperar riquezas que Ítaca te desse.
Uma bela viagem deu-te Ítaca.
Sem ela não te ponhas a caminho.
Mais do que isso não lhe cumpre dar-te.
Ítaca não te iludiu, se a achas pobre.
Tu te tornaste sábio, um homem de experiência
e agora sabes o que significa Ítaca.”

*Este trabalho é dedicado aos homens de minha vida,
companheiros inseparáveis desta fascinante viagem a Ítaca:
Luis César Demarchi, Arthur Demarchi e Henrique Demarchi.*

“Renova-te
renasce em ti mesmo.
Multiplica os teus olhos, para verem mais.
Multiplica os teus braços para semeares tudo.
Destrói os olhos que tiverem visto.
Cria outros para visões novas.
Destrói os braços que tiverem semeado,
para esquecerem de colher.
Sê sempre o mesmo.
Sempre outro.
Mas sempre alto.
Sempre longe.
E dentro de tudo”.

CECÍLIA MEIRELES

*Ao Prof. José Mauro Granjeiro,
minha eterna gratidão.*

AGRADECIMENTOS

Aos amigos do grupo de imunoistoquímica: William, Kati e Thais, pelos bons e maus momentos.

Aos amigos do grupo de zimografia: Rodrigo, Wilson e Érica, pela persistência, diria teimosia.

À Prof^a. Dr^a. Ana Paula de Souza Pardo e Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara, pelas orientações em zimografia e imunoistoquímica.

Ao Prof. Dr. Hiroshy Aoyama, pela confiança em mim depositada.

Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes, por ter aberto as portas de seu laboratório para a realização das reações de hibridização *in situ*.

À Prof^a. Dr^a. Maria da Graça da Silva Valenzuela, pela dedicação ao trabalho e por nunca ter desistido. E, principalmente, por se tornar minha amiga.

À Prof^a. Dr^a. Mari Cleide Sogayar e Rita de Cássia Sávio Figueira, pela ajuda no PCR em tempo real.

Aos departamentos de Bioquímica, Histologia, Anatomia e Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, onde desenvolvi a maior parte deste estudo. Em especial, ao Prof. Dr. Jesus Andreo, Tânia e Erasmo.

Ao Instituto do Câncer Amaral Carvalho, que gentilmente providenciou tecidos de câncer de mama para serem usados como padrão positivo nas reações de imunoistoquímica.

Aos integrantes da banca de qualificação e defesa, por tão prontamente se disporem em participar deste processo.

Ao amigo Renato Valderramas, pela colaboração na diagramação deste trabalho.

A todos os funcionários do Laboratório de Análises e Pesquisas Clínicas da Fundação Veritas, que entenderam e relevaram a minha ausência em diversos momentos.

Aos amigos da VIVER, por me ajudarem nos momentos mais difíceis desta minha jornada, a entender “*não a explicação (duvidosa) da vida, mas a poesia (inexplicável) da vida!*”.

E como não poderia deixar de ser, a Papai e Mamãe, por tudo!

Muito obrigada a todos!

“Dê-me, Senhor,
agudeza para entender,
capacidade para reter,
método e faculdade para aprender,
sutileza para interpretar,
graça e abundância para falar.

Dê-me, Senhor,
acerto ao começar,
direção ao progredir
e perfeição ao concluir.”

SÃO TOMÁS DE AQUINO

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Tese elaborada de acordo com Resolução da Comissão Central da Pós-Graduação da Universidade Estadual de Campinas CCPG/002/06, publicada em 13 de setembro de 2006.

Itens não previstos pela Resolução da CCPG/002/06, referentes à numeração progressiva das seções, citações apresentadas no texto e elaboração das referências bibliográfica foram normatizados de acordo com as Normas Brasileiras da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6024:2003; 10520:2002 e 6023:2002).

RESUMO

As fissuras orais exercem uma profunda influência sobre a vida de seus portadores. Esses indivíduos apresentam, desde o nascimento, dificuldades na alimentação, distúrbios ósseos maxilar e mandibular, na arcada dentária, na fala e, em alguns casos, na audição. Além disto, fissurados e seus familiares enfrentam sérios problemas psicológicos decorrentes do comprometimento estético causado pela anomalia. Sem dúvida alguma, a morfogênese do palato secundário é um dos pontos mais críticos na formação da face e do palato. Depende de uma sequência complexa de eventos que possuem em comum o remodelamento de matriz extracelular (MEC), regulado, principalmente, pelas metaloproteinases de matriz (MMPs). Esta é a primeira vez que RECK, uma proteína indutora da reversão tumoral, rica em cisteína e com motivos kazal, é pesquisada neste processo. O primeiro objetivo deste estudo foi investigar se há expressão de RECK durante os eventos envolvidos na formação do palato secundário em camundongos. A partir dos resultados obtidos, indicando a presença de RECK nesses eventos, objetivou-se estabelecer um padrão temporal e espacial dessa expressão, assim como analisar o padrão de distribuição de MMP-2 e MMP-9, comparando os resultados obtidos entre si. Para tanto, cabeças inteiras e palatos dissecados de embriões de camundongos com 13; 14; 14,5 e 15 dias de desenvolvimento embrionário (DE) foram submetidos a reações de PCR em tempo real, hibridização *in situ*, imunoistoquímica e zimografia. As reações de PCR em tempo real indicaram a presença de mRNA de RECK (mRECK) em todos os períodos analisados, os níveis do transcrito aumentaram gradativamente e foram significativamente diferentes entre 13 e 15DE e entre 14 e 15DE. Os resultados de hibridização *in situ* e imunoistoquímica apontaram, consecutivamente, um padrão variável de distribuição de mRECK e da proteína RECK no mesênquima, epitélio e linha de junção (LJ) formada entre as paredes palatais, no transcorrer dos períodos analisados. Com relação ao padrão de expressão das MMPs, a análise imunoistoquímica revelou a presença de MMP-2 no mesênquima, epitélio e LJ em todos os períodos. A MMP-9 foi expressa no 14DE, 14,5DE e 15DE na LJ e mesênquima palatal. A análise zimográfica confirmou a atividade de MMP-2 e MMP-9. Dessa forma, concluímos que RECK está presente nos principais eventos de formação do palato secundário, apresentando um padrão de expressão variável no tempo e espaço, que quando comparado ao padrão de

expressão de MMP-2 e MMP-9 apresentam, na maioria das vezes, similaridades entre si. Esses achados sugerem um provável envolvimento dessas moléculas na organogênese do palato secundário e uma possível interação/modulação entre elas.

Palavras-chave: RECK. Metaloproteinase de matriz-2. Metaloproteinase de matriz-9. Palatogênese. Matriz extracelular. Fissuras palatais.

ABSTRACT

The oral clefts show a great influence in the size of their hosts. They have, since birth, difficulties in alimentation, problems in the maxilar bones, in dental arch, in speech, and in some cases, in hearing. In addition, the hosts and their families have serious psychological problems due to the esthetic length caused by anomalia. With no doubt, the formations of the secondary palate is one of the most critical phases during the formation of the surface and of the palate. Depending on a sequence of complex events that have in common the remodeling of the extracellular matrix (ECM), mainly regulated by matrix metalloproteinases (MMPs). This is first time that the presence of RECK, a reversion-inducing cystein-rich protein with kazal motifs, this process is researched. The first objective of this study was to investigate the RECK expression during events involved in formation of the secondary palate in mice. Based on the results obtained, which indicated the presence of RECK in these events, the objective was to establish a temporal and spatial pattern of such expression, as well as to analyze the pattern of distribution of MMP-2 and MMP-9, comparing the results obtained to each other. For that purpose, whole heads and dissected palates of mice aged 13, 14, 14.5 and 15 days of embryonic development (ED) were submitted to real-time PCR, *in situ* hybridization, immunohistochemistry and zymography. The real-time PCR indicated the presence of mRNA of RECK (mRECK) in all periods analyzed; the transcript levels were gradually increased and were significantly different between 13 and 15ED and between 14 and 15ED. The results of *in situ* hybridization and immunohistochemistry consecutively indicated a variable pattern of distribution of mRECK and RECK protein in the mesenchyme, epithelium and in midline edge seam (MES) formed between the palatal shelves during the study periods. With regard to the pattern of expression of MMPs, immunohistochemical analysis revealed the presence of MMP-2 in the mesenchyme, epithelium and MES in all periods. The MMP-9 was expressed in the MES and palatal mesenchyme at 14ED, 14.5ED and 15ED. Zymographic analysis confirmed the activity of MMP-2 and MMP-9. Therefore, it was concluded that RECK is present in the main events of formation of the secondary palate, presenting a variable pattern of expression along time and space, which often present similarities to each other compared to the pattern of expression of MMP-2 and MMP-9. These findings suggest probable involvement of these molecules in the formation of the secondary palate and possible interaction/modulation among them.

Key words: RECK. Matrix metalloproteinase-2. Matrix metalloproteinase-9. Palatogenesis. Extracellular matrix. Cleft palate.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Visão dorsal de embrião humano no estágio 10 de Carnegie. Dobramento da região cefálica e caudal..... 26
- Figura 2: A. Visão dorsal lateral de embrião humano no estágio 11 de Carnegie. O dobramento da extremidade cefálica e caudal é mais proeminente. B. Visão dorsal de embrião de camundongo com 8 dias de gestação, período correspondente, em humanos, ao estágio 11 de Carnegie. As setas apontam o sentido do fechamento do tubo neural..... 27
- Figura 3: Localização dos dois primeiros pares de arcos branquiais, do estomodeo e da proeminência frontonasal. 28
- Figura 4: Visão lateral de embrião de camundongo com 9 dias de gestação, período correspondente, em humanos, ao estágio 12 de Carnegie. O primeiro e o segundo pares de arcos branquiais são evidentes..... 28
- Figura 5: Visão lateral de embrião de camundongo com 10 dias de gestação, período correspondente, em embrião humano, ao estágio 12 de Carnegie. Processos maxilar e mandibular 29
- Figura 6: A. Visão frontolateral de embrião humano no estágio 13 de Carnegie. O primeiro, segundo, terceiro e quarto pares de arcos branquiais são visíveis externamente. O quinto par é uma estrutura transitória e o sexto não forma elevação externa... 29
- Figura 6: B. Visão frontal de embrião humano, ainda no estágio 13 de Carnegie. Placóide olfativo. 30
- Figura 7: Visão frontal de embrião de camundongo com 10 dias de gestação, período correspondente, em humanos, ao estágio 13 de Carnegie. Lábio inferior. Localizado acima do estomodeo e, em rápido crescimento, observa-se a região frontonasal..... 30

- Figura 8: Visão frontal de embrião de camundongo com 10 dias de gestação, período correspondente, em humanos, ao estágio 13 de Carnegie. Placóides olfativos..... 31
- Figura 9: Visão frontal de embrião de camundongo com 10 dias de gestação, período correspondente, em humanos, ao estágio 14/15 de Carnegie. Fosseta nasal..... 31
- Figura 10: Visão frontal de embrião de camundongo com 11 dias de gestação, período correspondente, em humanos, ao estágio 16 de Carnegie. O processo maxilar cresce no sentido medial da face. 32
- Figura 11: Visão frontal de embrião humano no estágio 17 de Carnegie. A união dos processos nasal lateral, nasal medial e maxilar forma o nariz. 32
- Figura 12: Contribuição de cada um dos processos na formação da face. 32
- Figura 13: Um corte entre o processo mandibular e maxilar, em embriões de camundongos com 12 dias, em humanos, estágio 18/19 de Carnegie, permite a visualização do palato primário..... 33
- Figura 14: A. Corte frontal de embrião de camundongo com 14 dias de gestação, correspondente, em humanos, ao estágio 20 de Carnegie. As paredes palatais crescem verticalmente, posicionando-se ao lado da língua. B. Ilustração do crescimento vertical das paredes palatais. 33
- Figura 15: A. Corte frontal de embrião de camundongo com 14 dias de gestação, correspondente, em humanos, ao estágio 21 de Carnegie. As paredes palatais assumem a posição horizontal. B. Corte entre a mandíbula e a maxila, mostrando a horizontalização das paredes palatais. 34
- Figura 16: Corte entre a mandíbula e a maxila de embrião de camundongo com 14,5 dias de gestação, correspondente, em humanos, ao estágio 21/22 de Carnegie. Formação da Linha de Junção..... 34
- Figura 17: Corte entre a mandíbula e a maxila de embrião de camundongo com 15 dias de gestação, correspondente, em humanos, ao estágio 23 de Carnegie. Observa-se que toda a extensão da LJ já foi degradada, formando um único órgão..... 34
- Figura 18: Ilustração de uma palatogênese bem sucedida..... 35
- Figura 19: A fissura pré-forame incisivo pode atingir somente o lábio, ou o lábio e a região anterior do palato. A. Fissura pré-forame incisivo unilateral incompleta. B. Fissura pré-forame incisivo unilateral completa. C. Fissura pré-forame incisivo bilateral completa. 35

Figura 20: A. Fissura transforame incisivo unilateral. B. Fissura transforame incisivo bilateral.	36
Figura 21: A. Fissuras pós-forame incisivo incompleta. B. Fissura pós-forame incisivo completa	36
Figura 22: Principais eventos de formação do palato secundário. A. Crescimento vertical das paredes palatais. B. Reorientação e crescimento das paredes palatais. C. Adesão e formação da LJ. D. Completa degradação da LJ, originando um único órgão... 37	37
Figura 23: A. Domínio estrutural das MMPs. B. Classificação das MMPs de acordo com suas características estruturais.	42
Figura 24: O mecanismo da cisteína “switch” regula a ativação das MMPs.	42
Figura 25: Mecanismos regulatórios das MMPs.	42
Figura 26: A. A MT1-MMP ancorada à membrana celular atua como um receptor para a TIMP-2. B. Grandes quantidades de TIMP-2 satura todas as moléculas de MT1-MMP.	45
Figura 27: Rede de ativação de pró-MMP-9 por outras MMPs a partir da plasmina.	46
Figura 28: Organização estrutural da proteína RECK humana.	48
Figura 29: Regulação da atividade de MMPs por RECK. A. RECK inibição a atividade de MMP-9 por impedir sua secreção ou por bloquear a sua ligação com substratos. B. RECK solúvel ou ancorado à membrana inibe a ação de MT1-MMP, impedindo sua ligação com o complexo MT1-MMP/TIMP-2/pró-MMP-2 ou com seus substratos. C. RECK inibe a atividade de MMP-2 por impedir a liberação de sua forma ativa a partir do complexo MT1-MMP/TIMP-2/pró-MMP-2 ou por inibir a ligação da forma ativa aos seus substratos.	49
Figura 30: Mecanismos de modulação negativa de RECK via Ras. A. A transcrição do gene RECK se inicia no sítio designado +1. B. Modulação de modificação pós-translacional de Sp1/Sp3, tais como fosforilação e/ou glicosilação. C. Modulação de proteínas regulatórias que controlam a atividade transcrricional de Sp1/Sp3. D. Modulação da interação entre Sp1/Sp3 e suas proteínas regulatórias por modificações pós-translacional de Sp1/Sp3.....	51
Figura 31: Divisão esquemática das regiões da parede palatal. Ilustração de parede palatal de camundongos com: A. 13DE. B. 14DE. C. 14,5DE. D. 15DE.	61

- Figura 32: Cortes histológicos de 5µm de espessura, corados com HE, provenientes da parede palatal de camundongos com 13DE. A. Crescimento vertical das paredes palatais. B. A membrana basal apresenta uma ou duas camadas de células epiteliais. C. Curvatura localizada na região oral do epitélio da parede palatal. D. O germe dentário 62
- Figura 33: Cortes histológicos de 5µm de espessura, corados com HE, provenientes da parede palatal de camundongos com 14DE. A. Horizontalização e formação da LJ entre as duas paredes palatais. B. A região mx do mesênquima palatal começou a desenvolver sítios osteogênicos..... 63
- Figura 34: Cortes histológicos de 5µm de espessura, corados com HE, provenientes da parede palatal de camundongos com 14,5DE. A-B. Degradação da LJ. C. Triângulo epitelial..... 64
- Figura 35: Cortes histológicos de 5µm de espessura, corados com HE, provenientes da parede palatal de camundongos com 15DE. A. A LJ foi completamente degradada. B. Formação do palato secundário. 64
- Figura 36: Análise da expressão relativa de mRECK por PCR em tempo real. 66
- Figura 37: Cortes histológicos de 10µm de espessura, provenientes da parede palatal de camundongos, submetidos a reação de hibridização *in situ* para mRECK. A. 13DE. B. 14DE. C. 14,5DE. D. 15DE. 66
- Figura 38: Cortes histológicos de 5µm de espessura, provenientes da parede palatal de camundongos, submetidos a reação de imunoistoquímica para os anticorpos RECK, MMP-2 e MMP-9. A. 13DE/RECK. B. 14DE/RECK. C. 14,5DE/RECK. D. 15DE/RECK E. 13DE/MMP-2. F. 14DE/MMP-2. G. 14DE/MMP-2. H. 15DE/MMP-2. I. 13DE/MMP-9. J. 14DE/MMP-9. K. 14,5DE/MMP-9. L. 15DE/MMP-9. 67
- Figura 39: Análise zimográfica de MMP-2 e MMP-9. A. Eletroforese em gel. B. A concentração relativa de MMP-2 e MMP-9 variam de forma significativa entre os períodos analisados. 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Metaloproteinases de matriz identificadas no genoma humano e seus substratos.	41
Tabela 2: Ativadores diretos e indiretos da MMP-9.	47

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.:	Antes de Cristo
AP:	“Activator protein ” ou proteína ativadora
Bmp:	“Bone morphogenetic protein” ou proteína osteomorfógena
BSA:	“Bovine serum albumin” ou albumina de soro bovino
C/EBP:	“CCAAT enhancer binding protein” ou região de ligação à proteínas
c:	Região central do mesênquima da parede palatal
CAAT Box:	Seqüência de DNA conservada constituinte do promotor de genes eucarióticos. Assim denominada devido à presença GGCCAATCT, a qual se encontra
cDNA:	“Complementary desoxyribonucleid acid” ou ácido desoxirribonucléico complementar
CME:	Crista média epitelial
c-myc:	“Cell myelocytomatosis” ou mielocitomatose celular
CREb:	“cAMP response element binding protein” ou proteína de ligação ao elemento de resposta do cAMP
Ct:	“Threshold cycle” ou ciclo onde a fluorescência encontra-se acima do background
CT124:	cDNA que codifica um fragmento carboxi terminal da proteína Mxs-2
d.C.:	Depois de Cristo
DAB:	Diaminobenzidina
DE:	Dias de desenvolvimento embrionário
DNA:	“Desoxyribonucleid acid” ou ácido desoxirribonucléico
dNTP:	Desoxinucleotídeo
DTT:	Ditiotreitol
ECM:	“Extracellular matrix” ou matriz extracelular
ED:	“Days of embryonic development” ou dias de desenvolvimento embrionário
EDTA:	“Ethilene diamine tetra acetic acid” ou ácido etilenodiaminotetracético
ERK:	“Extracellular-regulated kinase” ou quinase reguladora de sinal extracelular
Ets:	“Endothelins” ou endotelinas
GAP:	“GTPase activating protein” proteína de ativação da GTPase
GAPDH:	“Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase” ou 3-fosfato desidrogenase

gd:	Germe dentário
Gli:	“Glioma-associated oncogene homolog” ou oncogenes homólogo associado ao glioma
GPI:	“Glycosylphosphatidyl-inositol” ou glicosilfosfatidilinositol
Ha-ras:	“Harvey rat sarcoma oncogene homolog” ou sarcoma oncogenes homólogo
HE:	Hematoxilina eosina
Hoxa2:	Homeo box A2
IgG:	Imunoglobulina G
l:	Região lateral do mesênquima da parede palatal
Lhx8:	“LIM/homeo box protein 8” ou proteína LIM/homeobox 8
LJ:	Linha de junção
M:	Região média do epitélio da parede palatal
m:	Região medial do mesênquima da parede palatal
MAPK:	“Mitogen activated protein kinase” ou proteína quinase ativada por mitógenos
md:	Região midoral do mesênquima da parede palatal
MEC:	Matriz extracelular
MEE:	“Medial edge epithelium” ou crista média epitelial
MES:	“Midline epithelial seam” ou linha de junção epitelial
MLH:	“Micronuclear linker histone” ou proteína nuclear do tipo histona
MMPs:	“Matrix metalloproteinases” ou metaloproteinases de matriz
mRECK:	Ácido ribonucleico mensageiro de “Reversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs”
mRNA:	“Messenger ribonucleic acid” ou ácido ribonucleico mensageiro
Msx:	“Muscle-segmente homeobox ” ou homeobox de seguimento muscular
MT-MMP:	“Transmembrane matrix metalloproteinase” ou metaloproteinase transmembrana
mx:	Região maxilar do mesênquima da parede palatal
N:	Região nasal do epitélio da parede palatal
n:	Região nasal do mesênquima da parede palatal
NF-kB:	“nuclear factor kappa B” ou fator nuclear kappa B
NOTCH2:	“Notch homolog 2” membro da família de receptores Notch
NTMT:	Solução composta por cloreto de sódio, tris-ácido clorídrico, cloreto de magnésio e tween
O:	Região oral do epitélio da parede palatal
OMS:	Organização Mundial da Saúde
Osr2:	“Odd-skipped-related 2”
p53:	“Tumor protein p53” ou proteína responsável pela integridade do código genético de cada célula
Pax9:	“Paired box gene 9”, fator de transcrição Pax9

PBS:	“Phosphate buffered saline” ou tampão fosfato salino
PBT:	Tampão salino contendo PBS e tween 20
PCR:	“Polimerase chain reaction” ou reação de polimerase em cadeia
PEA3:	“Polyomavirus enhancer activator 3”, membro da família do ETs gene
PMSF:	“Phenil methyl sulfonil fluoride” ou fluoreto de fenil metil sulfonil
Pró-MMP:	Pró-metaloproteinase
Rac:	Pequena Gtpase, proteínas de ligação a GTP
Raf:	Serina-treonina quinase implicada na sinalização de crescimento e sobrevivência celular.
Ras:	“Rat sarcoma vírus”, proteína G de baixo peso molecular
RECK:	“Reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs” ou proteína rica em cisteína com motivos Kazal, indutora de reversão tumoral
Rho:	Proteínas de ligação à GTP
Rnase:	Ácido ribonuclease
SDS:	“Sodium dodecyl sulfate” ou Dodecil sulfato de sódio
Shh:	“Sonic hedgehog”, proteína de sinalização
Sp:	“Sp transcription factor” ou fator de transcrição sp
SPI-like:	Tipo serina proteases
SSC:	Solução salina contendo citrato de sódio
TBS:	Tampão salino tris-HCl
TBST:	Tampão salino tris mais tween
TE:	Tampão tris-EDTA
Tgf:	“Transforming growth factor (α ou β)” ou fator transformador de crescimento
TIMP:	“Tissue inhibitors metalloproteinases” ou inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz
TNF α :	“Tumor necrosis factor α ” ou Fator α de necrose tumoral
TPA:	“Tetradecanoylphorbol acetate”
UAI:	Unidade arbitrária de intensidade upstream a 75 nucleotídeos antes do sítio de iniciação da transcrição local
v-fes:	“Feline sarcoma virus”, oncogene homólogo
v-fms:	“Feline sarcoma virus”, oncogene homólogo (Susan McDonough)
v-fos:	“Osteosarcoma vírus”, oncogene que atua como regulador da expressão gênica
v-mos:	Oncogene viral
v-src:	Oncogene viral
YB-1:	“Y box binding protein 1”

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
2. REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1 Morfogênese palatal	26
2.2 Mecanismos moleculares envolvidos na palatogênese.....	37
2.2.1 Crescimento das paredes palatais	37
2.2.2 Mecanismos responsáveis pela elevação das paredes palatais.....	38
2.2.3 Fusão e degradação da linha de junção	39
2.3 Metaloproteinases de matriz	39
2.4 Reck.....	47
3. OBJETIVOS.....	52
4. MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1 Animais.....	53
4.2 Análise microscópica	53
4.3 Reação de cadeia de polimerase em tempo real	54
4.3.1 Preparação do RNA total.....	54
4.3.2 Ensaios de PCR em tempo real	54
4.4 Hibridização <i>in situ</i>	54
4.5 Imunoistoquímica	59
4.6 Análise Zimográfica.....	60
5. RESULTADOS	61
5.1 Análise Histológica.....	61
5.2 PCR em tempo real	65
5.3 Hibridização <i>in situ</i>	65
5.4 Imunoistoquímica.....	65
5.5 Zimografia	68
6. DISCUSSÃO	70

7. CONCLUSÃO.....	77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
9. ANEXO.....	91
9.1 Curriculum Lattes	91

INTRODUÇÃO

As fissuras orais exercem uma profunda influência sobre a vida de seus portadores. De tal forma que, desde tempos remotos, o homem tem buscado compreender e sanar esse problema. As primeiras evidências de fissuras foram observadas em estátuas egípcias que datam de 2.400 a.C., e o primeiro tratamento cirúrgico documentado ocorreu em 390 d.C., realizado por um físico chinês que ficou conhecido como Doutor dos Lábios (RIBEIRO; MOREIRA, 2005).

Trata-se de uma anomalia que, além dos transtornos psicológicos causados pelo comprometimento estético, ocasiona transtornos funcionais importantes, como dificuldades na alimentação, problemas dentários e fonoaudiológicos. Os indivíduos portadores de fissuras orais e seus familiares sofrem um significativo estresse de ordem física, emocional e social (SANDRINI et al., 2006).

A alta incidência das fissuras orais ou lábio-palatais constitui outra preocupação. São as malformações mais comuns de todas as anomalias congênitas da face, podendo ocorrer um caso a cada 600 nascimentos, o que significa que a cada 2,5 minutos nasce uma criança portadora desse defeito no mundo (MOSSEY; LITTLE, 2002). Dados sobre a incidência de fissuras lábio-palatais na população brasileira são escassos e dispersos. Segundo a OMS (2002), no Brasil há 13,9 casos a cada 10.000 nascimentos (aproximadamente 1/720), no entanto, outras referências citam a ocorrência de um caso dentre 650 nascimentos (VASCONCELOS et al., 2002; FIGUEIREDO et al., 2004; SILVA; FURIA; DI NINNO, 2005). O índice de mortalidade no primeiro ano de vida é de 30% devido à desinformação médica e familiar (NEVES; MONTEIRO; GIWA, 2002).

A etiologia das fissuras ainda não é bem conhecida, acredita-se que seja multifatorial, envolvendo causas genéticas, ambientais, nutricionais, tóxicas, infecciosas e psíquicas (MURRAY; SCHUTTE, 2004; RICE et al., 2004; HRUBEC et al., 2006; SANDRINI et al., 2006). Entretanto, sabe-se que qualquer alteração durante o processo embrionário de formação da face e palato pode levar à fissura.

A embriogênese da face e da cavidade bucal consiste em uma série dinâmica de etapas, envolvendo processos moleculares, celulares e teciduais relacionados entre si. Inicia-se no terceiro mês de vida intra-uterina e prossegue até o quarto mês. O ponto mais crítico é a formação do palato secundário, que chama a atenção por depender de um complexo meca-

nismo que engloba a elevação e fusão das paredes palatais, seguida pela degradação da linha de junção (LJ) formada entre elas (FERGUSON, 1988). Essas etapas cruciais envolvidas na palatogênese são dependentes do controle do ciclo de renovação das macromoléculas presentes na matriz extracelular (MEC) da parede palatal.

Os componentes da MEC são degradados por enzimas proteolíticas secretadas localmente pelas células. A maioria dessas enzimas pertence a uma das duas classes gerais de proteases: as metaloproteinases de matriz (MMPs) e as serina proteases, sendo que as MMPs, coletivamente, são capazes de degradar todos os componentes da MEC (MURPHY; REYNOLDS, 1993).

Uma das formas de controle da ação das MMPs é a inibição direta da sua atividade. Até hoje, os inibidores mais estudados foram os Inibidores Teciduais de MMPs (TIMPs). Recentemente, foi descoberta uma proteína que é expressa largamente em tecidos normais e pouco expressa em células tumorais. Essa proteína e o seu gene foram denominados de RECK – *Reversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs*. Sabe-se que o RECK atua de forma negativa sobre três MMPs: MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP (TAKAHASHI et al., 1998). Ainda são poucos os estudos envolvendo essa proteína em condições fisiológicas, em especial na organogênese, ou patológicas.

Dessa forma, considerando que a elaboração de estratégias para prevenir fissuras palatais é dependente de um profundo conhecimento dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos na palatogênese, investigamos o padrão de expressão da proteína RECK e seu mRNA durante a elevação e fusão das paredes palatais, bem como a expressão de MMP-2 e MMP-9.

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MORFOGÊNESE PALATAL

A formação e desenvolvimento do palato é um dos mais complexos eventos da embriogênese. Inicia-se, em humanos, entre a terceira e quarta semana de gestação como consequência do dobramento do embrião ao longo do eixo cefálo-caudal e lateral (Figuras 1 e 2).

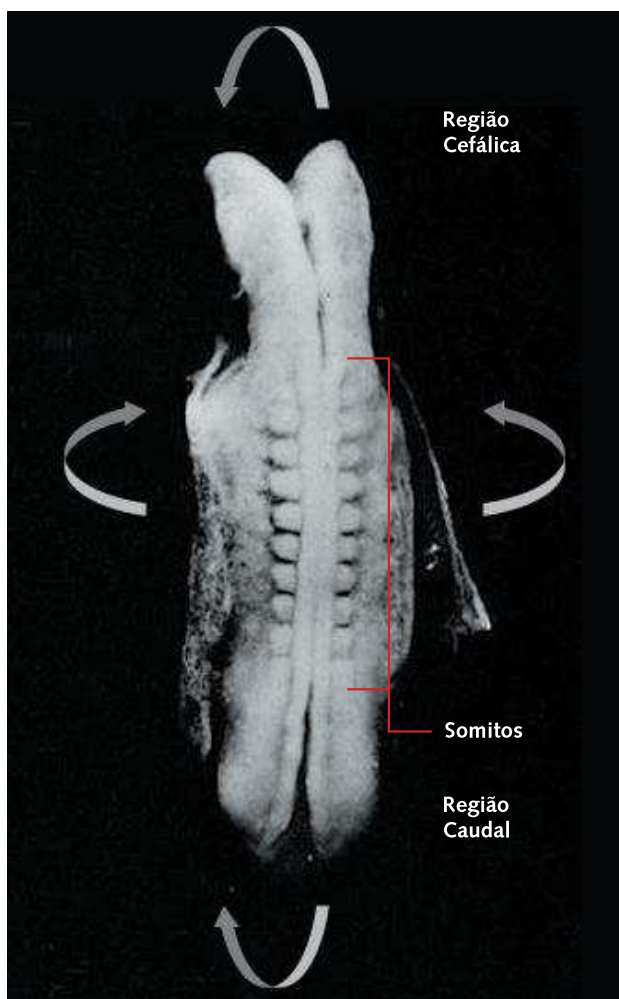


FIGURA 1: Visão dorsal de embrião humano no estágio 10 de Carnegie¹ (22/23 dias). O embrião ainda tem aparência ereta, no entanto, percebe-se uma leve curvatura na região cefálica e na caudal. As setas indicam o sentido do dobramento. O tubo neural se encontra fechado na região dos somitos e aberto nas extremidades anterior e posterior.

Fonte: Figura adaptada do site <http://embryology.med.unsw.edu.au/www/human/Stages/Stage10.htm>. Acesso em: 30 abr. 2007.

¹ Sistema usado para descrever a aparente maturidade dos embriões. Não depende da idade cronológica e/ou tamanho, mas sim da aparência externa e interna do embrião. Sistema desenvolvido por Franklin P. Mall, no Instituto Carnegie, Washington, em meados de 1900.

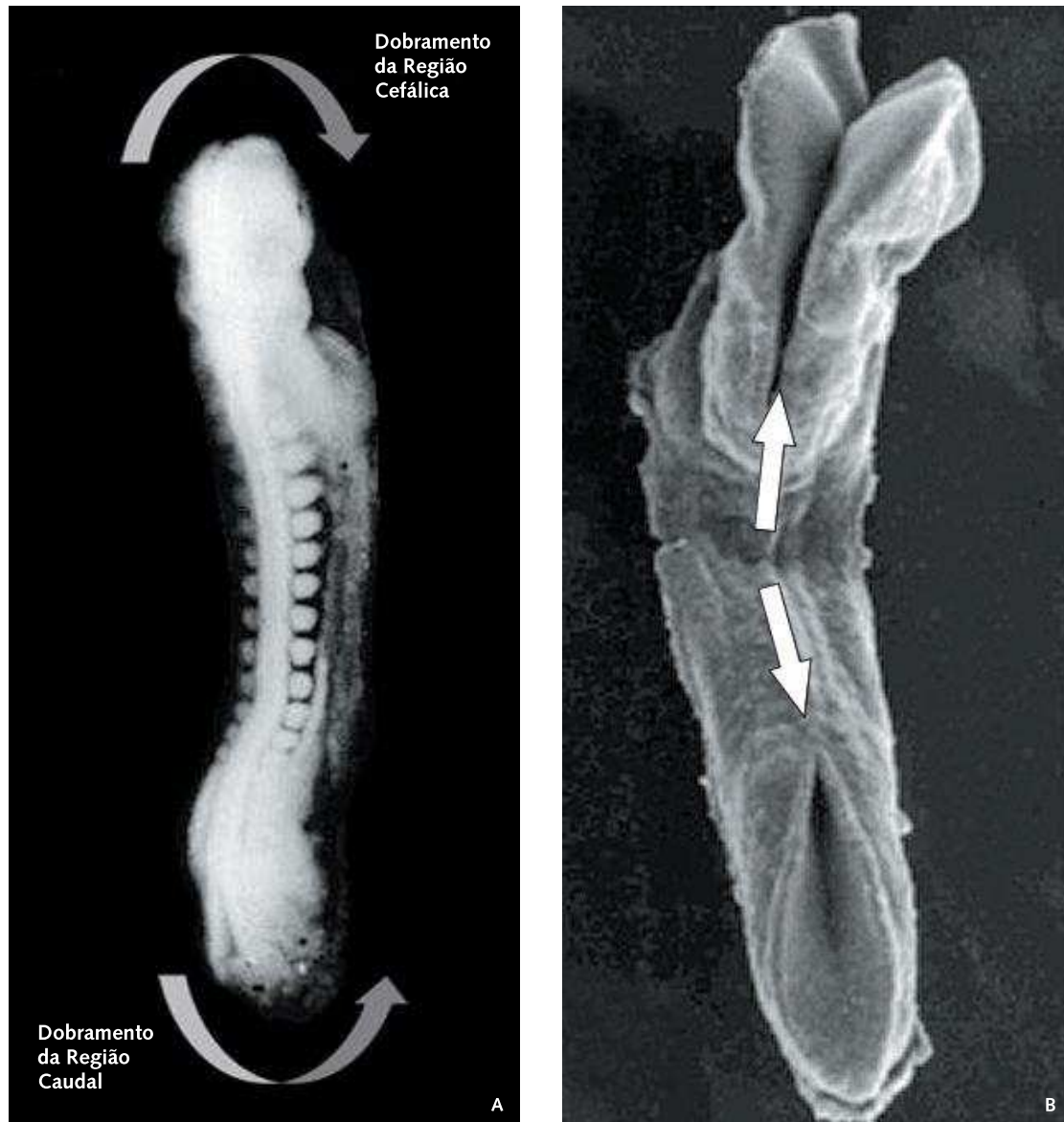


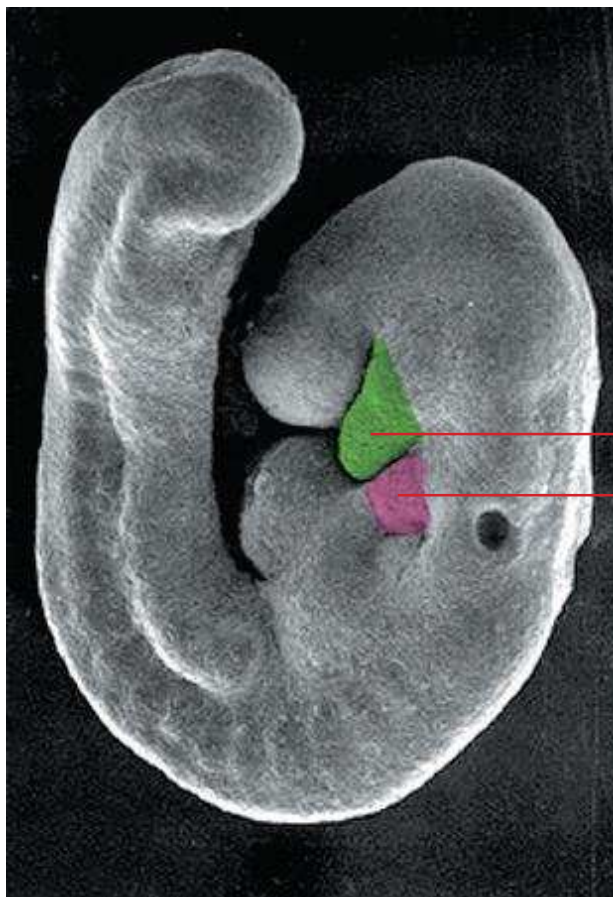
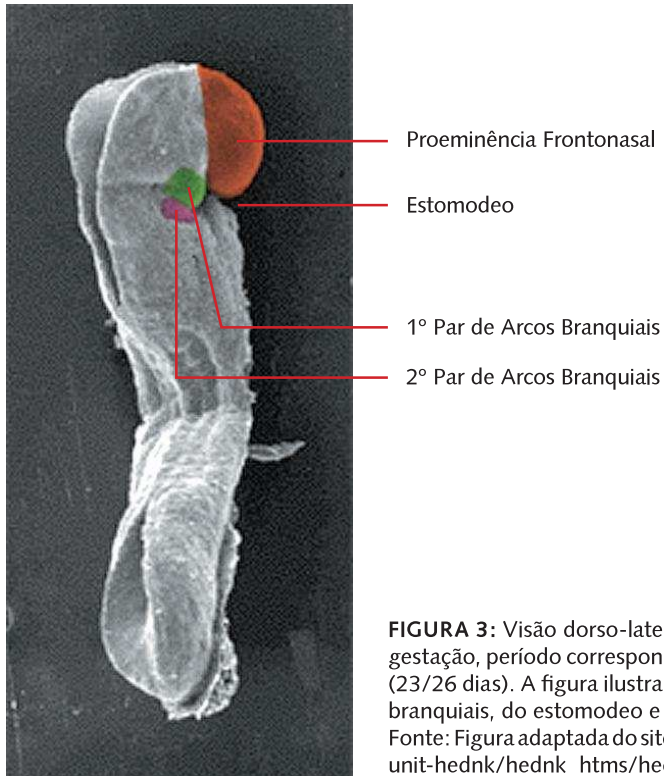
Figura 2: A. Visão dorsal lateral de embrião humano no estágio 11 de Carnegie (23/26 dias). O tubo neural continua fechando, tanto na extremidade posterior quanto na anterior. O estomodeo, o primeiro e segundo pares de arcos branquiais já estão formados. O dobramento da extremidade cefálica e caudal é mais proeminente. B. No detalhe, visão dorsal de embrião de camundongo com 8 dias de gestação, período correspondente, em humanos, ao estágio 11 de Carnegie. As setas apontam o sentido do fechamento do tubo neural.

Fonte A: Figura adaptada do site: <http://embryology.med.unsw.edu.au/wwwhuman/Stages/Stage11.htm>.

B: Figura adaptada do site: http://www.med.unc.edu/embryo_images/unit-bdyfm/bdyfm_https/bdyfm016.

Acesso em: 30 abr. 2007.

O dobramento da extremidade cefálica dá origem ao estomodeo, uma depressão rasa, de natureza ectodérmica, que formará a cavidade oral. Delimitando o estomodeo, ocorre a formação dos dois primeiros pares de arcos branquiais, que são elevações arredondadas resultantes da proliferação do mesoderma lateral da parede faríngea (Figuras 3 e 4. MOORE; PERSAUD, 2004).



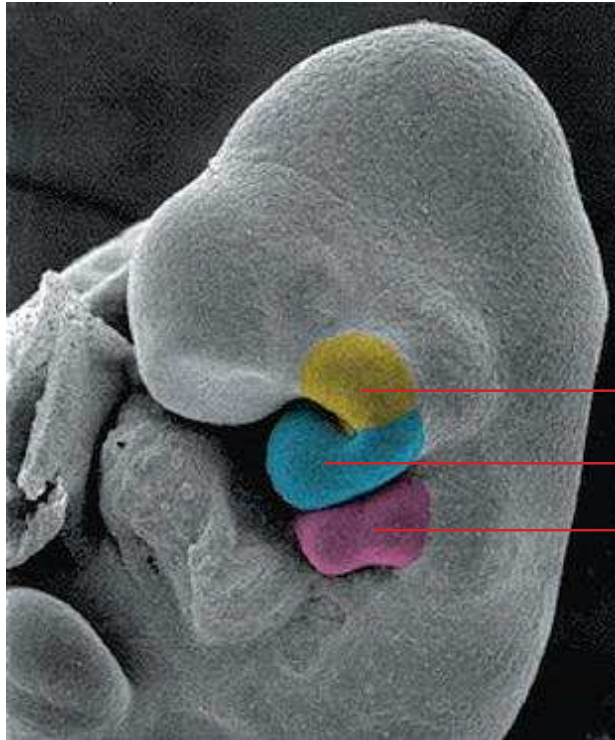


FIGURA 5: Visão lateral de embrião de camundongo com 10 dias de gestação, período correspondente, em embrião humano, ao estágio 12 de Carnegie (quarta semana, 26 a 30 dias de gestação). O primeiro par de arcos branquiais dá origem a dois processos, maxilar e mandibular, que delimitam o estomodeo caudal e lateralmente.

Fonte: Figura adaptada do site: http://www.med.unc.edu/embryo_images/unit-hednk/hednk_heds/hednk011.htm. Acesso em: 30 abr. 2007.

Processo Maxilar

Processo Mandibular

2º Par de Arcos Branquiais

Logo em seguida, o primeiro par de arcos branquiais se divide nos processos mandibular e maxilar, delimitando o estomodeo caudal e lateralmente (Figura 5). Quando o embrião atinge a idade gestacional de aproximadamente cinco semanas, o estomodeo passa a ser limitado por seis pares de arcos branquiais. Em humanos, o quinto par é uma estrutura transitória e o sexto par não é visível externamente (Figura 6).

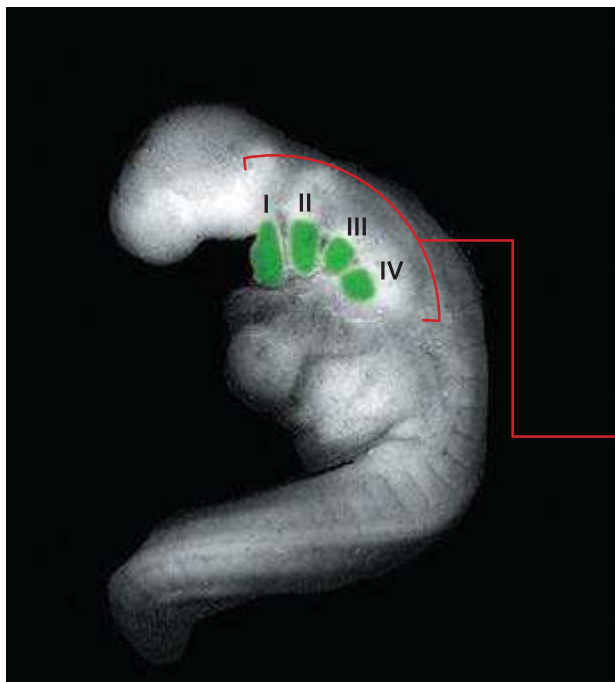
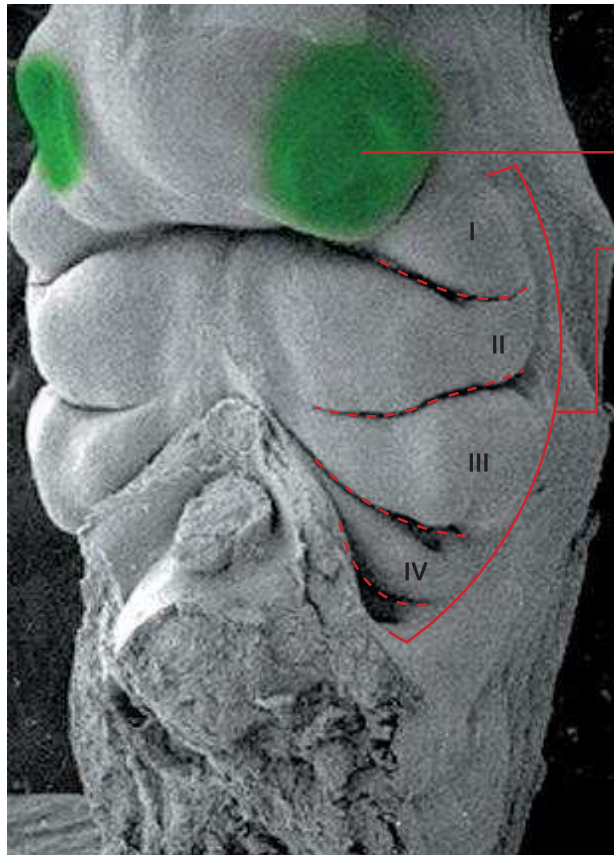


FIGURA 6: A. Visão frontolateral de embrião humano no estágio 13 de Carnegie (quinta semana, 28 a 32 dias de gestação). O primeiro, segundo, terceiro e quarto pares de arcos branquiais são visíveis externamente. O quinto par é uma estrutura transitória e o sexto não forma elevação externa.

Fonte: Figura adaptada do site: <http://embryology.med.unsw.edu.au/wwwhuman/Stages/Stage12.htm>. Acesso em: 30 abr. 2007.

Pares de Arcos Branquiais



Placóide olfativo

Pares de Arcos Branquiais

FIGURA 6: B. Visão frontal de embrião humano, ainda no estágio 13 de Carnegie, após um corte logo acima da proeminência cardíaca. Sob este ângulo se observa, além dos arcos branquiais, o placóide olfativo.

Fonte: Figura adaptada do site: http://www.med.unc.edu/embryo_images/unit-hednk/hednk013.htm. Acesso em: 30 abr. 2007.

Cada processo mandibular cresce no sentido da linha mediana da face, onde entra em contato com sua contraparte formando o lábio inferior. Paralelo a isso, recobrimdo o prosencéfalo e em rápida expansão, há

o processo frontonasal (Figura 7. SUN et al., 2000; MOORE; PERSAUD, 2004). Ainda nesse mesmo período, desenvolvem-se espessamentos no processo frontonasal, localizados logo acima da abertura do estomodeo, denominados de placóides olfativos ou nasais (Figura 8), em volta dos quais há proliferação do mesênquima, originando uma saliência em forma de ferradura que

transforma os placóides em fossetas nasais. O braço lateral de cada ferradura origina dois novos processos: o nasal lateral e o nasal medial (Figura 9. MOORE; PERSAUD, 2004).

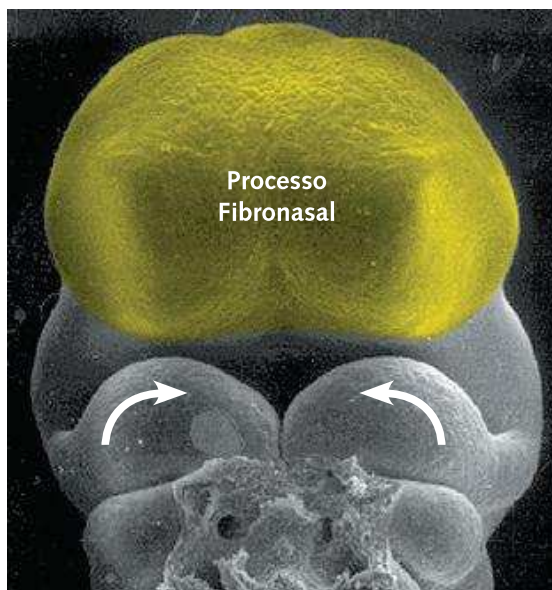


FIGURA 7: Visão frontal de embrião de camundongo com 10 dias de gestação, período correspondente, em humanos, ao estágio 13 de Carnegie (5 semanas, 28 a 32 dias de gestação). O processo mandibular cresce em direção a região medial da face, onde se encontra com seu par, formando o lábio inferior. As setas indicam o sentido do crescimento dos processos mandibulares. Localizado acima do estomodeo e, em rápido crescimento, observa-se a região frontonasal. Fonte: Figura adaptada do site: http://www.med.unc.edu/embryo_images/unit-hednk/hednk026.htm. Acesso em: 30 abr. 2007.

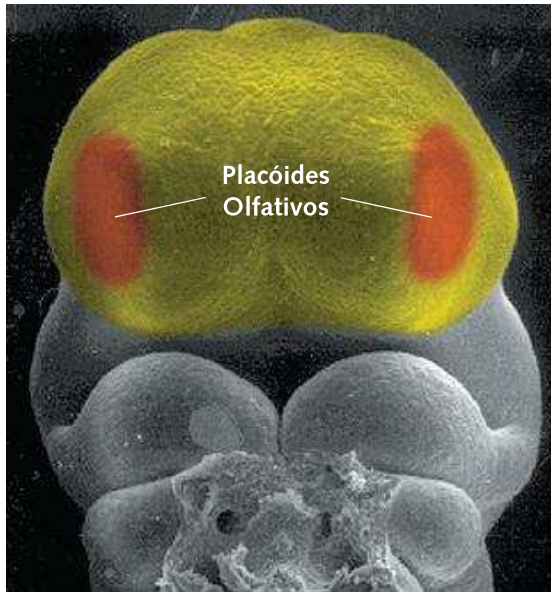
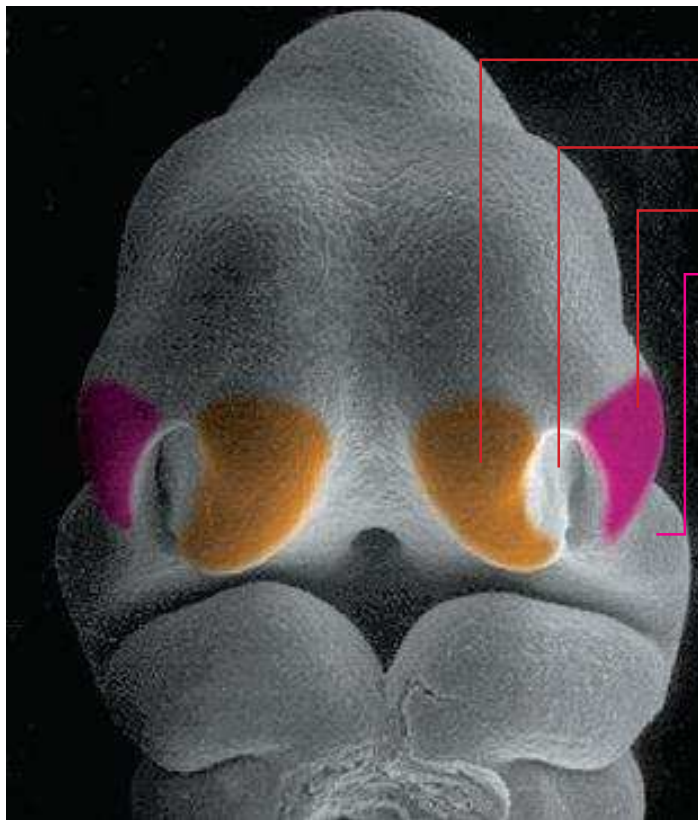


FIGURA 8: Visão frontal de embrião de camundongo com 10 dias de gestação, período correspondente, em humanos, ao estágio 13 de Carnegie (5 semanas, 28 a 32 dias de gestação). Observa-se espessamentos localizados no processo frontonasal, são os placóides olfativos ou nasais.

Fonte: Figura adaptada do site: http://www.med.unc.edu/embryo_images/unit-hednk/hednk_https/hednk001.htm. Acesso em: 30 abr. 2007.



Processo nasal medial

Fosseta nasal

Processo nasal lateral

Processo maxilar

FIGURA 9: Visão frontal de embrião de camundongo com 10 dias de gestação, período correspondente, em humanos, ao estágio 14/15 de Carnegie (5 semanas, 31 a 38 dias de gestação). Em volta dos placóides olfativos há uma rápida proliferação do mesênquima subjacente, determinando o aparecimento de uma saliência em forma de ferradura, que transforma o placóide em fosseta nasal. O braço lateral de cada ferradura é chamado de processo nasal lateral, e o braço medial de processo nasal medial.

Fonte: Figura adaptada do site: http://www.med.unc.edu/embryo_images/unit-hednk/hednk_https/hednk028.htm. Acesso em: 30 abr. 2007.

Dessa forma, na quinta semana de gestação, o estomodeo é delimitado por cinco processos: maxilar, mandibular, frontonasal, nasal lateral e nasal medial. Durante as duas próximas semanas, os processos maxilares crescem no sentido da linha mediana da face, comprimindo os processos nasal medial e lateral. A fusão desses processos resulta na formação do nariz, lábio superior e segmento intermaxilar (Figuras 10, 11, 12 e 13), este último composto por

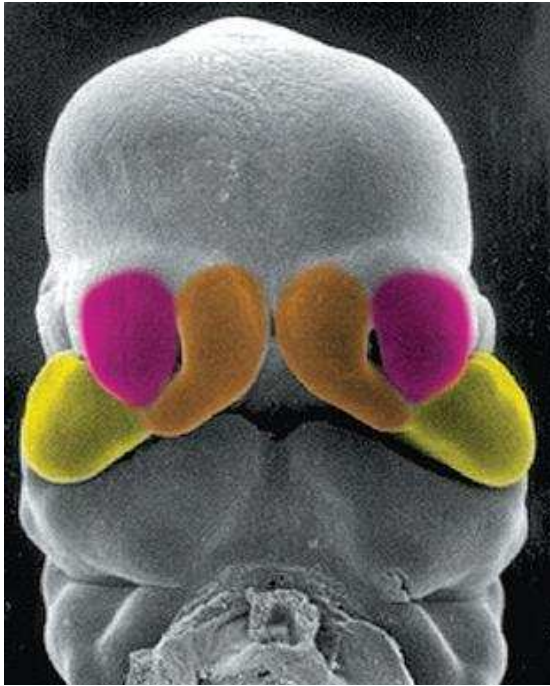


FIGURA 10: Visão frontal de embrião de camundongo com 11 dias de gestação, corresponde, em humanos, ao estágio 16 de Carnegie (6 semanas, 37 a 42 dias de gestação). O processo maxilar cresce no sentido mediaano da face.
Fonte: Figura adaptada do site: http://www.med.unc.edu/embryo_images/unit-hednk/hednk_https/hednk030.htm. Acesso em: 30 abr. 2007.

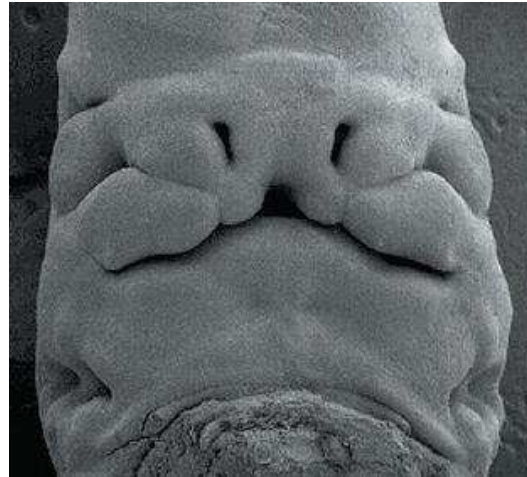


FIGURA 11: Visão frontal de embrião humano no estágio 17 de Carnegie (6 semanas, 42 a 44 dias de gestação). A união dos processos nasal lateral, nasal medial e maxilar forma o nariz.
Fonte: Figura adaptada do site: http://www.med.unc.edu/embryo_images/unit-hednk/hednk_https/hednk031.htm. Acesso em: 30 abr. 2007.

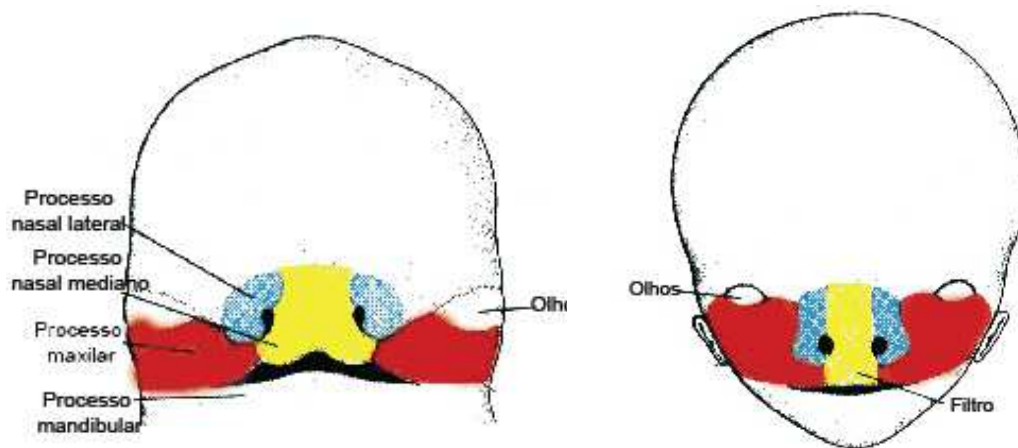


FIGURA 12: Ilustração da contribuição de cada um dos processos na formação da face.
Fonte: Figura adaptada do site: <http://connection.lww.com/products/sadler/images/figurelarge15-22.jpg>. Acesso em: 30 abr. 2007.

um componente labial que forma o filtro do lábio superior, um componente maxilar que serve de suporte aos quatro incisivos e um componente palatal que forma o palato primário (BROWN; SANDY, 2002; MOORE; PERSAUD, 2004; KURJAK et al., 2007).

O palato primário, também chamado processo palatal mediano, inicia o seu desenvolvimento a partir da parte mais interna do segmento intermaxilar. É formado por

uma massa cuneiforme de mesoderma, tem forma triangular ou de concha e está entre as superfícies internas dos processos maxilares em desenvolvimento (Figura 13. MOORE; PERSAUD, 2004).

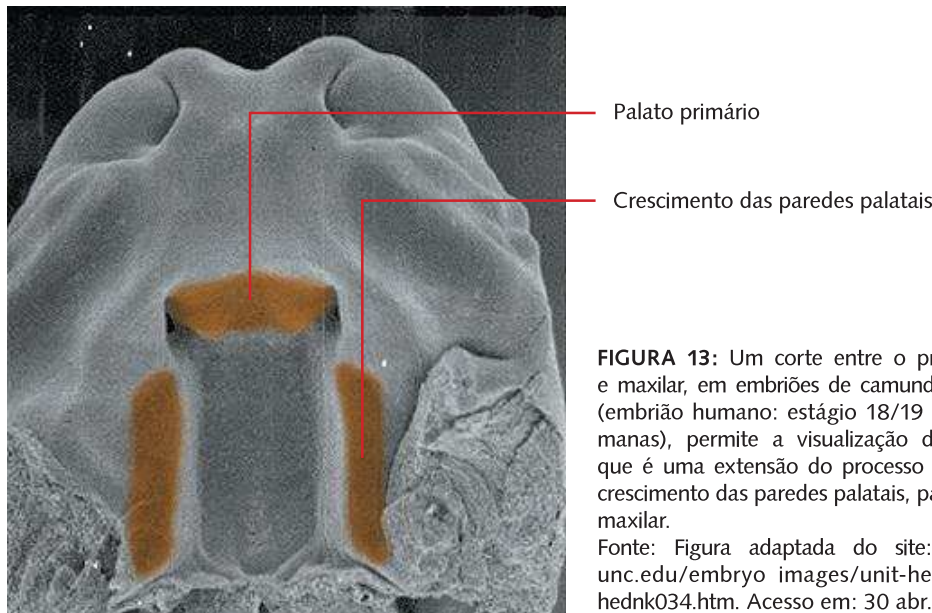


FIGURA 13: Um corte entre o processo mandibular e maxilar, em embriões de camundongo com 12 dias (embrião humano: estágio 18/19 de Carnegie, 7 semanas), permite a visualização do palato primário, que é uma extensão do processo nasal mediano e o crescimento das paredes palatais, partindo do processo maxilar.

Fonte: Figura adaptada do site: http://www.med.unc.edu/embryo_images/unit-hednk/hednk_https/hednk034.htm. Acesso em: 30 abr. 2007.

O período mais crítico da palatogênese é caracterizado pelo fechamento do palato secundário. Kerrigan et al (2000) dividiram esse período em três estágios. No estágio I, ocorre a formação de dois processos, um de cada lado da face, que tem origem na parte interna dos processos maxilares e são chamados de paredes palatais ou cristas palatais. Inicialmente, essas cristas crescem verticalmente ao lado da língua (Figura 14).

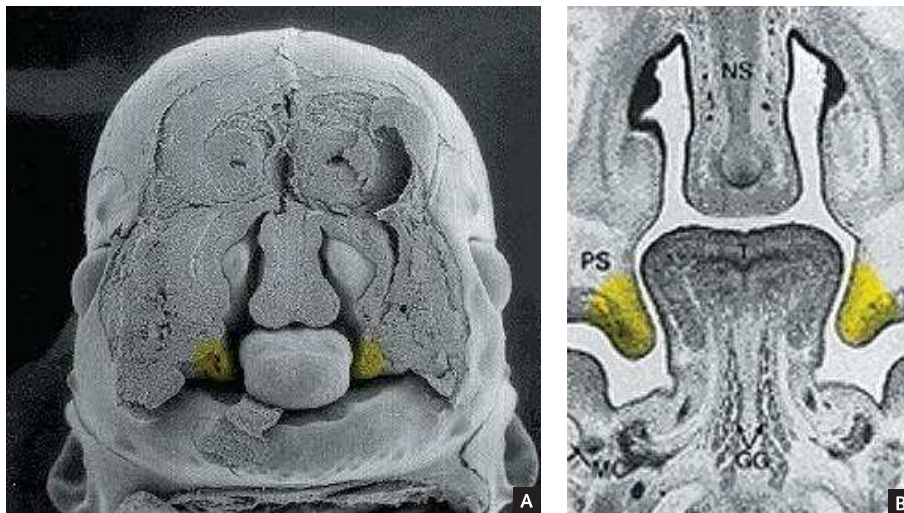


FIGURA 14: A. Corte frontal de embrião de camundongo com 14 dias de gestação, correspondente, em humanos, ao estágio 20 de Carnegie. As paredes palatais crescem verticalmente, posicionando-se ao lado da língua. B. Ilustração do crescimento vertical das paredes palatais.

Fonte: A. Figura adaptada do site: http://www.med.unc.edu/embryo_images/unit-hednk/hednk_https/hednk034.htm. Acesso em: 30 abr. 2007.

B. Figura adaptada de Sperber (2001, p. 40).

No estágio II, as paredes palatais se elevam sobrepondo-se horizontalmente a língua. Após a reorientação, as paredes continuam crescendo no sentido da linha mediana da face, até que suas cristas (bordas) médias epiteliais (CME) entrem em contato entre si (Figura 15). O estágio III é caracterizado pela formação de uma LJ entre as CME, que logo depois é degradada para formar um único órgão, o palato secundário (Figuras 16 e 17. KERRIGAN et al., 2000).

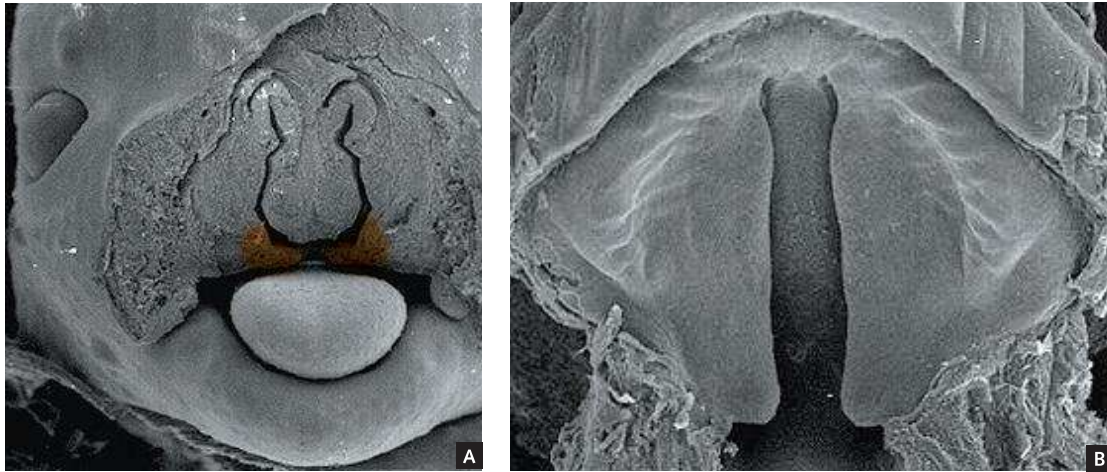


FIGURA 15: A. Corte frontal de embrião de camundongo com 14 dias de gestação, correspondente, em humanos, ao estágio 21 de Carnegie (8 semanas de gestação). As paredes palatais assumem a posição horizontal, continuam crescendo nesse sentido até se encontrarem na linha mediana da face. B. Corte entre a mandíbula e a maxila, mostrando a horizontalização das paredes palatais, porém, ainda sem o contato entre elas.

Fonte: A. Figura adaptada do site: http://www.med.unc.edu/embryo_images/unit-hednk/hednk_https/hednk038.htm.

B. Figura adaptada do site: http://www.med.unc.edu/embryo_images/unit-hednk/hednk_https/hednk039.htm. Acesso em: 30 abr. 2007.

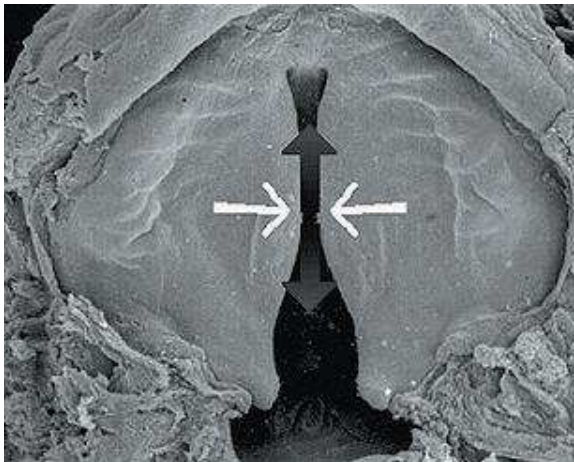


FIGURA 16: Corte entre a mandíbula e a maxila de embrião de camundongo com 14,5 dias de gestação, correspondente, em humanos, ao estágio 21/22 de Carnegie (8 semanas). A região mediana da parede epitelial entra em contato com seu par, formando uma LJ. Logo em seguida, o mesmo ocorre com a região anterior e a posterior a este ponto. As flechas indicam esse movimento.

Fonte: Figura adaptada do site: http://www.med.unc.edu/embryo_images/unit-hednk/hednk_https/hednk040.htm. Acesso em: 30 abr. 2007.



FIGURA 17: Corte entre a mandíbula e a maxila de embrião de camundongo com 15 dias de gestação, correspondente, em humanos, ao estágio 23 de Carnegie (8 semanas). Observa-se que toda a extensão da LJ já foi degradada, formando um único órgão.

Fonte: Figura adaptada do site: http://www.med.unc.edu/embryo_images/unit-hednk/hednk_https/hednk041.htm. Acesso em: 30 abr. 2007.

As porções mais posteriores desse processo são as últimas a se fundirem e formar a úvula. Em seguida, o processo palatal secundário se funde com o primário e com o septo nasal, separando a cavidade oral da nasal (FITZGERALD, 1980). A Figura 18 ilustra o palato de um adulto com desenvolvimento normal.

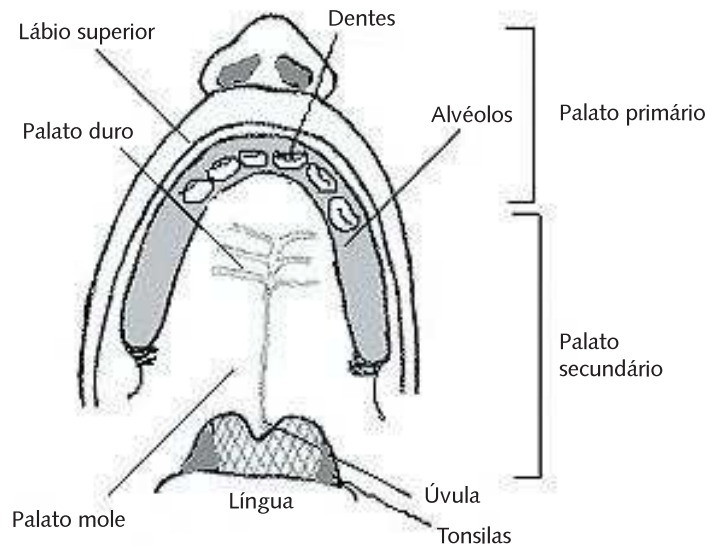


FIGURA 18: Ilustração de uma palatogênese bem sucedida.

Fonte: Figura adaptada do site: <http://www.moondragon.org/obgyn/pediatric/cleft.html>. Acesso em: 30 abr. 2007.

Qualquer falha durante os processos envolvidos na palatogênese pode ocasionar diferentes tipos de fissura. As fissuras lábio-palatais, de acordo com Spina (1973), podem ser classificadas em pré-forame incisivo, transforame incisivo, pós-forame incisivo e fissuras raras da face. As fissuras pré-forame incisivo (Figura 19) se localizam à frente do forame incisivo, podem abranger o lábio e o rebordo alveolar, variando desde pequenos entalhes na mucosa e/ou pele do lábio, denominadas de incompletas; até o rompimento total do lábio e rebordo alveolar, passando pelo assoalho do nariz e atingindo o forame incisivo, denominadas de completas.



Figura 19: A fissura pré-forame incisivo pode atingir somente o lábio, ou o lábio e a região anterior do palato. A. Fissura pré-forame incisivo unilateral incompleta. B. Fissura pré-forame incisivo unilateral completa. C. Fissura pré-forame incisivo bilateral completa. A fissura pré-forame incisivo bilateral também pode ser incompleta.

Fonte: Figura adaptada do site: <http://www.bch.org.uk/departments/cleftlipandpalate/patientinformation.htm>. Acesso em: 5 maio 2007.

De acordo com o lado envolvido, classificam-se em unilateral, bilateral ou mediana, estas são pouco frequentes e acometem o filtro do lábio superior (SPINA, 1973).

As fissuras transforame incisivo (Figura 20) são fissuras totais, que rompem a maxila em toda a sua extensão, desde o lábio até a úvula. Podem ser unilaterais ou bilaterais (SPINA, 1973).

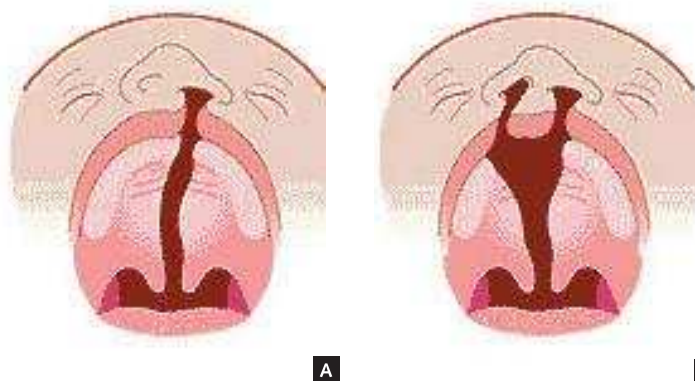


FIGURA 20: A fissura transforame incisivo atinge todo o palato e lábio, e pode ser unilateral (A) ou bilateral (B).

Fonte: Figura adaptada do site: <http://www.bch.org.uk/departments/cleftlipandpalate/patientinformation.htm>. Acesso em: 5 maio 2007.

As fissuras pós-forame incisivo (Figura 21) se localizam posteriormente ao forame incisivo, podendo atingir todo palato secundário ou apenas a úvula. E, por fim, as fissuras raras de face, tais como: a fissura naso-ocular, fissura buco-ocular, macrostomia, fissura buco-auricular e fissuras da mandíbula, lábio inferior e nariz (SPINA, 1973).

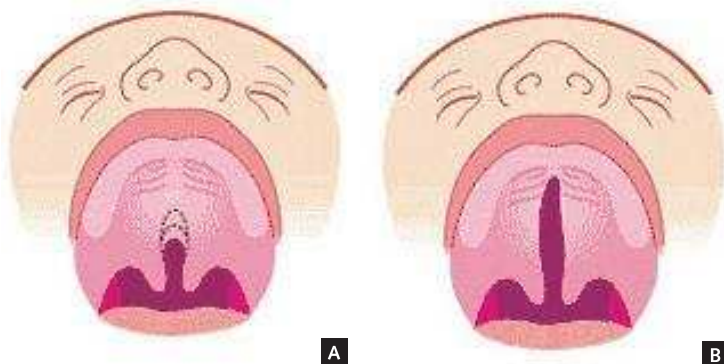


FIGURA 21: As fissuras pós-forame incisivo atingem somente o palato secundário e podem ser incompletas (A) ou completas (B).

Fonte: Figuras adaptadas do site: <http://www.bch.org.uk/departments/cleftlipandpalate/patientinformation.htm>. Acesso em: 5 maio 2007.

O tratamento indicado para minimizar as consequências das fissuras orais e ou palatais requer o acompanhamento do fissurado por uma equipe multidisciplinar por períodos longos, em média 18 anos.

Tendo em vista a alta incidência de fissuras e todas as dificuldades pelas quais os fissurados e suas famílias passam, foi criada em Bauru - SP, no ano de 1967, um centro de Pesquisa e Reabilitação de Lesões Lábio-Palatais, conhecido carinhosamente como “Centrinho”. Em 1998, devido à ampliação do seu campo de atividade, o “Centrinho” recebeu nova denominação, em vigor até hoje, Hospital de Reabilitação de Anomalias Crânio-Faciais - HRAC/USP.

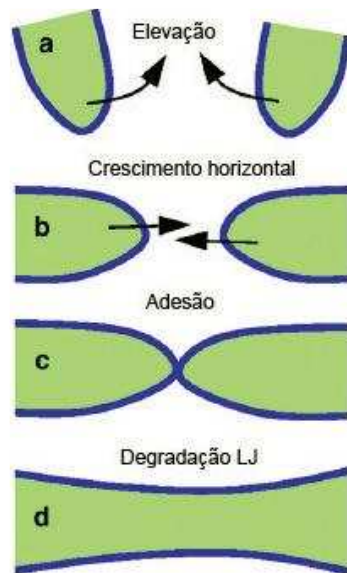


FIGURA 22: Principais eventos de formação do palato secundário. A. Crescimento vertical das paredes palatais. B. Reorientação e crescimento das paredes palatais. C. Adesão e formação da LJ. D. Completa degradação da LJ, originando um único órgão.

Fonte: Figura adaptada de Dudas et al. (2007, p. 3).

2.2 MECANISMOS MOLECULARES

ENVOLVIDOS NA PALATOGÊNESE

As mais recentes pesquisas envolvendo a palatogênese têm se concentrado nos três principais eventos de formação do palato secundário, ou seja, o crescimento das paredes, a sua elevação e a formação, e degradação da LJ (Figura 22).

2.2.1 Crescimento das paredes palatais

Em camundongos, por volta do 12,5 dias de desenvolvimento embrionário (DE), inicia-se o crescimento das paredes palatais (STANIER; MOORE, 2004; DUDAS et al., 2007). Nesse período, a síntese de DNA, a atividade proliferativa e a migração celular têm recebido uma destacada atenção (MOTT; TOTO; HILGERS, 1969; HUDSON; SHAPIRO, 1973; BURDETT; WARTERFIELD; SHAH, 1988; HEHN et al., 1998; IZADNEGAHDAR; RATHANASWAMI; SHAH, 1999; LAN et al., 2001; 2004; ZHANG et al., 2002; ITO et al., 2003; SASAKI et al., 2004; XUAN et al., 2006; LEE et al., 2007).

As paredes palatais são compostas por células mesenquimais, responsáveis por secretar os componentes de MEC, delimitadas por uma lâmina basal composta de células cuboidais e sitiada junto à membrana basal, e uma lâmina composta por células achatadas chamada de periderme (HOLTGRAVE; STOLTENBURG-DIDINGER, 2002; DUDAS et al., 2007). O crescimento das paredes ocorre gradualmente e depende, além da proliferação e migração celular (ZHANG et al., 2002; NAWSHAD; LaGAMBA; HAY, 2004), da composição e remodelamento da sua MEC (KNUDSEN; BULLEIT; ZIMMERNAN, 1985; MORRIS-WIMAN; BRINKLEY, 1993; MANSELL et al., 2000; BROWN et al., 2002; DUDAS et al., 2007).

As principais moléculas que compõem a MEC da parede palatal, nesse estágio de desenvolvimento, são os diferentes tipos de colágenos (FOREMAN et al., 1991; MORRIS-WIMAN; BRINKLEY, 1992; 1993; OHSAKI et al., 1995; SINGH et al., 1998; MANSELL et al., 2000; MORRIS-WIMAN; BURCH; BASCO, 2000). Uma forte evidência de que o colágeno esteja intimamente relacionado à diferenciação celular é que essa proteína é detectada pela primeira vez em embriões de vertebrados no estágio de gástrula, exatamente quando terminam as clivagens e se inicia a diferenciação dos três folhetos embrionários (SANTOS JR; WADA, 2001).

O ácido hialurônico, outro componente de MEC da parede palatal (PRATT et al., 1973; KNUDSEN et al., 1985; MORRIS-WIMAN; BRINKLEY, 1993; SINGH et al., 1994; 1997; DEGITZ; FRANCIS; FOLEY, 1998), propicia um microambiente ideal para a migração celular e, devido a sua característica hidrofílica, provoca uma expansão dos espaços intercelulares, resultando em um aumento do volume tecidual. A fibronectina é outro exemplo de molécula que compõe a MEC da parede palatal durante o seu crescimento (MORRIS-WIMAN; BRINKLEY, 1993; MANSELL et al., 2000). Sabe-se que a fibronectina desempenha uma importante função em processos que envolvem migração, adesão e diferenciação celular (SOUZA JR.; WADA, 2001). Não obstante, Morris-Wiman e Brinkley (1993) determinaram o padrão de expressão de colágeno I e III, ácido hialurônico e fibronectina durante esse período da palatogênese e concluíram que a diferença na distribuição espacial e temporal dessas moléculas é de suma importância para o adequado crescimento e elevação das paredes palatais.

Diversos grupos de pesquisadores têm investigado a importância de genes durante o estágio de crescimento das paredes palatais. O *Msx1*, *Bmp*, *Shh*, (SATOKA; MAAS, 1994; LU; JIN; TIPOE, 2000; ZHANG et al., 2002; JEZEWSKI et al., 2003), *Tgfa* (MIETTINEN et al., 1999), *Osr2* (LAN et al., 2001; 2004), *Lhx8* (ZHAO et al., 1999), *Pax9* (PETERS et al., 1998) desempenham importante função na proliferação celular. Já o *Gli2*, *Gli3*, *Tgfb⁻²* e *Hoxa2* atuam na migração e diferenciação celular (RIJLI et al., 1993; MO et al., 1997; SANFORD et al., 1997; REDDY, 2005). Camundongos nocauteados para esses genes apresentam fissura palatal em decorrência de falha no crescimento das paredes. Acredita-se que o crescimento insuficiente do mesênquima da parede palatal de camundongos seja a causa mais comum de fissura de palato nessa espécie (SATOKA; MAAS, 1994; ZHAO et al., 1999; ZHANG et al., 2002; LAN et al., 2004).

2.2.2 Mecanismos responsáveis pela elevação das paredes palatais

Diferentes mecanismos foram propostos para explicar o movimento que provoca a rápida elevação das paredes palatais, promovendo sua horizontalização. No entanto, a melhor aceita, até o momento, sugere que isso ocorra em função da combinação de fatores extrínsecos e intrínsecos (BROWN; SANDY, 2002). São considerados fatores extrínsecos a contração da língua em resposta a estimulação neural (WRAGG; SMITH; BORDEN, 1972), o crescimento da cartilagem de Meckels na direção sagital, resultando no aumento da proeminência mandibular (JELINEK; PETERKA, 1977), e a elevação da cabeça em relação ao corpo, aumentando a cavidade oral (DIEWERT, 1983). Esses acontecimentos contribuem para o deslocamento da língua para baixo, criando um espaço livre para a elevação das paredes.

O principal fator intrínseco é caracterizado pelo aumento do volume tecidual. O crescimento da parede palatal é acompanhado pelo aumento na quantidade de ácido hialurônico, que promove o aparecimento de forças hidrostáticas, estas exercem uma pressão

osmótica em determinado ponto da parede palatal que, após seu limite de resistência, causa a elevação da parede (LAZZARO, 1940 apud DIEWERT, 1979; FERGUSON, 1978; BRINKLEY; VICKERMAN, 1982; BRINKLEY; MORRIS-WIMAN, 1984).

Além disso, outro importante fator que contribui para a elevação das paredes palatais é a reorganização celular. Imediatamente antes da reorientação, a camada epitelial se torna mais espessa, apresentando uma atividade mitótica maior na superfície lateral do que na superfície medial, ainda a superfície oral apresenta maior vascularidade do que a superfície nasal. Essas variações regionais no crescimento, forma e vascularização aumentam a força intrínseca, culminando na horizontalização das paredes (GREGG; AVERY, 1971; LUKE, 1984; AMIN et al., 1994).

Para que o estágio II de desenvolvimento do palato secundário possa ocorrer, é primordial que o estágio I tenha evoluído de forma normal.

2.2.3 Fusão e degradação da Linha de Junção

A reorientação das paredes palatais e seu contínuo crescimento no sentido horizontal promovem o contato entre as células da lâmina basal que recobre a CME de cada parede, formando uma espécie de sutura, LJ, entre elas. Acredita-se que essa LJ ocorra em consequência à secreção de moléculas adesivas e à formação de desmossomos (MOGASS; BRINGAS JR.; SHULER, 2000). O desaparecimento da junção é, certamente, o ponto mais intrigante da palatogênese.

Há evidências que apontam três principais hipóteses para o rápido desaparecimento da LJ. Na primeira, o crescimento do palato no sentido oronasal colaboraria com a migração das células da junção para a região oral e nasal da parede palatal, formando triângulos epiteliais. A segunda seria a morte celular programada e, por fim, a terceira hipótese aponta evidências de que algumas células epiteliais migram da junção para o mesênquima e se diferenciam em células mesenquimais, fenômeno conhecido como transdiferenciação (SHAPIRO; SWENEY, 1969; FITCHETT; HAY, 1989; CARRETTE; FERGUSON, 1992; HAY, 1995; MANSELL et al., 2000; MARTINEZ-ALVAREZ et al., 2000; SUN; BAUR; HAY, 2000; STANIER; MOORE, 2004).

Estes eventos de morte, migração e transdiferenciação celular provavelmente não ocorrem de forma isolada, mas sim combinados entre si e controlados por uma variedade de genes e seus produtos (STANIER; MOORE, 2004).

Apesar das hipóteses acima apontarem caminhos para o desaparecimento das células epiteliais da junção, nenhuma delas explica a degradação da membrana e lâmina basal, ponto crucial para que ocorra a fusão completa do palato, uma explicação seria sua degradação mediada por proteases, principalmente as MMPs.

2.3 METALOPROTEINASES DE MATRIZ

Dentre as principais enzimas que atuam remodelando ou degradando os componentes da MEC estão as MMPs. A primeira reportagem a respeito das MMPs ocorreu em 1962, por Jerome

Gross e Charles Lapière. Eles observaram, em fragmentos de pele de girinos, uma enzima ativa que degradava a tripla hélice de colágeno tipo I nativo (GROSS; LAPIÈRE, 1962). Desde então, muitos avanços foram feitos à cerca desse assunto.

MMPs são endopeptidases zinco dependente, secretadas por células e responsáveis pela degradação dos componentes da matriz. Elas fazem parte de um grande clã, o clã MB, conhecido genericamente por metzincinas, que contém uma sequência de consenso no sítio ativo (HEXXHXXGXXH), no qual três resíduos de histidina coordenam o íon zinco e um resíduo de metionina promove um “Met-turn” abaixo do sítio ativo do zinco. As metzincinas agrupam diversas famílias, dentre as quais a M10, que é dividida em subfamílias A e B. As MMPs fazem parte da subfamília A, também conhecida como matrixinas. As MMPs de espécies vertebradas são designadas por números, enquanto aquelas de espécies invertebradas são designadas por nomes triviais (ALEXANDER, 2002).

Até o momento são conhecidas 28 MMPs, sendo que 23 dessas estão presentes no genoma humano (Tabela 1. SOMERVILLE et al., 2003). Antes de tal diversidade genética ser conhecida, eram classificadas de acordo com a sua afinidade pelos diferentes substratos. Assim, eram divididas em collagenases, gelatinases, estromelisinases, elastases e outras. Atualmente, são classificadas de acordo com a localização celular em MMPs secretadas ou ancoradas à membrana; e ainda, de acordo com a sua organização estrutural. As MMPs secretadas incluem: MMPs com um domínio mínimo, MMPs contendo um domínio simples tipo hemopexina ou vitronectina; MMPs com propriedades gelatinolíticas (gelatinases) e MMPs ativadas por furina. Já as MMPs ancoradas à membrana incluem MMPs transmembrana tipo I, MMPs ligadas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) e MMPs transmembrana tipo II (EGEBLAD; WERB, 2002; SOMERVILLE et al., 2003). A Figura 23 ilustra as diferentes características estruturais de cada subgrupo.

Todas as MMPs possuem dois domínios bem conservados chamados de pró-domínio e domínio catalítico. O pró-domínio tem forma oval e contém um resíduo de cisteína na sequência PRCXXPD. Esse resíduo de cisteína foi denominado cisteína “switch” por ser responsável pela manutenção da enzima na forma inativa, se ligada ao Zn^{2+} do domínio catalítico, ou de ativá-la por meio da quebra dessa ligação (STERNLICHT; WERB, 2001). Na porção N terminal do pró-domínio de todas as MMPs há uma sequência sinal que direciona a enzima quando há necessidade de sua translocação para o meio extracelular (KONTTINEN et al., 1999). O domínio catalítico possui forma esférica e apresenta uma fenda que se estende horizontalmente para se ligar aos substratos ou inibidores. Contém o Zn^{2+} em seu sítio ativo ligado a três histidinas na sequência HEF/LGHS/ALGLXHS e dois ou três íons de cálcio (STÖCKER et al., 1995).

A maioria das MMPs é sintetizada na sua forma de pré-pró-enzima e secretadas para o meio extracelular como pró-enzimas, exceção feita as MMPs que possuem na sua estrutura uma sequência de reconhecimento à furinas e podem ser ativadas intracelularmente no complexo de Golgi (LOHI et al., 2001; MARCHENKO; STRONGIN, 2001; MARCHENKO et

TABELA 1²: METALOPROTEINASES DE MATRIZ IDENTIFICADAS NO GENOMA HUMANO E SEUS SUBSTRATOS.

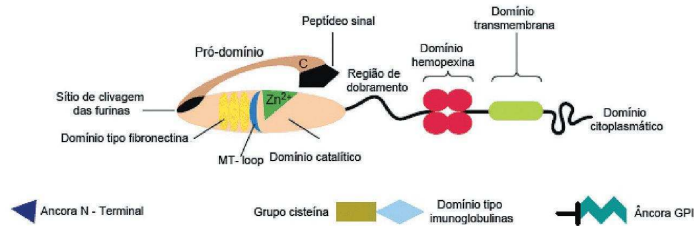
Nome da proteína	Nome Alternativo	Substratos colagenosos	substratos não colagenosos	Outros substratos
MMP-1	Colagenase-1	Colagênio I, II, III, VII, VIII, X, e gelatina	Agrecam, caseína, nidogem, serpina, versicam, perlecam, proteína de ligação e tenascina-C	α 1-antitripsina, α 1-proteinase inibidora, IGFBP-3, IGFBP-5, IL-1 β , L-selectina, ovastatina, TNF α recombinante, TNF α peptídeo e SDF-I
MMP-2	Gelatinase-A	Colagênio I, IV, V, VII, X, XI, XIV e gelatina	Agrecam, elastina, fibronectina, laminina, nidogem, proteína de ligação e versicam	MMP-9 ativa, MMP-13 ativa, FGF RI, IGF-BP-3, IGF-BP5, IL-1 β , TNF α recombinante e peptídeo e TGF- β
MMP-3	Estromelisina-1	Colagênio II, IV, IX, X e gelatina	Agrecam, caseína, nidogem, decorin, elastina, fibronectina, laminina, versicam, perlecam e proteína de ligação	α 1-antiquimotripsina, α 1-proteinase inibidora, antitrombina III, E-caderina, Fibrinogenio, IGF-BP3, L-selectina, ovastatina, pró-HB-EGF, pró-IL β , pró-MMP-1, -8, -9, pro-TNF α e SDF-I
MMP-7	Matrilisina-1	Colagênio I, II, III, V, IV e X	Agrecam, caseína, elastina, enactina, laminina e proteína de ligação	β 4Integrina, decorin, defensina, E-caderina, fas-L, plasminogenio, pró-MMP-2-7, pró-TNF α , transferina e sidecan
MMP-8	Colagenase-2	Colagênio I, II, III, V, VII, VIII, X e gelatina	Agrecam, laminina e nidogem	α 2-antiplasmina e pró-MMP-8
MMP-9	Gelatinase-B	Colagênio IV, V, VII, X e XIV	Fibronectina, laminina, nidogem, proteína de ligação e versicam	CXCL5, IL-1 β , IL2-R, plasminogenio, pro-TNF α , SDF-I e TGF β
MMP-10	Estromelisina-2	Colagênio III, IV, V e gelatina	Fibronectina, laminina e nidogem	Pró-MMP-1, -8 e -10
MMP-11	Estromelisina-3		Laminina	α 1-antitripsina, α 1-proteinase inibidora e IGFBP-I
MMP-12	Metaloelastase		Elastina	Plasminogenio
MMP-13	Colagenase-3	Colagênio I, II, III, IV, V, IX, X, XI e gelatina	Agrecam, fibronectina, laminina, perlecam e tenascina	Plasminogenio ativador 2, pró-MMP-9, -13 e SDF-I
MMP-14	MT1-MMP	Colagênio I, II, III e gelatina	Agrecam, dermatam sulfato, fibrina, fibronectina, laminina, nidogem, perlecam, tenascina e vitronectina	α 1 β 2 integrina, CD44, gC1qR, pró-MMP-9,-13, pró-TNF α , SDF-I e transglutaminase tecidual
MMP-15	MT2-MMP	Colagênio I, II, III e gelatina	Agrecam, fibronectina, laminina, nidogem, perlecam, tenascina e vitronectina	Pró-MMP-2, -13 e transglutaminase tecidual
MMP-16	MT3-MMP	Colagênio I, III e gelatina	Agrecam, caseína, fibronectina, laminina, perlecam e vitronectina	Pró-MMP-2, e -13
MMP-17	MT4-MMP	Gelatina	Fibrina e fibronectina	
MMP-19	RASI-1	Colagênio I, IV e gelatina	Agrecam, caseína, fibronectina, laminina, nidogem e tenascina	
MMP-20	Enamelisina		Agrecam, amelogenina, cartilagem oligomérica	
MMP-21				α 1-antitripsina
MMP-23 A e B	CA-MMP	Gelatina		
MMP-24	MT5-MMP	Gelatina	Condroitim sulfato, dermatam sulfato e fibronectina	Pró-MMP-2 e -13
MMP-25	MT6-MMP	Colagênio IV e gelatina	Fibrina e fibronectina	Pró-MMP-2
MMP-26	Matrilisina-2	Colagênio IV e gelatina	Caseína, fibrinogenio e fibronectina	β 1-proteinase inibidora
MMP-28	Epilisina		Caseína	

Fonte: Tabela adaptada de Somerville et al. (2003, p. 2)

al., 2001; KANG; SVOBODA, 2002). A ativação ocorre em consequência da remoção do pró-domínio e abertura do domínio catalítico no sítio de ligação do íon zinco, seguida de outras clivagens catalíticas que tornam a enzima estável. Com a abertura do domínio catalítico a cisteína ligada ao zinco é removida, este é hidratado e fica disponível para ligações com seus respectivos substratos (Figura 24. SPRINGMAN et al., 1990). Esse mecanismo depende da ação de proteases, com destaque para a plasmina e MT-MMP (STEEN et al., 2002). É interessante o fato de que as MMPs podem ativar umas as outras, resultando numa cascata de ativação.

2 Apesar de serem conhecidas 23 MMPs, em humanos, 29 designações vêm sendo usadas na literatura. Os símbolos MMP-4, MMP-5, MMP-6 and MMP-29 são redundantes em humanos. MMP-18 corresponde a *Xenopus laevis* collagenase, que, em humanos, é denominada de MMP-19. MMP-21 e MMP-22 são sintetizadas por genes muito semelhantes, localizados em um segmento do cromossomo 1 em humanos. Por isso, passaram a ser denominadas de MMP23A e MMP23B.

A) Domínio Estrutural das MMPs



B) Classificação das MMPs de acordo com as suas características estruturais

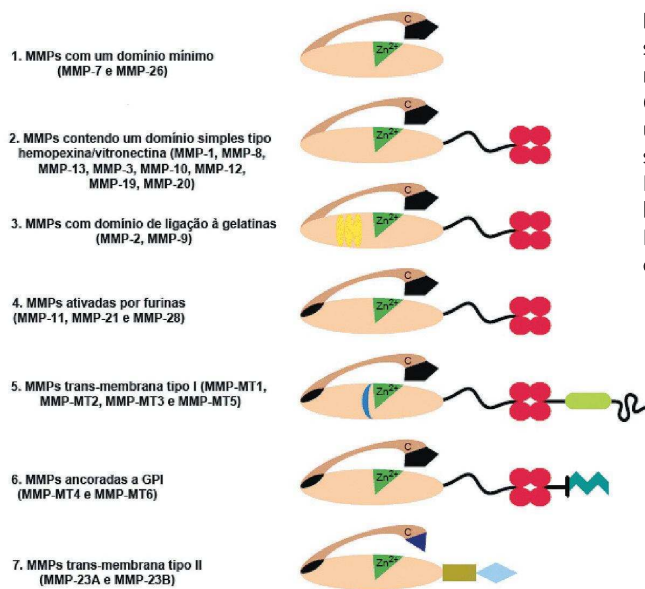


FIGURA 23: A. Todas as MMPs possuem em sua estrutura um peptídeo sinal (envolvido no mecanismo de secreção), um pró-domínio (contendo um conservado resíduo cisteína) e um domínio catalítico (contendo o zinco no seu sítio ativo). As outras estruturas são variáveis. B. Classificação das MMPs em subgrupos baseados nas similaridades estruturais.

Fonte: Figura adaptada do site: <http://www.expertreviews.org/>. Acesso em: 14 maio 2007.

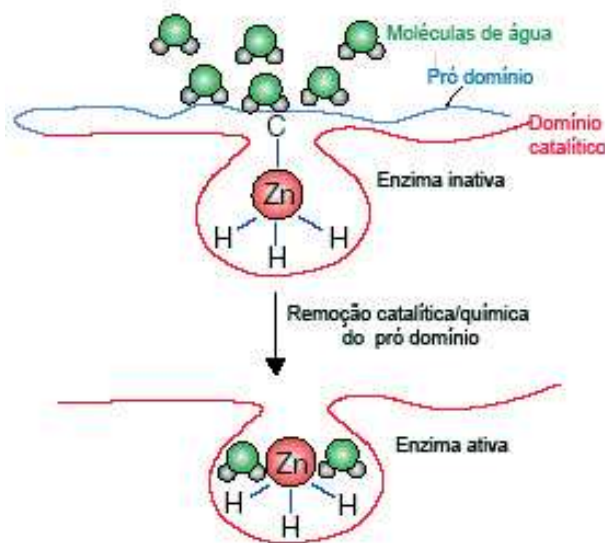


FIGURA 24: O mecanismo da cisteína "switch" regula a ativação das MMPs. O grupo tiol do resíduo de cisteína, localizado no caixi terminal do pró-domínio, atua se ligando ao zinco do sítio ativo, resultando na exclusão de água e mantendo a forma latente da enzima. A remoção do pró-domínio por mudanças conformacionais ou ruptura proteolítica da ligação zinco/cisteína/grupo tiol, permite a entrada de água e a enzima passa para sua forma ativa.

Fonte: Figura adaptada de Somerville et al. (2003, p. 5).

As MMPs, uma vez ativadas, necessitam de diferentes mecanismos para controlar a sua atividade proteolítica, seja nos níveis transcricional, pós-transcricional ou protéico, com a participação de ativadores e inibidores. A Figura 25 resume os diversos processos regulatórios das MMPs.

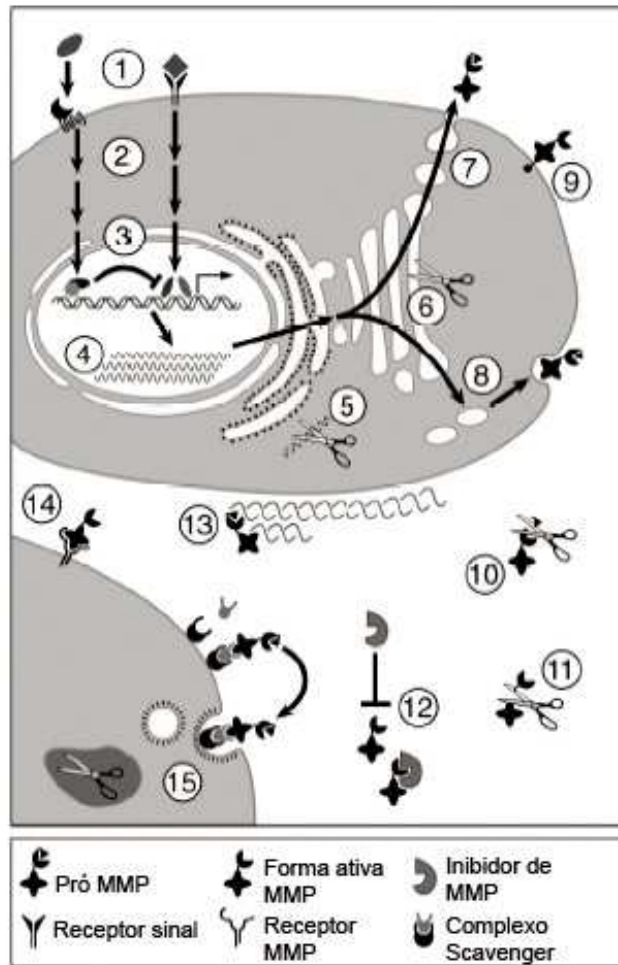


FIGURA 25: Mecanismos regulatórios das MMPs. 1. Sinais indutores ou repressores a partir do meio extracelular. 2. Transdução de sinais intracelulares. 3. Ativação ou repressão da expressão gênica. 4. Processamento do RNA mensageiro. 5. Degradação do RNA mensageiro. 6. Ativação intracelular. 7. Secreção constitutiva. 8. Regulação da secreção. 9. Expressão na superfície celular. 10. Ativação proteolítica. 11. Processamento ou inativação proteolítica. 12. Inibição protéica. 13. Localização na matriz extracelular. 14. Localização na superfície celular. 15. Endocitose e degradação intracelular.

Fonte: Figura Adaptada de Sternlicht e Werb (2001, p. 423).

Dentre as MMPs, aquelas com propriedades gelatinolíticas, as gelatinases, têm despertado as atenções de pesquisadores por apresentarem um alto potencial de degradação de membranas basais, tanto em processos fisiológicos como a morfogênese (SAHLBERG et al., 1999; MANSELL et al., 2000; LEE et al., 2001; LEGALLICIER et al., 2001; CANTEMIR et al., 2004), quanto em processos patológicos como na metástase e invasão tumoral (CURRAN; MURRAY, 2000; GIANNELLI; ANTONACI, 2002; FUNDYLER; KHANNA; SMOLLER, 2004; KAWAMURA et al., 2004; HANDSLEY; EDWARDS, 2005). Esse subgrupo de MMPs foi originalmente descrito como colagenases IV, por sua habilidade em degradar colágeno IV.

A MMP-2, uma das duas enzimas pertencentes ao grupo das gelatinases, foi inicialmente purificada de tumores metastáticos de camundongos (LIOTTA; THORGEIRSSON; GARBISA,

1982), mas é expressa por diferentes tecidos, normais ou não. Na MEC, a forma ativa de MMP-2 está ligada ao colágeno I e IV, gelatinas e laminina, a ligação com essas moléculas ocorre através do domínio tipo fibronectina; ou então, na forma inativa, é encontrada ligada à membrana (SATO et al., 1994; ELLERBROEK et al., 2001).

A expressão gênica de MMP-2 é dependente da ligação de fatores de transcrição na região promotora mínima. Os principais sítios de ligação identificados nessa região são para os fatores AP-1, AP-2, PEA3, C/EBP, CREB, Ets-1 e Sp1 (QIN; SUN; BENVENISTE, 1999), p. 53 (BIAN; SUN, 1997). Os fatores de transcrição Sp1 e AP-2 já foram reportados por modular a expressão de MMP-2, enquanto a interação de AP-2 com o fator YB-1 induz a transcrição de MMP-2 (MERTENS et al., 1998).

O mecanismo de ativação da pró-MMP-2 que mais tem sido alvo de estudos é aquele que envolve MT1-MMP e TIMP-2 (SATO et al., 1994; STRONGIN et al., 1995; IMAI et al., 1996; BUTLER et al., 1998; FERNANDEZ-CATALAN et al., 1998; ZUCKER et al., 1998; BERNARDO; FRIDMAN, 2003). Ocorre como resultado da formação de um complexo ternário entre MT1-MMP/TIMP-2/pró-MMP-2 na superfície celular, onde o domínio inibitório N-terminal da TIMP-2 liga-se ao sítio ativo de MT1-MMP e seu domínio C terminal interage com o domínio C terminal da pró-MMP-2. Esse mecanismo depende ainda de uma molécula livre de MT1-MMP nas proximidades desse evento. Butler et al. (1998) demonstraram que a ativação de pró-MMP-2 só ocorre quando a razão molar de TIMP-2 é baixa em relação a MT1-MMP, se houver excesso de TIMP-2 a pró-MMP-2 não é ativada e a MMP-2 ativa é inibida (Figura 26).

A outra MMP pertencente ao subgrupo das gelatinases é a MMP-9, produzidas por macrófagos, leucócitos e células menos diferenciadas, como os osteoblastos e osteoclastos (MURPHY et al., 1989; SAKIYAMA et al., 1994; OKADA et al., 1995; TJÄDERHANE et al., 1998). Assim como a MMP-2, a MMP-9 aparece na MEC ligada a colágeno I, gelatina ou laminina (ALLAN et al., 1995).

A região promotora mínima do gene de MMP-9 possui sítios de ligação para AP-1, NF- κ B e Sp1, que mediam sinergicamente a indução do gene MMP-9 por TPA ou TNF- α , e TGF- β (HUHTALA et al., 1991; SATO; SEIKI, 1993). Também há relatos de que Sp1 e Ets sejam essenciais para a ativação da expressão gênica em fibroblastos de MMP-9 via sítio de ligação AP-1 (HIMELSTEIN et al., 1998).

A ativação da pró-MMP-9 envolve complexos mecanismos que são dependentes do tipo do agente que causa a remoção proteolítica da porção N terminal do seu pró-domínio. Um grande número de proteases purificadas já foi reportado como responsáveis pela ativação da pró-MMP-9 *in vitro*. A tripsina (MASURE et al., 1990; OKADA et al., 1992; OGATA et al., 1995; DUNCAN et al., 1998), a tripsina-2 (SORSA et al., 1997) e plasmina (GOLDBERG et al., 1992; O'CONNELL et al., 1997) são exemplos dessas proteases. A plasmina desempenha uma importante função nesse contexto, não só por atuar diretamente na clivagem do pró-

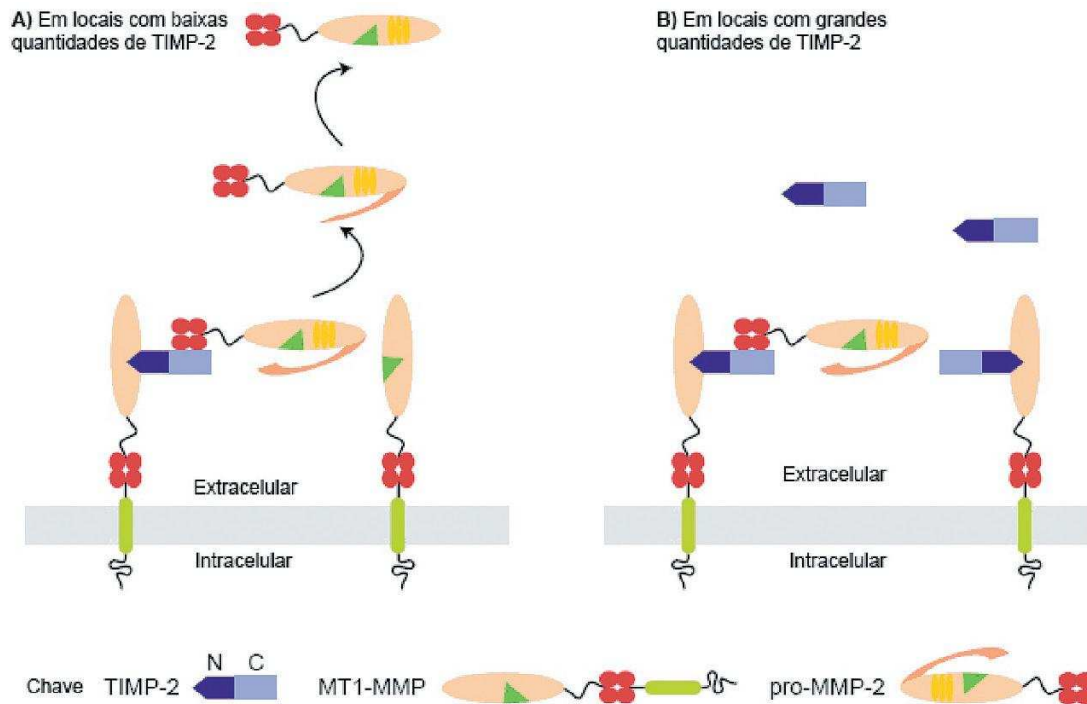


FIGURA 26: A. A MT1-MMP ancorada a membrana celular atua como um receptor para a TIMP-2. A TIMP-2, por meio de seu domínio N terminal, liga-se ao sítio ativo de MT1-MMP, formando um complexo binário que atua como receptor para pró-MMP-2. O domínio C terminal de MMP-2 liga-se ao domínio C terminal de TIMP-2. Uma molécula de MT1-MMP livre próxima a formação desse complexo cliva o pró-domínio da pró-MMP-2, que é dissociada da membrana gerando uma forma de MMP-2 intermediária, a qual se torna completamente ativada por processos de autocatálise. B. Esse mesmo mecanismo, na presença de grandes quantidades de TIMP-2, satura todas as moléculas de MT1-MMP, não ocorrendo a etapa de proteólise do pró-domínio da MMP-2, continuando esta na sua forma inativa. Fonte: Figura adaptada do site: <http://www.expertreviews.org/>. Acesso em: 20 maio 2007.

domínio da MMP-9, mas também por atuar em outras pró-MMPs, que por sua vez podem ativar a pró-MMP-9, desencadeando uma rede de ativação (Figura 27 e Tabela 2).

Assim como as outras MMPs, as gelatinases necessitam ter sua atividade regulada, para tanto, algumas moléculas atuam degradando ou inativando as formas ativas de MMP-2 e MMP-9. A α_2 macroglobulina e a trombospondina são exemplos delas, ligam-se às MMP-2 e MMP-9 formando complexos que serão retirados por endocitose (SOTTRUP-JENSEN, 1989; SOTTRUP-JENSEN et al., 1989). No entanto, durante um longo período, os inibidores teciduais de MMPs, os TIMPs, foram os que mais se destacaram nessa função.

TIMPs são glicoproteínas estáveis, pertencentes a uma família composta por quatro membros diferentes (TIMP1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4), que atuam com eficiências diferentes sobre as MMPs. TIMP-1 apresenta uma alta afinidade para MMP-9, enquanto TIMP-2 e TIMP-3 apresentam baixa afinidade por essa enzima. Já TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 se ligam com alta afinidade à MMP-2 (STEEN et al., 2002). TIMP-2 é, constitucionalmente, produzida assim como a MMP-2, com quem normalmente está pareada. A TIMP-3 normalmente se encontra localizada na MEC, e a TIMP-4 mais frequentemente no tecido vascular (ALEXANDER, 2002).

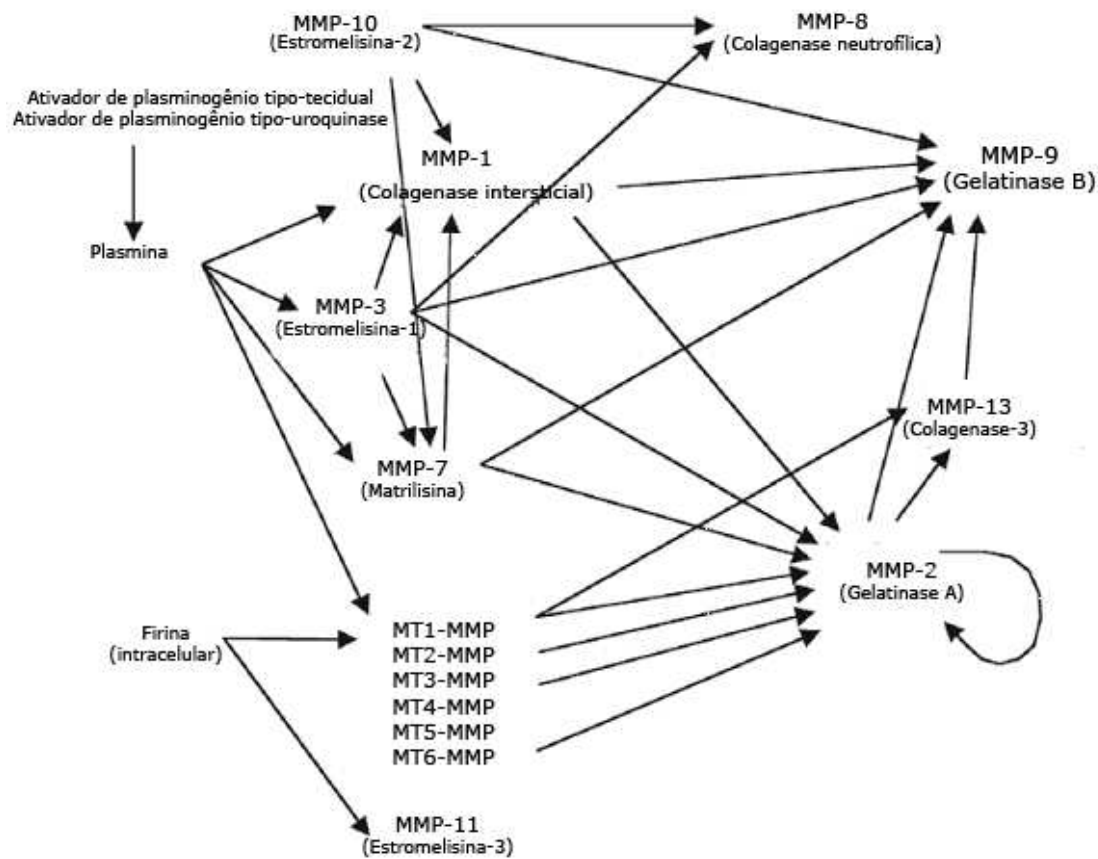


FIGURA 27: Rede de ativação de pró-MMP-9 por outras MMPs a partir da plasmina. O plasminogênio é convertido a plasmina por meio da ação de ativadores de plasminogênio tipo-tecidual e tipo-uroquinase. Este atua sobre diferentes pró-MMPs solúveis que terminam por atuar sobre a pró-MMP-9.

Fonte: Figura adaptada de Steen et al. (2002, p. 448)

Sabe-se que o balanço entre a produção de TIMPs e de MMPs representa um ponto crítico para o remodelamento da MEC (NAGASE; WOESSNER, 1999). Porém, o conceito original de que as TIMPs são responsáveis somente por efeitos contrários aos das MMPs deixou de ser verdadeiro. Exemplo clássico desse fato é a já citada ação ativadora de TIMP sobre pró-MMP-2.

Nos últimos anos, outra molécula endógena passou a ser o alvo das atenções de pesquisadores no que diz respeito à inibição das gelatinases e das MT1-MMP. Trata-se do RECK (*Reversion-inducing-cysteine rich protein with Kazal motifs*), uma proteína descoberta por Takahashi e colaboradores em 1998.

TABELA 2: ATIVADORES DIRETOS E INDIRETOS DA MMP-9.

Pró-enzima	Ativador
Pró-MMP-9	MMP-7 MMP-26 MMP-1 MMP-13 MMP-3 MMP-2 MMP-10 Calicreína tecidual Catepsina G Elastase neutrofílica tripsina-2
Pró-MMP-8	MMP-3 MMP-10 Catepsina G
Pró-MMP-2	MMP-3 MMP-7 MMP-1 MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MT5-MMP Heparina TIMP-2 Elastase neutrofílica triptase
Pró-MMP-1	MMP-2 após tripsina MMP-7 MMP-10 MMP-3 Plasmina Calicreína Catepsina B lisossomal Proteinase II Células endoteliais Fator de angiogênese
Pró-MMP-3	Plasmina Calicreína Elastase neutrofílica Catepsina G Triptase Proteinase I e II
Pró-MMP-7	Plasmina Elastase leucocitária MMP-3 MMP-10
Pró-MT1-MMP	Furina (intracelular) Plasmina
Pró-MMP-11	Furina (intracelular)
Pró-MMP-13	MT1-MMP MMP-2

Fonte: Tabela adaptada de Steen et al. (2002, p. 449)

2.4 RECK

Foi com o intuito de isolar e caracterizar genes com a capacidade de induzir a reversão do fenótipo tumoral que Takahashi et al. (1998), estudando um novo vetor, obtiveram dois cDNA clones que exibem significantes propriedades biológicas. Um desses clones, o CT124, codifica uma proteína (Msx-2) que induz a reversão de células tumorais. O outro gene isolado e o seu produto foram denominados RECK devido a suas características estruturais e atividade.

O RECK é o único gene indutor da reversão tumoral caracterizado, até o momento, que codifica uma proteína extracelular com domínios inibidores do tipo proteases. Sua expressão está fortemente suprimida em tumores e células transformadas por diversos tipos de

oncogenes. A restauração da expressão do gene RECK inibe a invasão e atividade metastática de células tumorais.

A proteína RECK é uma glicoproteína de peso molecular 110 kDa, composta por 971 resíduos de aminoácidos e rica em cisteína, sugerindo uma estrutura secundária complexa, que contém regiões hidrofóbicas tanto na extremidade NH₂ quanto na COOH. A sequência peptídica da proteína humana indica que a região NH₂ terminal funciona como um peptídeo sinal, enquanto a extremidade COOH parece funcionar como âncora de GPI pela qual RECK é aportada à membrana plasmática. A porção mediana da proteína contém três domínios semelhantes aos inibidores serina proteases (domínio SPI-like), sendo o primeiro deles idêntico a sequência consenso do motivo Kazal (C-X₇-C-X₆-Y-X₃-C-X_{2,3}-C), e relacionado a inibição das proteases. Ainda possuem em sua estrutura duas regiões de repetição de fraca homologia com o fator de crescimento epidérmico, motivos de cisteína na região NH₂-terminal e cinco sítios com potencial de glicosilação (Figura 28. TAKAHASHI et al., 1998; NODA et al., 2003).



FIGURA 28: Organização estrutural da proteína RECK humana. EGF: Fator de crescimento epidérmico. SPI: inibidor serina protease.

Fonte: Figura adaptada de Takahashi et al. (1998, p. 13222)

Apesar de possuírem um domínio tipo serina proteases, não há relatos da inibição dessas enzimas pelo RECK, entretanto, muito se tem estudado sobre sua ação reguladora em relação às MMPs. Sabe-se que pelo menos três MMPs (MT1-MMP, MMP-2 e MMP-9) sofrem a ação do RECK. A secreção de MMP-9 é bloqueada na membrana plasmática pela proteína RECK que está ancorada a membrana. No caso das MT1-MMP e MMP-2, a regulação ocorre por competição de RECK com essas duas enzimas na formação do complexo ternário MT1-MMP/TIMP-2/pró-MMP-2 (Figura 29). Infelizmente, ainda não se sabe se o RECK atua em outras MMPs, mas já se pode sugerir que RECK é regulador do remodelamento de MEC e que provavelmente seja controlado por uma rede de sinalização controlada por Ras (NODA et al., 2003).

Para entender os mecanismos de inibição da expressão do gene RECK, mediada por oncogenes, isolou-se e caracterizou-se a região 5' flanqueadora do gene RECK de camundongos. Ensaios da atividade promotora, utilizando mutantes de deleção da região flanqueadora 5' e o gene luciferase, revelaram que a sequência de 52 pares de bases, imediatamente upstream

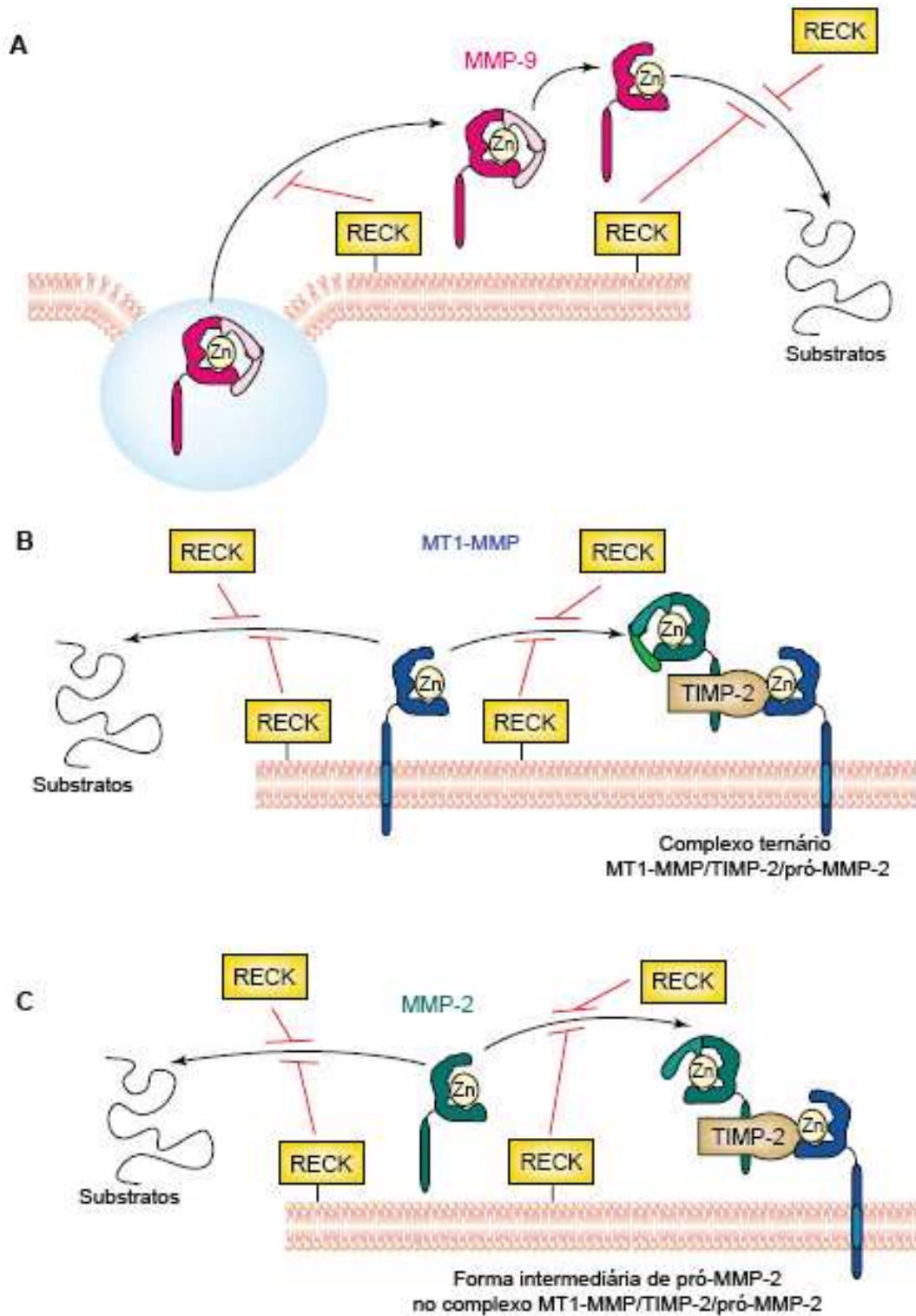


FIGURA 29: Regulação da atividade de MMPs por RECK. A. RECK inibe a atividade de MMP-9 por impedir sua secreção ou por bloquear a sua ligação com substratos. B. RECK solúvel ou ancorado à membrana inibe a ação de MT1-MMP, impedindo sua ligação com o complexo MT1-MMP/TIMP-2/pró-MMP-2 ou com seus substratos. C. RECK inibe a atividade de MMP-2 por impedir a liberação de sua forma ativa a partir do complexo MT1-MMP/TIMP-2/pró-MMP-2 ou por inibir a ligação da forma ativa aos seus substratos.

Fonte: Figura adaptada de Rhee e Coussens (2002, p. 210).

ao gene, possui uma atividade promotora que é suprimida pelo produto do oncogene Ha-ras. Essa sequência contém dois sítios de ligação para Sp1 (Sp1A e Sp1B), um sítio de ligação para cEBPb e um CAAT Box. Ensaios de atividade promotora, utilizando mutantes pontuais nesses sítios, revelaram que as proteínas Sp1 e Sp3 se ligam a ambos os sítios Sp1 (A e B), e que a resposta a Ras é mediada apenas pelo sítio Sp1B. A Figura 30 ilustra os possíveis mecanismos para a modulação negativa de RECK via ativação de Ras, os quais incluem modificações pós-translacionais de Sp1/Sp3, tais como fosforilação e ou glicosilação (Figura 30B); modulação de proteínas que regulam a ativação transcricional de Sp1/Sp3 (Figura 30C) e modulação da interação entre Sp1/Sp3 e suas proteínas regulatórias por modificações pós-translacionais (Figura 30D. SASAHARA; TASHIHASHI; NODA, 1999).

O conhecimento de que RECK atua de forma negativa sobre a atividade de três MMPs envolvidas na formação do palato secundário nos levou a pesquisar sobre a possível participação desta proteína neste processo.

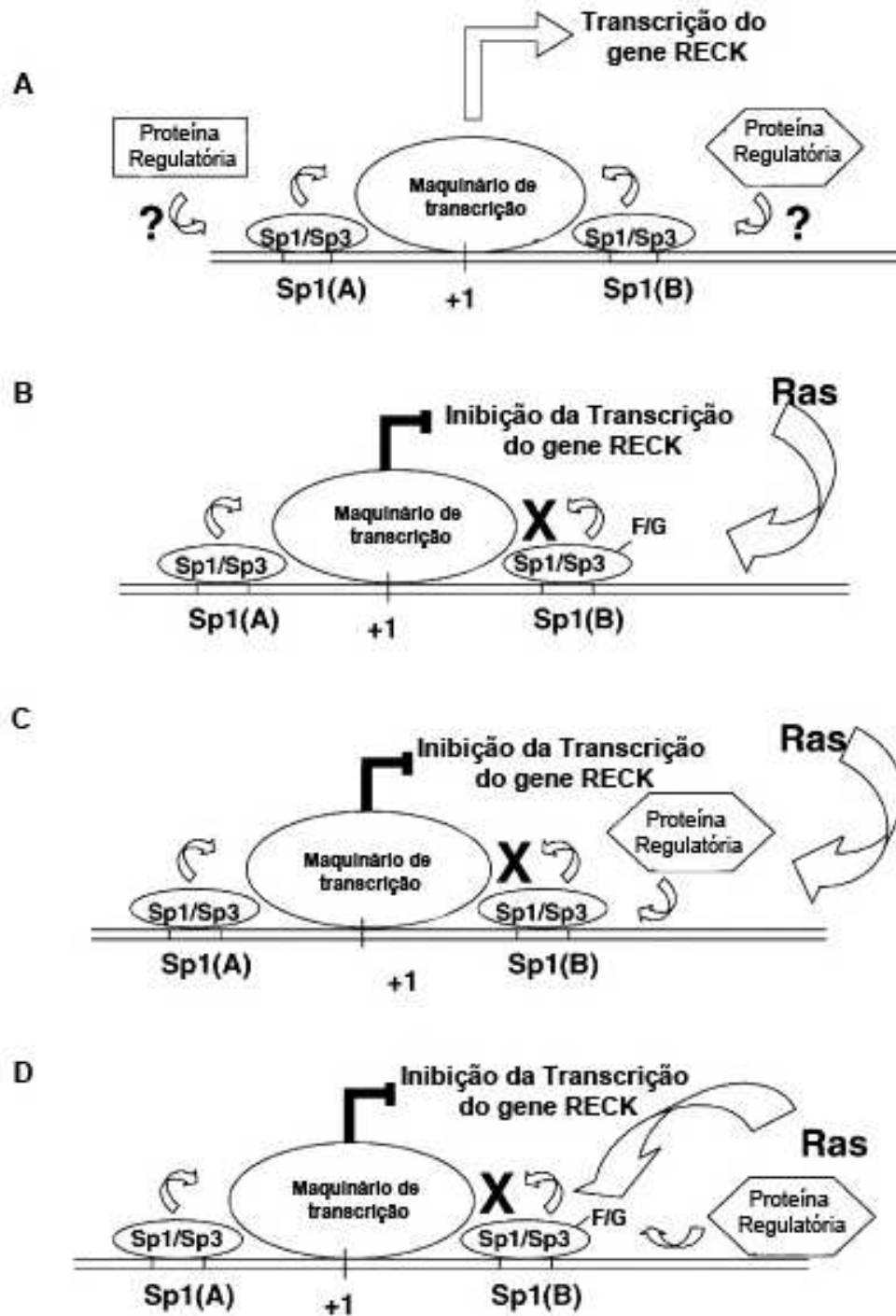


FIGURA 30: Mecanismos de modulação negativa de RECK via Ras. A. A transcrição do gene RECK se inicia no sítio designado +1. A atividade do gene promotor depende de dois sítios de ligação para Sp1 e Sp3, sítios Sp1A e Sp1B. A regulação negativa do gene RECK via Ras depende do sítio Sp1. Possíveis mecanismos incluem: B. Modulação de modificação pós-translacional de Sp1/Sp3, tais como fosforilação e/ou glicosilação (F/G). C. Modulação de proteínas regulatórias que controlam a atividade transcripcional de Sp1/Sp3. D. Modulação da interação entre Sp1/Sp3 e suas proteínas regulatórias por modificações pós-translacionais de Sp1/Sp3 (F/G).

Fonte: Figura adaptada de Sasahara et al. (2002, p. 438).

OBJETIVOS

Os objetivos principais deste estudo foram:

- análise morfológica da parede palatal em diferentes idades gestacionais, para definição dos períodos embrionários que melhor representam os três principais eventos de formação do palato secundário em camundongos, estabelecendo, assim, o modelo animal deste estudo;
- investigar se há expressão de RECK durante os três principais eventos de formação do palato secundário em camundongos;
- estabelecer o padrão de expressão temporal e espacial para a proteína RECK e seu mRNA durante a formação do palato secundário em camundongos;
- analisar o padrão de expressão temporal e espacial das metaloproteinase-2 e metaloproteinase-9 durante a formação do palato secundário em camundongos;
- comparar os padrões de expressão obtidos entre as diferentes moléculas analisadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Camundongos suíços (*Mus musculus*), com aproximadamente 60 dias, obtidos do Biotério da Universidade de São Paulo, *campus* Bauru, foram mantidos em caixas separadas, em ambiente com controle de temperatura e umidade, alternando ciclos claro-escuro, durante 40 dias. Em seguida, as fêmeas foram colocadas em caixas previamente ocupadas por machos para produzir o efeito Whitten (WHITTEN; BRONSON; GREENSTEIN, 1968). Após quatro dias, as fêmeas foram mantidas por 6h na presença do macho, durante a fase escura, sendo a detecção do “plug vaginal” considerado o início de fecundação e o tempo zero de gestação. As fêmeas fecundadas foram divididas em quatro grupos e após 13; 14; 14,5 e 15 DE foram sacrificadas, e os embriões removidos do útero para a coleta das cabeças. As peças foram processadas de acordo com protocolos específicos para as subseqüentes análises microscópica de PCR em tempo real (mRECK), de hibridização *in situ* (mRECK), imunistoquímica (RECK, MMP-2 e MMP-9) e zimográfica (MMP-2 e MMP-9).

4.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Cabeças inteiras de embriões (n=5 por grupo) foram fixadas em formol 10% tamponado (tampão fosfato em pH7,2) por 24h, lavadas excessivamente em água corrente, desidratadas em banhos gradativos de álcool etílico (70% e 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina sintética Histotec®. Cortes (três por animal) de 5µm foram feitos em micrótomo, recolhidos em banho de água com 1% de gelatina e estendidos em lâminas. Após estarem secos, foram corados em hematoxilina eosina (HE). A análise microscópica e a documentação das imagens foram feitas em um microscópio Nikon modelo Eclipse 80i equipado com uma câmara digital e software de captura Q-imaging Micro Publisher 3.3 RTV.

4.3 REAÇÃO POLIMERÁSICA EM CADEIA EM TEMPO REAL

4.3.1 *Preparação do RNA total*

As paredes palatais foram dissecadas a partir da cabeça dos embriões nos períodos de 13, 14, 14,5 e 15DE, com o auxílio de uma lupa estereoscópica, e imediatamente congelados em gelo seco. Depois, foram mantidas a -80°C até o momento da análise. Os palatos foram mace-rados em nitrogênio líquido e, posteriormente, lisados em solução contendo isotiocianato de guanidina 4M, citrato de sódio 25mM (pH7,0) e β -mercaptoetanol 0,1M. Os lisados foram transferidos para tubos de polialômero com uma solução de cloreto de cézio 5,7M, acetato de sódio 25mM (pH5,0). Os tubos foram centrifugados a 164.080g (37.000rpm) por 18h a 20°C (CHIRGWIN et al., 1979). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado de RNA foi dissolvido em água estéril. O RNA foi quantificado por espectrofotometria e a sua qualidade foi confirmada em gel de agarose, contendo isotiocianato de guanidina 20mM.

4.3.2 *Ensaio de PCR em tempo real*

4.3.2.1 *Síntese da primeira fita do cDNA*

O RNA total obtido como descrito no item 4.3.1 foi utilizado como “template” para a síntese de cDNA em uma reação de transcrição reversa. Dessa forma, foram preparadas as reações contendo 1 μ g de RNA total dos palatos dissecados, 1 μ L de oligo dT (500ng/mL [Amersham Biosciences]), 0,5 μ L de “Random Primer” (100ng/ μ L) e água estéril para um volume final de 12 μ L. As amostras foram incubadas a 75°C por 10min e, em seguida, adicionou-se 7 μ L de uma solução contendo 2 μ L de tampão 5x para a enzima Super Script (Invitrogen), 2 μ L de DTT (Ditiotrietol) e 0,5 μ L de RNase OUT (40U/ μ L [Invitrogen, Carlsbad, California, USA]). As amostras foram novamente incubadas por 10min a 25°C, e mais 2min à temperatura de 42°C, sendo, então, adicionado 1 μ L da enzima Super Script (200U/ μ L [Invitrogen, Carlsbad, California, USA]). A reação ocorreu durante 2h em 42°C. Em seguida, para inativação da enzima, as amostras foram incubadas a 72°C por 10min. Visando degradar o RNA, foi adicionado 1 μ L de RNase H (5U/ μ L [USB, Cleveland, Ohio, USA]) em cada tubo. Os tubos foram incubados a 37°C por 30min, seguidos de uma incubação a 72°C por 10min para inativação da RNase H. Posteriormente, as amostras foram diluídas em 60 μ L de tampão TE (10mM Tris-HCl, pH8,0, mais 1mM EDTA).

4.3.2.2 *Controle da qualidade do cDNA*

Para confirmar a qualidade do cDNA sintetizado, foram realizadas reações de PCR, utilizando quatro diferentes conjuntos de “primers” (para os genes GAPDH, p53, MLH e NO-

TCH2), como controle, e como “template”, o cDNA sintetizado no item anterior. Cada reação foi montada de forma que apresentasse uma concentração final de 1x para o tampão de reação (Biolase), 1,5mM de $MgCl_2$, 0,2mM de dNTP, 0,2 μ M de cada um dos “primers” (Forward e Reverse), enzima Taq (Biolase) e “template”.

Nas reações em que foram utilizados os “primers” para p53, GAPDH e MLH, foi utilizado um programa de amplificação de 94°C por 2min, 35 ciclos de 94°C por 30s, 56°C por 30s e 72°C por 45s e, após os ciclos, 72°C por 6min, enquanto que, para NOTCH2, o programa de amplificação foi alterado para 94°C por 2min, 40 ciclos de 94°C por 30s, 56°C por 30s e 72°C por 1min e, após os ciclos, 72°C por 10min. As reações foram, posteriormente, analisadas em um gel de agarose 1% contendo brometo de etídio.

4.3.2.3 Confirmação dos genes por PCR em tempo real

Desenho dos “primers”

“Primers” para RECK de camundongo (F: 5’ TGCAAGCAGGCATCTTCAAA 3’; R: 5’ AC-CGAGCCCATTTTCATTTCTG 3’), utilizados para a amplificação desse gene nos experimentos de PCR em tempo real, foram desenhados com o auxílio do programa PrimerExpress (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, USA), acoplado ao termociclador ABI 5700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Como controle interno para quantificação do produto formado na reação de PCR em tempo real, “primers” para GAPDH de camundongo foram usados.

Confirmação da expressão diferencial

A quantificação do produto formado durante a reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando o reagente SYBER® Green Dye (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O SYBER Green Dye possui afinidade pela “minor groove” da dupla fita de DNA. Quando não está ligado ao DNA, emite uma pequena fluorescência no comprimento de onda de 520nm, entretanto, quando se liga a dupla fita de DNA, a fluorescência é aumentada cerca de 100 vezes, permitindo, assim, a detecção do produto do PCR em tempo real (LEKANNE DEPREZ et al., 2002).

O programa ABI-Manager SDS (Roche, Indianapolis, IN, USA) gerenciou o termociclador e a coleta dos dados gerados durante a amplificação. Utilizando o mesmo programa, foi escolhida a concentração de “primers”, que resultaram em mínima ou inexistente formação de “primer-dimer” e mínima variação entre as duplicatas (todas as reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata). Como “template”, foi utilizado 3 μ L de cDNA sintetizado anteriormente, 3 μ L de “primer” na concentração final de 600nM e 6 μ L do SYBER Green Dye.

Na análise inicial dos dados, realizada através do programa ABI-Manager SDS, foi definido, manualmente, um “threshold” que estivesse na fase exponencial de amplificação do gene. Assim que foi selecionado o “threshold”, da intersecção deste com a curva de amplificação, foi obtido o Ct daquela amostra (“Threshold Cycle”, que é definido como o ciclo onde a fluorescência se encontra estatisticamente acima do background). Assim, temos que, para

um determinado “threshold”, quanto maior a concentração de um gene, mais rapidamente a sua curva de amplificação irá atingir o “threshold” e menor será o seu Ct. Consequentemente, quanto menor a sua concentração, maior o seu Ct. Portanto, podemos dizer que a diferença de expressão de um gene, que está sendo analisado em diferentes amostras, pode ser dada pela diferença dos seus Cts frente a um “threshold”.

Quando se analisam duas ou mais amostras em um experimento de PCR em tempo real, tem-se freqüentemente uma variação da concentração de cDNA entre elas, então, para que os dados possam ser comparados, é necessário que estes sejam previamente normalizados. Para análise dos dados provenientes de experimentos de PCR em tempo real, foi realizada uma quantificação relativa através da obtenção de uma curva de um gene que não possui alteração de expressão nas amostras analisadas, e então, para cada amostra, a expressão do gene que está sendo estudada foi determinada em função da expressão do gene controle. Assim, para cada cDNA analisado, eram feitas duas reações, uma utilizando “primers” para o gene analisado e a outra utilizando “primers” para um controle interno. Terminada a reação, era fornecido ao ABI-Manager SDS um “threshold” e, então, o programa retornava o Ct de cada reação.

De posse dos Cts, foi calculada, inicialmente, a média dos Cts das duplicatas (Fórmula 1) e o seu desvio padrão (Fórmula 2). Como a expressão do gene seria analisada em relação a um controle interno, calculou-se a diferença entre a média dos Cts da amostra ($M_{amostra}$) e a média dos Cts do controle ($M_{controle}$). Essa diferença foi definida como ΔCt (Fórmula 3). Propagando a incerteza, temos que o desvio dessa diferença foi calculado segundo a Fórmula 4.

Em seguida, foi calculado o $\Delta\Delta Ct$, que, dado as diferentes amostras analisadas para um determinado “primer”, consiste na diferença do ΔCt de cada amostra em relação ao ΔCt de uma amostra que é tomada como referência (Fórmula 5).

Como, em uma reação de PCR, a quantidade de produto formado é duplicada a cada ciclo, os $\Delta\Delta Ct$ encontrados, que indicam diferenças entre ciclos, não refletem diretamente a diferença de produto entre as amostras, visto que uma diferença $\Delta\Delta Ct=1$ ciclo, por exemplo, indica que a quantidade de produto entre essas amostras é de duas vezes, e não uma vez. Assim, partindo do princípio de que a cada ciclo a quantidade de produto é dobrada, para calcularmos a diferença de produto entre as amostras (“ratio”) é necessário que o ganho de cada ciclo (2 vezes) seja elevado à potência do inverso de $\Delta\Delta Ct$, ou seja, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Fórmula 6. SCHMITTGEN et al. 2001).

$$\text{Fórmula-1} \quad M(\text{média}) = \frac{Ct}{Ct'}$$

$$\text{Fórmula-2} \quad \sigma(\text{desvio}) = \sqrt{\frac{2(Ct^2 + Ct'^2) - (Ct + Ct')^2}{4}}$$

$$\text{Fórmula-3} \quad \Delta Ct = M_{amostra} - M_{controle}$$

$$\text{Fórmula-4} \quad \sigma_{final} = \sqrt{\sigma_{amostra}^2 + \sigma_{controle}^2}$$

$$\text{Fórmula-5} \quad \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{amostra} - \Delta Ct_{amostra \text{ de referência}}$$

$$\text{Fórmula-6} \quad \text{ratio}_{\text{relativo a amostra de referência}} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

A partir desses cálculos, foi possível analisar a diferença de formação do produto do PCR, que está diretamente ligado à expressão do gene entre as linhagens analisadas. A média de quatro experimentos independentes e os respectivos desvios-padrão foi submetida à análise de variância para $p < 0,05$. (ANOVA seguido pelo teste de múltipla comparação de Tukey-Kramer).

4.4 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

As reações para hibridização *in situ* foram feitas de acordo com protocolos previamente estabelecidos por Wu e Oh (1996) e otimizados por Silva-Valenzuela et al. (2006). Cabeças inteiras ($n=5$ por grupo) coletadas, utilizando-se material estéril e livre de RNase, foram fixadas em paraformaldeído 4% em PBS (pH7,2), desidratadas em sucrose 30% por 24h e embebidos em um polímero inerte (Tissue-Tek OCT, Sakura Finetek, EUA) montado em um criomolde, congeladas com nitrogênio líquido e estocadas a -80°C até o momento da análise.

Utilizando-se de um criostato, obtiveram-se cortes de $10\mu\text{m}$ (três de cada animal), os quais foram estendidos em lâminas tratadas com 3-aminopropil-trietoxi-silano (Sigma Chemical Co, St Louis, MO USA) e secos à temperatura ambiente por, aproximadamente, 3h. Foram pós-fixados em uma solução de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0,2% em PBS (pH7,2), à temperatura ambiente por 10min. As lâminas foram lavadas três vezes, durante 5min cada, com o tampão salino PBT (0,1% Tween 20, 1xPBS¹ [pH7,2]); tratadas com água oxigenada 6% por 3 min à temperatura ambiente para bloquear a peroxidase endógena, novamente lavadas três vezes, 5min cada, com PBT. A recuperação antigênica foi feita usando $10\mu\text{g/mL}$ de proteinase K por 20min a 37°C (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, USA). A seguir, as lâminas foram incubadas com uma solução de glicina 0,027M (Sigma, Alemanha); lavadas três vezes, 5min cada, com PBT.

As lâminas, assim processadas, foram pré-hibridizadas em câmara de hibridização a 50°C durante o período de 1h, para tanto, as lâminas foram dispostas em conjunto de quatro, em sacos plásticos preenchidos com solução de hibridização, constituída por formamida 50%, SDS 1%, heparina ($50\mu\text{g/mL}$) e RNA de levedura ($50\mu\text{g/mL}$). Após esse período, a hibridização foi feita acrescentando a sonda ao tampão de hibridização numa concentração de 200ng/mL , a uma temperatura de 50°C , “overnight”.

A sonda de RNA foi preparada por meio da subclonagem de 463 pares de bases de um fragmento de cDNA cedido gentilmente pelo Dr. M. Noda (Universidade de Kyoto, Kyoto, Japão). Segue, na próxima página, a sequência do Nucleotídeo usada:

1 10xPBS = $0,01\text{M KH}_2\text{PO}_4$; $0,1\text{M Na}_2\text{HPO}_4$; $1,37\text{M NaCl}$; $0,027\text{M KCl}$.

5'CCGGACATGGCGAGCGTCCGGGCTCCCCCGCAGCGCGCTCTACTTCTGC TGGCCCGCGCGGGGTCGCGAGGTGACGGGGGCTGGCCCGGCGAGCGC GGGTGTGTATGCTGTAATCATTCAAAGATAACCAATGTGCCGTGATGATG TGAGCAGATTTTCTCTCAAAAGTGAATCCGACTGAACATCTGTTGCAGAG AGCCCCAGATTATTGCCCTGAACAATGGTTGAAATTTGGAGTTGCATGAATTC GTCTTTGCCAGGGGTATTAAAGATCCGATGGTTGGTTGGCTTAGGCTGCTG TGAATCGGCTATTGGCTTGGAGTCCGACAGGCATGCAAGCAGGCATCTTGA AAAATGATATTCCAAAGTTGCAGGAAGAATATGAGAAATGCTCTTTCAAGTT GCATTAGCAGAAATGAATGGGCTCGGTGCTGCA3'	5'CCGGACATGGCGAGCGTCCGGGCTCCCCCGCAGCGCGCTCTACTTCTGC TGGCCCGCGCGGGGTCGCGAGGTGACGGGGGCTGGCCCGGCGAGCGC GGGTGTGTATGCTGTAATCATTCAAAGATAACCAATGTGCCGTGATGATG TGAGCAGATTTTCTCTCAAAAGTGAATCCGACTGAACATCTGTTGCAGAG AGCCCCAGATTATTGCCCTGAACAATGGTTGAAATTTGGAGTTGCATGAATTC GTCTTTGCCAGGGGTATTAAAGATCCGATGGTTGGTTGGCTTAGGCTGCTG TGAATCGGCTATTGGCTTGGAGTCCGACAGGCATGCAAGCAGGCATCTTGA AAAATGATATTCCAAAGTTGCAGGAAGAATATGAGAAATGCTCTTTCAAGTT GCATTAGCAGAAATGAATGGGCTCGGTGCTGCA3'	5'CCGGACATGGCGAGCGTCCGGGCTCCCCCGCAGCGCGCTCTACTTCTGC TGGCCCGCGCGGGGTCGCGAGGTGACGGGGGCTGGCCCGGCGAGCGC GGGTGTGTATGCTGTAATCATTCAAAGATAACCAATGTGCCGTGATGATG TGAGCAGATTTTCTCTCAAAAGTGAATCCGACTGAACATCTGTTGCAGAG AGCCCCAGATTATTGCCCTGAACAATGGTTGAAATTTGGAGTTGCATGAATTC GTCTTTGCCAGGGGTATTAAAGATCCGATGGTTGGTTGGCTTAGGCTGCTG TGAATCGGCTATTGGCTTGGAGTCCGACAGGCATGCAAGCAGGCATCTTGA AAAATGATATTCCAAAGTTGCAGGAAGAATATGAGAAATGCTCTTTCAAGTT GCATTAGCAGAAATGAATGGGCTCGGTGCTGCA3'
--	--	--

Para sintetizar a sonda, o cDNA de RECK foi digerido com BAMH1 e ECORV e transcrito com T7 e SP6, respectivamente, para originar as sondas senso e antisenso.

No dia seguinte, as lâminas foram removidas dos sacos plásticos e, em recipiente adequado, lavadas numa solução estrigente de formamida (50% formamida, 5x SSC² [pH4,5]) a uma temperatura de 70°C, em banho-maria, sob agitação, com trocas da solução a cada 15 min, por três vezes. Depois, as lâminas foram lavadas, em três banhos de 5min cada, em uma solução de TBST (10% TBS [pH7,5], 0,1% Tween 20, e 0,04% levamisole). Em seguida, foram bloqueadas com soro fetal bovino 20% em solução TBST, por 1h, à temperatura ambiente.

Após o bloqueio, as lâminas foram novamente colocadas em sacos plásticos, imersas em uma solução³ contendo o anticorpo antidigoxigenin-AB na diluição de 1:2000, onde ficaram durante 18h a 4°C sob agitação. Terminada a incubação com o anticorpo, as lâminas foram lavadas em solução tampão TBST (1xTBS⁴, 1% Tween 20) e incubadas em NTMT (NaCl 5M, 2M Tris-HCl [pH9,5], MgCl₂ 2M e Tween 20). A detecção da reação ocorreu no escuro, com a solução de detecção nitrozol de tetrazólio (0,075g/mL em dimetilformamida) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (0,05g/mL em água) misturados com NTMT na diluição de 1:300 e 1:380, respectivamente, durante o tempo necessário para visualização do sinal (de 2 a 4 horas).

A reação de revelação foi bloqueada com PBT e EDTA 0,5M na proporção de 1:500. As lâminas foram analisadas e o resultado documentado em um microscópio óptico Nikon modelo Eclipse 80i, equipado com uma câmara digital e software de captura Q-imaging Micro Publisher 3.3 RTV.

2 20xSSC = 3,0M NaCl, 0,3M citrato de sódio.

3 Solução TBST contendo 1% soro de carneiro.

4 10xTBS = 1,37M NaCl, 0,027M KCl, 0,25M Tris-HCl (pH7,5).

4.5 IMUNOISTOQUÍMICA

Cabeças (n=5 por grupo) incluídas em parafina, como descrito anteriormente, foram seccionadas em cortes seriados de 5µm (três cortes de cada embrião e para cada anticorpo a ser analisado: MMP-2, MMP-9 e RECK), e estendidos em lâminas preparadas com poli-L-lisina. As lâminas contendo os cortes foram organizadas em recipientes apropriados, e estes foram imersos em uma cuba com xilol, objetivando a desparafinização dos cortes (três banhos sucessivos de 5min). Para a reidratação, as lâminas contendo os cortes foram colocadas em banhos sucessivos de álcool etílico (três banhos de 2min de álcool 100%, três banhos de 2min de álcool 95% e três banhos de 2min de álcool 70%) e lavadas em PBS/triton X-100 (pH7,2) a 0,1% (três banhos de 2min).

As lâminas foram colocadas em uma solução de peróxido de hidrogênio a 10% em PBS por 45min, para bloqueio da peroxidase endógena. As lâminas contendo os cortes foram lavadas em PBS/Triton X-100 0,1% e os antígenos foram recuperados em tampão citrato (pH6,0 a 96°C por 20min). Reações inespecíficas foram evitadas incubando as lâminas em um banho de leite Molico® 4% (albumina), por 20min.

Em seguida, as lâminas foram incubadas por 18h com anticorpos primários IgG policlonais anti-cabra contra as MMP-2 e MMP-9 e proteína RECK, (todos da Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Califórnia, USA), diluídos, respectivamente, 1:200, 1:100 e 1:100 em PBS/BSA 0,1%. Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas em PBS/Triton X-100 0,1% e incubadas por 1h em anticorpo secundário anti-cabra IgG.

Após lavar os cortes em três banhos sucessivos de PBS, estes foram incubados por 45min em Complexo Streptoavidina-Biotina, revelados com cromógeno diaminobenzidina (DAB) em ambiente escuro (aproximadamente 7min) e contracolorados com Hematoxilina de Harris. Para coloração, as lâminas foram deixadas de 30s a 2min na hematoxilina de Harris. Lavadas em água corrente por 10min e em álcool 70%, depois colocadas no xilol e seladas com lamínula e resina.

Biópsias de câncer de mama (fornecidas pelo Serviço de Patologia do Hospital Amarel de Carvalho–Jaú) foram utilizadas como controle positivo para MMP-2 e MMP-9. Para RECK, foram usados embriões inteiros de camundongos com 14DE como controle positivo. A substituição dos anticorpos primários por PBS/BSA 0,1% serviu como controle negativo.

A análise dos cortes foi subjetiva, feita por dois observadores, em ocasiões diferentes, sendo que as lâminas foram identificadas com números, não permitindo que os observadores soubessem de qual imunomarcagem se tratava. As imagens foram analisadas e documentadas em um microscópio óptico Nikon modelo Eclipse 80i, equipado com uma câmara digital e software de captura Q-imaging Micro Publisher 3.3 RTV.

4.6 ANÁLISE ZIMOGRÁFICA

Palatos ($n=5$ por grupo) foram dissecados com auxílio de uma lupa estereoscópica, imediatamente congelados em gelo seco e estocados a -80°C até o momento das análises. O protocolo para as reações zimográficas foram alicerçados nos experimentos de Souza et al. (2000). Os palatos foram macerados em 1mL de uma solução de Triton X-100 25% e, após solubilização, a suspensão foi centrifugada a 45.238g (15.000rpm) durante 20min, e o sobrenadante foi separado.

O sobrenadante foi transferido para outro tubo, ao qual se adicionou 200 μL de tampão tris 50mM e $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10mM (pH7,4) e 1 μL de PMSF (phenyl-methyl sulphonyl fluoride–fluoreto fenil metil sulfonil, um inibidor da serina protease). Em seguida, as amostras foram incubadas a 50°C durante 2h, sendo agitadas levemente a cada 10min. Posteriormente, foram centrifugadas a 45.238g (15.000rpm) durante 20min, e o sobrenadante separado para a etapa seguinte.

Para cada período analisado, foi feito um “pool” constituído de 50 μL de cada uma das cinco amostras do período correspondente, totalizando um volume de 250 μL para cada período. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), sendo albumina bovina 0,1% o padrão utilizado. Para a elaboração da curva padrão e análise dos dados, utilizou-se o software Origin 4.1 (Microcal Inc), obtendo um coeficiente de correlação de 0,99905.

Antes da aplicação das amostras nos géis, foram adicionados a estas o tampão não redutor 2x (Tris HCl [pH6,8] 0,1M, glicerol 20%, dodecil sulfato de sódio [SDS]) 1%, azul de bromofenol 0,001%). Foram aplicados 20 μg de cada amostra no gel de poliacrilamida, contendo SDS descontínuo (gel de largada a 3,8% e gel de separação a 10%), contendo 4% de gelatina como substrato para as MMPs. A corrida foi realizada a 4°C , 30mA, durante 8h. Após o término da corrida, os géis foram colocados em 100mL de solução renaturante (Triton a 2%) trocada a cada 30min (2 vezes). Em seguida, foram incubados em tampão tris 50mM e CaCl_2 10mM, pH7,4, a 37°C durante 18h para reativação das enzimas e degradação da gelatina. Foram corados em solução de Comassie Blue G 250 (0,5%) por 30min e, em seguida, descorados em solução contendo metanol 30%, ácido acético glacial 10%. Os géis foram escaneados em tons de cinza, com resolução de 300dpi. Para a análise quantitativa das bandas, empregou-se o software ImageTool 3 (The University of Texas Health Science Center – San Antonio). A razão entre a área e a densidade das bandas foi utilizada para a determinação de médias (em unidades arbitrárias de intensidade, UAI) e desvios-padrão, submetidos à análise de variância para $p<0,05$, (ANOVA seguido pelo teste de múltipla comparação de Tukey-Kramer).

RESULTADOS

Para facilitar a descrição dos resultados, após a análise histológica, o mesênquima e epitélio palatal foram divididos em regiões. O mesênquima foi dividido em região nasal (n), maxilar (mx), medial (m), midoral (mo), central (c), lateral (l) e do germe dentário (gd). O epitélio foi dividido em região nasal (N), oral (O) e medial (M). A Figura 31 ilustra a divisão esquemática do palato em regiões.

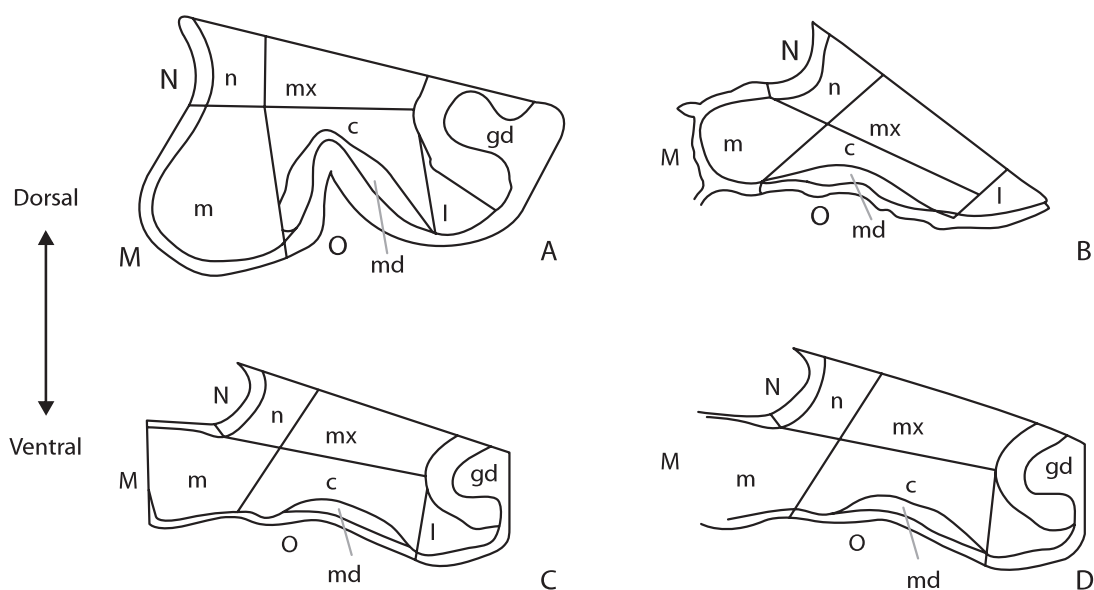
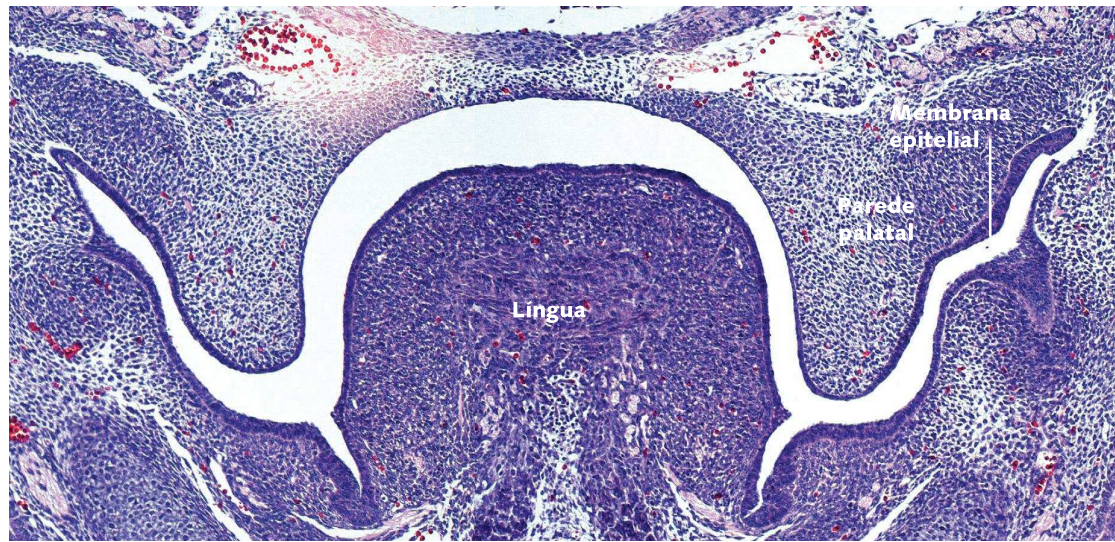


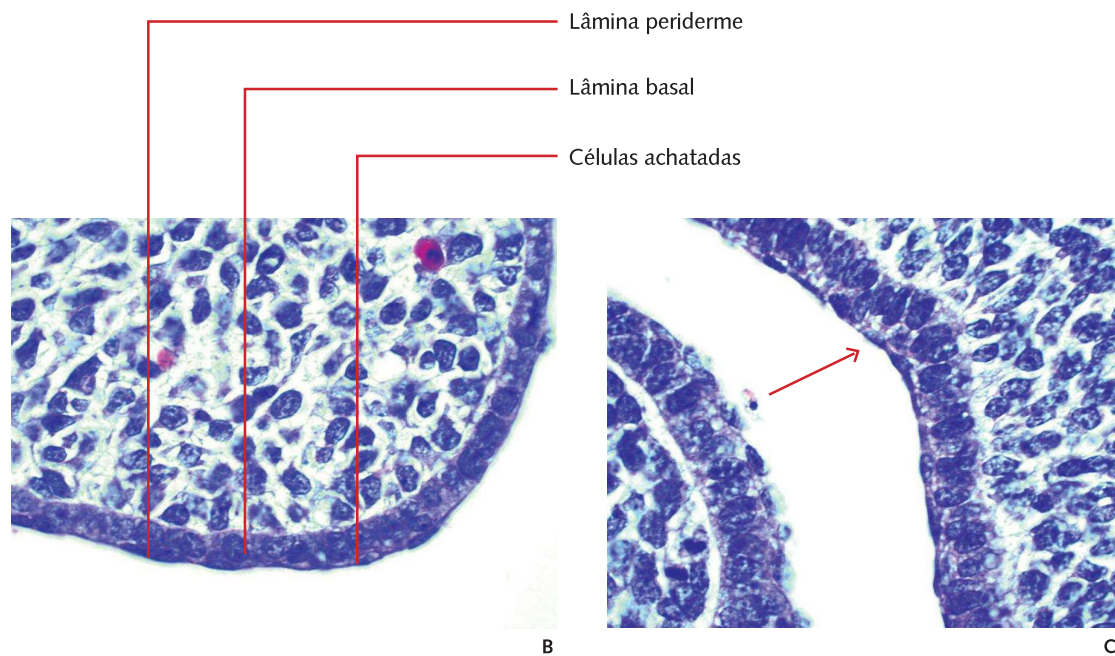
FIGURA 31: Divisão esquemática das regiões da parede palatal. O Mesênquima foi dividido nas regiões: n (nasal), m (medial), mx (maxilar), c (central), l (lateral), md (midoral) e gd (germe dentário). O epitélio foi dividido nas regiões: N (nasal), M (medial) e O (oral). Ilustração de parede palatal de camundongos com: A. 13DE. B. 14DE. C. 14,5DE. D. 15DE.

5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As paredes palatais de embriões com 13DE se encontravam na posição vertical, dispostas ao lado da língua (Figura 32A). Eram constituídas por células mesenquimais revestidas por uma membrana epitelial, sendo que esta apresentava de uma a duas camadas de células epiteliais achatadas (Figura 32B). Em todos os cortes examinados, observou-se que na região oral havia

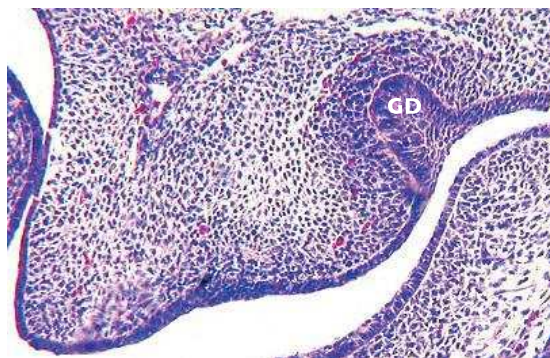


A



B

C



D

FIGURA 32: Cortes histológicos de 5 μ m de espessura, corados com HE, provenientes da parede palatal de camundongos com 13DE. A. Ocorreu o crescimento vertical das paredes palatais. Ampliação de 124 μ m. B. A membrana basal apresentava uma ou duas camadas de células epiteliais. Ampliação de 620 μ m. C. Havia uma curvatura localizada na região oral do epitélio da parede palatal, onde as células se apresentavam mais densas do que aquelas de outras regiões. Ampliação de 620 μ m. D. O germe dentário já podia ser observado, no entanto, ainda não havia indícios de ossificação na região maxilar do mesênquima. Ampliação 62 μ m.

uma acentuada curvatura, onde as células apresentavam-se organizadas de forma diferente daquela encontrada no restante da parede (Figura 32C seta). O germe dentário já podia ser observado, no entanto, ainda não havia indícios de ossificação da região maxilar (Figura 32D).

Aos 14DE, as paredes palatais dos embriões já se encontravam na posição horizontal, acima da língua, com uma LJ intacta formada na região mediana da face (Figura 33A, setas). A curvatura observada na extensão oral da parede no 13DE havia se tornado mais discreta, era possível observar o germe dentário e sítios osteogênicos na região maxilar (Figura 33B, cabeça de seta).

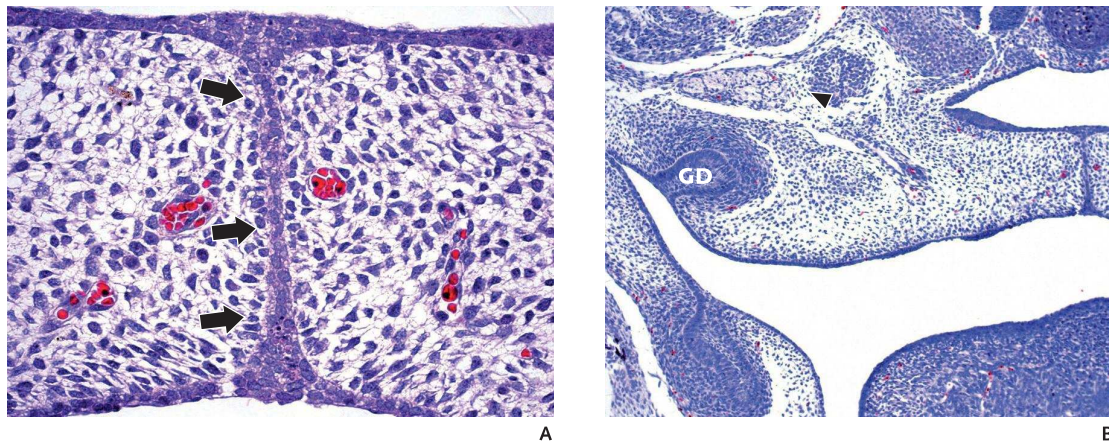


FIGURA 33: Cortes histológicas de 5µm de espessura, corados com HE, provenientes da parede palatal de camundongos com 14DE. A. Ocorreu a horizontalização e formação da LJ entre as duas paredes palatais (setas). Ampliação 248µm. B. A região mx do mesênquima palatal começou a desenvolver sítios osteogênicos, o germe dentário podia ser observado e a curvatura da região oral no epitélio palatal era menos evidente se comparada ao período anterior. Ampliação 62µm.

Com 14,5DE, a morfologia era semelhante ao período anterior, exceto pelo fato de que a LJ formada já estava em processo de degradação, e somente restos desta podiam ser observados (Figura 34A e B setas). As células circunvizinhas à LJ apresentavam indícios de movimentação e nas extremidades da junção, tanto no aspecto oral quanto nasal foi possível observar a formação de um triângulo epitelial (Figura 34C).

Observou-se que a LJ havia sido completamente degradada aos 15DE (Figura 35A) e, em 3 dos 5 embriões analisados nessa fase de desenvolvimento, já não havia mais o triângulo epitelial nas extremidades das paredes; nos embriões restantes (2 de 5), vestígios do triângulo epitelial ainda era visível, indicando uma variação intra-individual. O tecido localizado onde havia a LJ era contínuo e composto novamente por células mesenquimais (Figura 35B, setas).

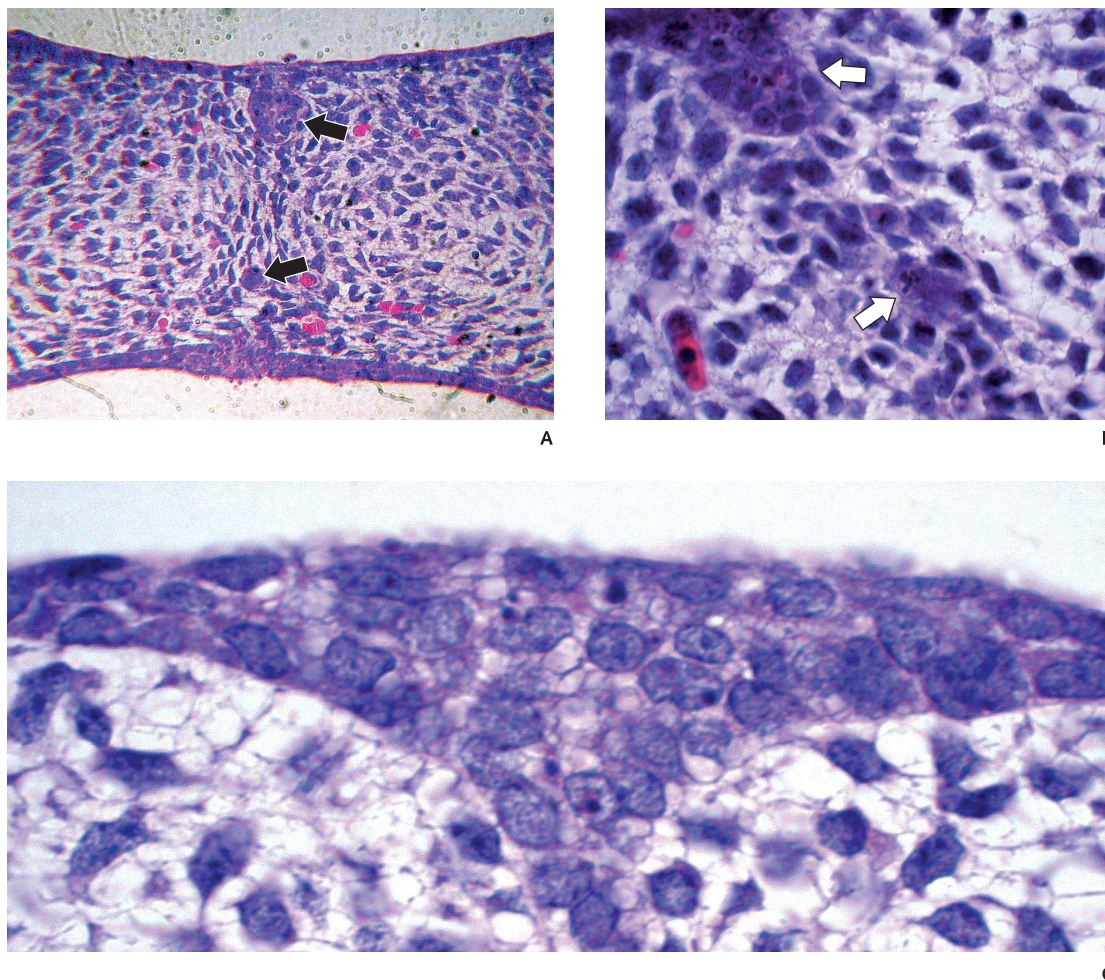


FIGURA 34: Cortes histológicos de 5 μ m de espessura, corados com HE, provenientes da parede palatal de camundongos com 14,5DE. A-B. A LJ formada entre as duas paredes epiteliais se encontrava em processo de degradação, em alguns locais se observava restos desta (setas). Ampliação A 248 μ m e B 620 μ m. C. Observou-se um triângulo epitelial, provável local de migração das células epiteliais da LJ. Ampliação 620 μ m.

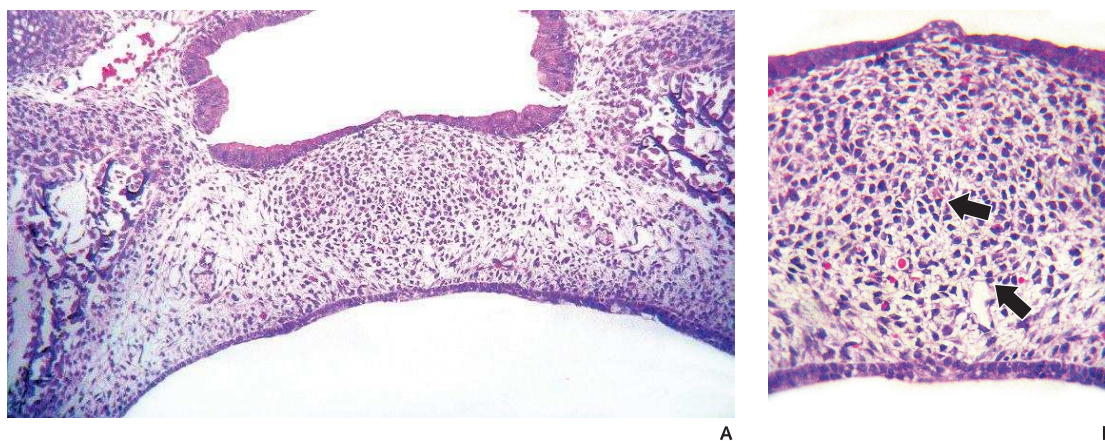


FIGURA 35: Cortes histológicos de 5 μ m de espessura, corados com HE, provenientes da parede palatal de camundongos com 15DE. A. A LJ foi completamente degradada, e a região maxilar se encontrava em processo de ossificação. Ampliação 62 μ m. B. O tecido mesenquimal localizado onde antes havia a LJ era confluyente (setas), formando um único órgão, o palato secundário. Ampliação 120 μ m.

5.2 PCR EM TEMPO REAL

Os resultados obtidos pelo método de PCR em tempo real indicaram a presença de *mRECK* em todos os períodos analisados. A expressão relativa apontou um aumento gradativo entre 13 e 15DE, sendo máxima neste último período (Figura 36).

A análise de variância para $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo teste de múltipla comparação de Tukey-Kramer) demonstrou que os níveis de transcrito são significativamente diferentes entre 13 e 15DE e entre 14 e 15DE.

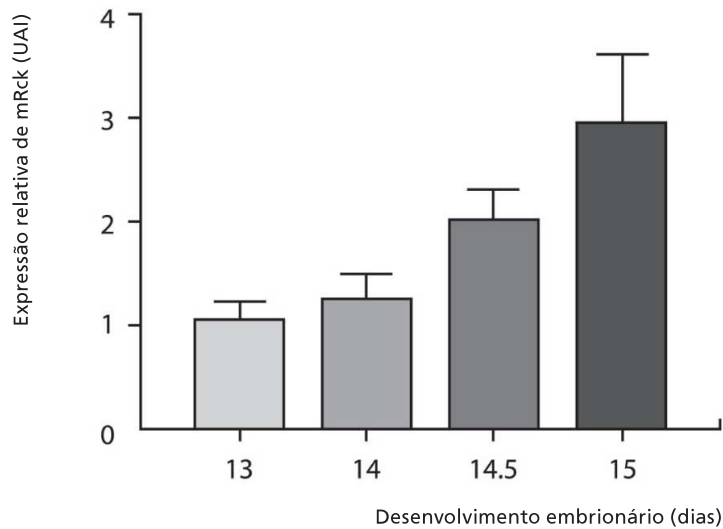
5.3 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

Aos 13DE obteve-se sinal positivo para *mRECK*, de forma difusa, no mesênquima, sendo esse sinal mais evidente na região midoral e medial (Figura 37A, cabeça de seta), e em todas as regiões do epitélio, principalmente a oral (Figura 37A, seta). Aos 14DE o sinal positivo para *mRECK* é menos evidente na região medial do mesênquima palatal, concentrando na LJ (Figura 37B, setas) e epitélio (Figura 37B, cabeça de seta). No 14,5DE, o mesênquima voltou a expressar o sinal positivo para *mRECK*. O epitélio da parede palatal também mostrou sinal positivo, tanto na região oral quanto nasal (Figura 37C, setas), assim como os remanescentes da LJ (Figura 37C, cabeça de seta) e triângulo epitelial (Figura 37C, asteriscos). Aos 15DE, observou-se, no epitélio e mesênquima palatal, um sinal positivo para *mRECK* mais evidente e difuso quando comparado aos períodos anteriores (Figura 37D).

5.4 IMUNOISTOQUÍMICA

A imunomarcção para RECK, aos 13DE, foi observada principalmente na região oral do epitélio palatal (Figura 38A, seta) e difuso em todas as regiões do mesênquima (Figura 38A). Aos 14DE, a imunomarcção de RECK esteve presente em todo epitélio, principalmente na LJ (Figura 38B, setas). No mesênquima, a expressão de RECK continua difusa inclusive nas regiões medial ventral e midoral (Figura 38B). No 14,5DE, a expressão da proteína no mesênquima foi menos intensa se comparada aos períodos anteriores. Já na LJ e no epitélio, o padrão de expressão permaneceu o mesmo (Figura 38C). Aos 15DE, RECK volta a ser expresso no mesênquima palatal com mais intensidade (Figura 38D).

Aos 13DE, as regiões nasal, medial-dorsal, central e maxilar do mesênquima da parede palatal foram imunopositivas para MMP-2 (Figura 38E). O mesmo ocorreu em todas as regiões do epitélio que circunda o mesênquima, principalmente na oral e medial (Figura 38E, seta). A imunomarcção nos períodos de 14 e 14,5DE persistiu na região maxilar, medial, nasal e central do mesênquima se estendendo para a região midoral, mais próxima a CME (Figuras 38E e 38G respectivamente). As células da CME se apresentaram imunopositivas



36: Análise da expressão relativa de mRECK por PCR em tempo real. Ocorreu um aumento gradativo da expressão relativa de mRECK no transcorrer dos períodos analisados. A análise estatística da variância (ANOVA seguido pelo teste de múltipla comparação de Tukey, para $p < 0,05$) demonstrou que os níveis de transcrito são significativamente diferentes entre 13 e 15DE e entre 14 e 15DE.

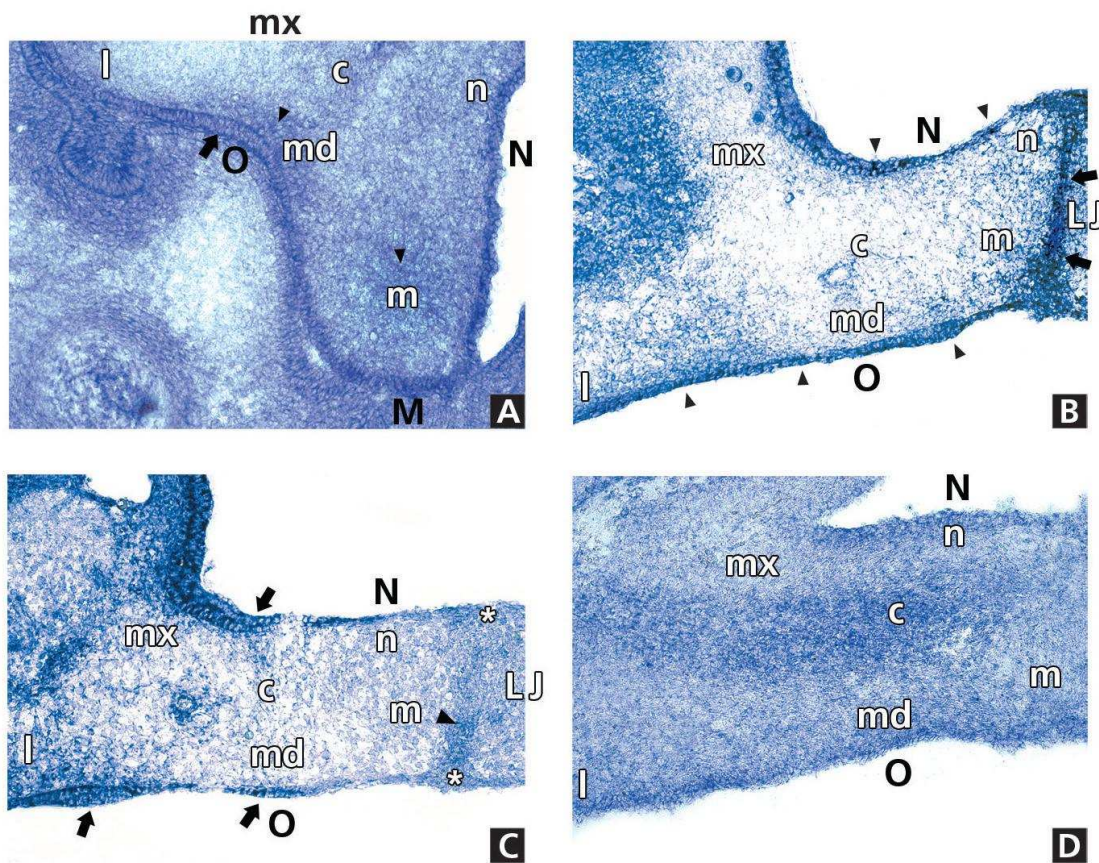


FIGURA 37: Cortes histológicos de 10µm de espessura, provenientes da parede palatal de camundongos, submetidos a reação de hibridização *in situ* para mRECK. A. 13DE. Ocorreu sinal positivo para mRECK no mesênquima, principalmente na região midoral e medial (cabeça de seta), e em todas as regiões do epitélio, sendo mais evidente na oral (seta). B. 14DE. O sinal positivo para mRECK diminuiu no mesênquima medial, concentrando-se na LJ (seta) e epitélio tanto oral quanto nasal (cabeça de seta). C. 14,5DE. O mesênquima voltou a apresentar sinal positivo para mRECK. O epitélio oral e nasal continuou com positivo (seta). Os restos da LJ e triângulo epitelial também eram positivos para mRECK (cabeça de seta e asteriscos). D. 15DE. Observou-se tanto no mesênquima quanto no epitélio um sinal para mRECK mais evidente e difuso do que nos períodos anteriores.

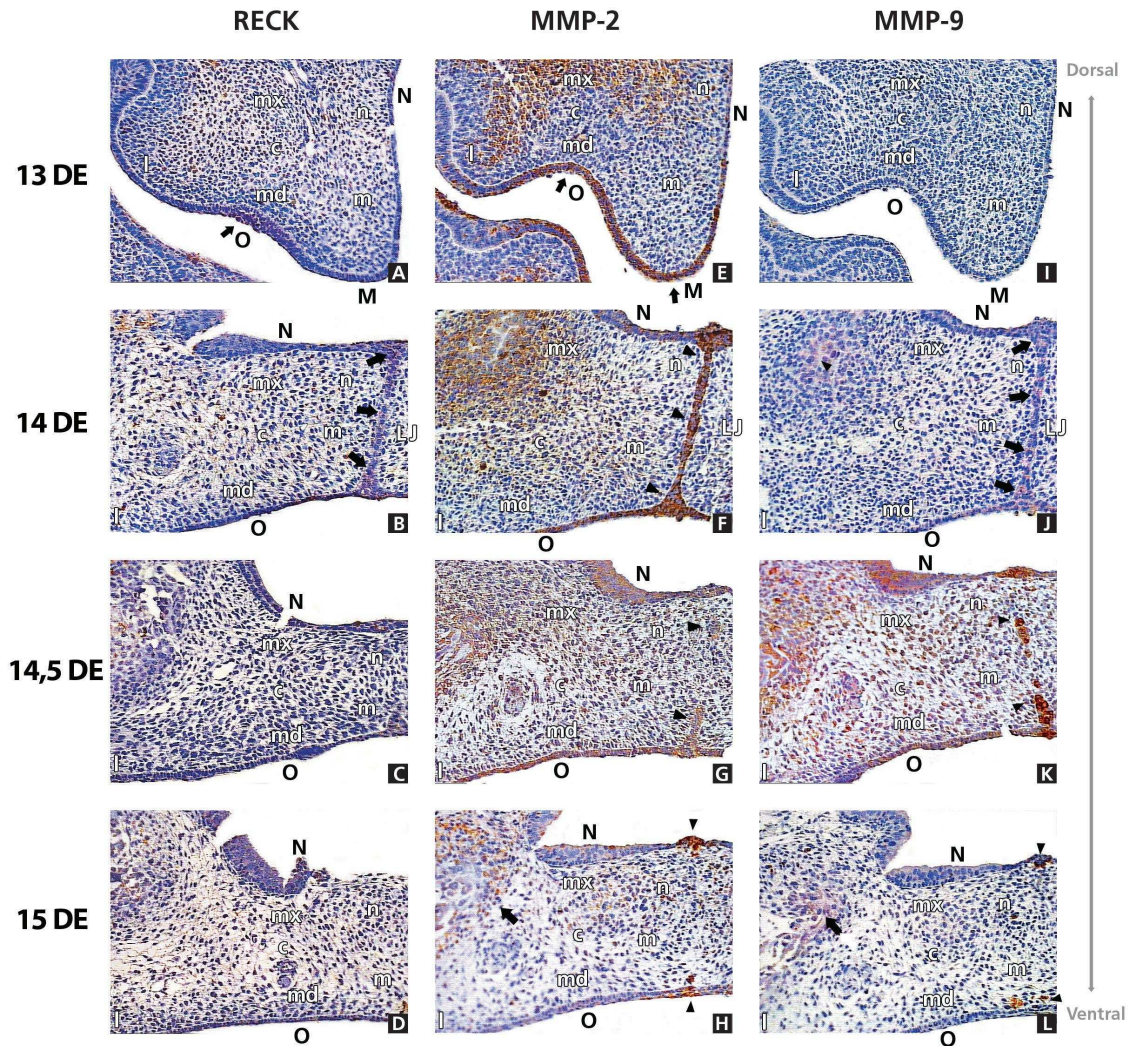


FIGURA 38: Cortes histológicas de 5 μ m de espessura, provenientes da parede palatal de camundongos, submetidos a reação de imunoistoquímica para os anticorpos RECK, MMP-2 e MMP-9. A. 13DE/RECK. Ocorreu principalmente na região oral do epitélio (seta), e difuso em todas as regiões do mesênquima. B. 14DE/RECK. Todo o epitélio expressou RECK, principalmente a LJ (setas), no mesênquima a expressão continuava difusa. C. 14,5DE/RECK. A expressão de RECK foi menos intensa no mesênquima, e permaneceu na LJ. D. 15DE/RECK. RECK voltou a ser expresso no mesênquima. E. 13DE/MMP-2. As regiões nasal, medial-dorsal, central e maxilar do mesênquima da parede palatal foram imunopositivas para MMP-2, assim como todas as regiões do epitélio, principalmente a oral e medial (seta). F. 14DE/MMP-2. As regiões maxilar, medial, nasal e central do mesênquima continuavam expressando MMP-2, o mesmo ocorreu com a LJ formada entre as paredes (cabeça de seta). G. 14DE/MMP-2. A expressão de MMP-2 no mesênquima se estendeu para a região midoral. Os restos de LJ ainda expressavam MMP-2 (cabeça de seta). H. 15DE/MMP-2. A imunomarcação de MMP-2 espalhou se para todo o mesênquima, principalmente nos sítios osteogênicos (setas). No epitélio, quando ainda havia triângulo epitelial, este apresentava expressão de MMP-2 (cabeça de seta). I. 13DE/MMP-9. Não houve expressão de MMP-9 nesse período. J. 14DE/MMP-9. Observou-se expressão de MMP-9 na LJ (setas) e sítios osteogênicos (cabeça de seta). K. 14,5DE/MMP-9. Ocorreu expressão de MMP-9 na região medial ventral e midoral do mesênquima e na LJ ou seus remanescentes (cabeça de seta). L. 15DE/MMP-9. Ocorreu expressão de MMP-9, principalmente nos sítios osteogênicos (seta) e no triângulo epitelial ou vestígios deste (cabeça de seta).

(Figura 38F e 38G, cabeças de seta). Aos 15DE, todas as regiões do mesênquima eram imuno-positivas para MMP-2, principalmente nos sítios osteogênicos das regiões maxilar e central (Figura 38H setas). No epitélio, observou-se uma imunomarcação no triângulo epitelial ou vestígios deste (Figura 38H, cabeça de seta).

Aos 13DE, não se observou imunomarcação da MMP-9 no tecido mesenquimal e epitelial do palato secundário (Figura 38F). Aos 14DE, essa enzima foi expressa na LJ das duas paredes (Figura 38J, setas) e na região maxilar, mais especificamente nos sítios osteogênicos (Figura 38J, cabeça de seta). Aos 14,5DE, a MMP-9 se espalhou para outras regiões do mesênquima, incluindo a medial ventral e midoral (Figura 38K), enquanto as células da LJ ou seus remanescentes continuam expressando MMP-9 (Figura 38K, cabeça de seta). Aos 15DE, a expressão de MMP-9 é mais evidente nos sítios osteogênicos (Figura 38L, setas) e no triângulo epitelial, ou vestígios deste, tanto no aspecto nasal quanto no oral (Figura 38L, cabeça de setas).

5.5 ZIMOGRRAFIA

A análise zimográfica mostrou a presença de MMP-2 nas formas pró, intermediária e ativa, em todos os períodos analisados (Figura 39A), sendo que o nível máximo de atividade ocorreu no 14,5DE.

A MMP-9 não foi detectada aos 13DE, no entanto, foi observada nos períodos seguintes, tendo, também, sua máxima atividade no 14,5DE. A análise de variância para $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo teste de múltipla comparação de Tukey-Kramer) demonstrou que a concentração relativa de MMP-2 nas formas pró, intermediária e ativa, assim como a sua concentração total, variaram de forma significativa entre os períodos analisados, o mesmo ocorreu com a MMP-9 (Figura 39B).

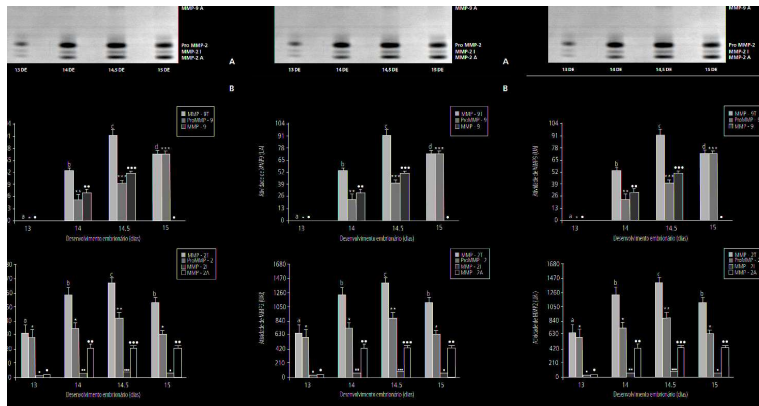


FIGURA 39: Análise zimográfica de MMP-2 e MMP-9. A. Eletroforese em gel. MMP-2 estava presente em todos os períodos analisados nas formas pró, intermediária e ativa. MMP-9 esteve presente em todos os períodos analisados, exceto no 13DE, nas formas ativas e de pró-enzima. B. Análise estatística pelo método da Variância (ANOVA seguido pelo teste de múltipla comparação de Tukey-Kramer, para $p < 0,05$) indicou que a concentração relativa de MMP-2 e MMP-9 variam de forma significativa entre os períodos analisados. Símbolos e letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes.

DISCUSSÃO

Embora os eventos envolvidos na palatogênese possam diferir entre as classes de vertebrados, a sequência destes ocorre similarmente em todos os embriões de mamíferos. Dessa forma, a palatogênese em roedores foi intensamente estudada e ficou estabelecido que eles constituem um excelente modelo experimental (BIDDLE; ZIMMERMAN, 1984; GURLEY; WAMSLEY; SANDELL, 2004).

O tempo de gestação de roedores depende da espécie e linhagem em questão, refletindo na evolução do desenvolvimento embrionário de cada espécie, além disso, há de se levar em conta as variações normais dentro de uma mesma espécie. Assim, fez-se necessário uma avaliação morfológica em relação aos três principais estágios da organogênese do palato secundário dos camundongos usados neste estudo, de forma que nosso modelo experimental pudesse refletir adequadamente os três principais estágios da morfogênese do palato secundário.

Observamos que os camundongos *Mus musculus*, obtidos no biotério da USP *campus* de Bauru, possuem características morfológicas compatíveis com aquelas discutidas na literatura para essa espécie, sendo que o início do crescimento dos processos palatais ocorreu antes dos 13DE e a completa fusão das paredes ocorreu por volta do 14,5/15DE. De acordo com essas observações, estabelecemos que o período de desenvolvimento que melhor representaria a fase de reorganização tecidual que precede a elevação das paredes seria o de 13DE. Para representar os eventos que acontecem durante a fusão das CME e a degradação da LJ formada escolhemos os períodos de 14 e 14,5DE. Para a avaliação do palato após a completa fusão, escolhemos embriões de 15DE.

O período de formação do palato secundário é caracterizado por uma intensa atividade celular que resulta em mudanças no comportamento e composição da MEC. Nossos resultados mostraram que há uma variação na distribuição temporal e espacial das MMP-2, MMP-9 e RECK durante esses eventos, que pode estar correlacionada com a reorganização do tecido mesenquimal e epitelial. No entanto, quando comparamos a expressão de RECK, MMP-2 e MMP-9 entre si percebemos coincidências na distribuição espacial e temporal que podem apontar uma interação entre essas moléculas.

No primeiro estágio de formação do palato secundário (13DE) todas as regiões da MEC são compostas, principalmente, de fibronectina, colágeno I e III e ácido hialurônico (MORRIS-WIMAN; BRINKLEY, 1992; 1993; KNUDSEN; BULLEIT; ZIMMERMAN, 1985; MANSELL

et al., 2000). À medida que o remodelamento ocorre, há uma diminuição de fibronectina e colágeno III nas regiões medial dorsal, central e lateral do mesênquima palatal, o padrão de distribuição de colágeno I não sofre alterações significantes. Essas regiões passam a ser compostas principalmente de ácido hialurônico que, devido aos seus grupamentos carboxila e a conseqüente hidrofilia associada à grande extensão e flexibilidade das suas cadeias, formam soluções extremamente viscosas, fundamentais à estruturação do tecido e à migração celular, promovendo condições ideais para o crescimento tecidual. Esse crescimento é limitado, na porção dorsal, pela região maxilar; na porção ventral, pela região midoral; e, lateralmente, pelo germe dentário. Há evidências de que essa expansão central-medial de MEC rica em ácido hialurônico é que provoca a força intrínseca necessária para a elevação das paredes palatais (MORRIS-WIMAN; BRINKLEY, 1992; 1993; MORRIS-WIMAN; BURCH; BASCO, 2000).

Aos 13DE, imunolocalizamos a MMP-2 nas regiões nasal, medial dorsal, central e maxilar do mesênquima, sugerindo que a MMP-2 atua na degradação de fibronectina e colágeno III nesses locais, proporcionando o direcionamento adequado da expansão de MEC rica em ácido hialurônico. Ainda, observamos a presença da MMP-2 no epitélio que circunda o tecido mesenquimal da parede palatal, principalmente nas regiões oral e medial. A expansão da parede palatal exige o remodelamento do epitélio, constituído principalmente por colágeno I, III, IV e laminina (MORRIS-WIMAN; BRINKLEY, 1992), o que poderia ser obtido pela ação da MMP-2.

A observação da acentuada curvatura na extensão oral da parede palatal, com características indicando uma maior densidade celular do que em outras regiões do epitélio parece ser importante. Bulleit e Zimmerman (1985) relataram a inibição da reorientação das paredes palatais pela retirada do epitélio oral *in vitro*, isto não era observado quando a região retirada era a do epitélio nasal. Esse fato sugere a importância do epitélio oral na reorientação do palato secundário. Não detectamos imunomarcação para MMP-2 na região midoral (rica em colágeno I) e medial-ventral do mesênquima, o que fortalece a hipótese de que existe uma região com maior estabilidade, limitando uma expansão ventral e, conseqüentemente, direcionando o crescimento da parede palatal.

A análise zimográfica confirmou a presença da MMP-2 em todos os períodos analisados, tanto na forma ativa como intermediária e inativa. O pico máximo de síntese da enzima (MMP-2 total) ocorreu entre o 14 e 14,5DE, exatamente nos períodos nos quais há necessidade de maiores atividades da MMP-2 devido à degradação da LJ. Nesses períodos, assim como no 15DE, a presença de MMP-2 ativa encontra-se maior do que no 13DE, no qual predomina a forma pró-MMP-2. É muito interessante percebermos que a mudança entre as formas de MMP-2 é mais significativa do que o seu aumento total. Esse fato sugere que o mecanismo de inibição da MMP-2 deve estar mais concentrado na inibição direta da atividade do que na inibição transcricional. Dessa forma, podemos dizer que a interação entre MMP-2 e seus inibidores é o ponto-chave para a manutenção ou remodelamento tecidual da parede palatal.

A MMP-9 não foi detectada no período de 13DE em nenhuma das regiões, por quaisquer dos métodos utilizados neste estudo, confirmando os relatos de Brown et al. (2002). A ausência de MMP-9 na parede palatal, neste estágio inicial, sua presença nos estágios posteriores e o seu pico de expressão no 14,5DE, sugerem que a sua secreção ocorra por células da membrana basal e células diferenciadas, tais como em osteoblastos, nos sítios osteogênicos.

A MMP-9 foi observada nas formas inativa (pró-MMP-9) e ativa, sendo digno de nota o fato de que esta última tem seu pico máximo no 14,5DE. No entanto, no 15DE, somente a forma pró-MMP-9 está presente, sugerindo a ação de um inibidor da sua atividade.

O aumento da atividade MMP-2 e MMP-9 na LJ ou seus remanescentes aos 14, 14,5DE pode ser atribuída à ação dessas enzimas na degradação da MEC e membrana basal da LJ, que é composta por colágeno tipo III e IV, fibronectina, laminina e tenascina (FYFE; FERGUNSON; CHIQUET-EHRISMANN, 1988; MORRIS-WIMAN; BRINKLEY, 1992; 1993; MORRIS-WIMAN; BURCH; BASCO, 2000).

A degradação da membrana basal também provoca mudanças nas interações célula-célula e célula-matriz, que estão envolvidas na adesão e migração celular e na trans-diferenciação epitélio-mesênquima (MARSCHITZ et al., 2000; BLAVIER et al., 2001). De fato, a MMP-2 tem a habilidade de clivar os colágenos I (AIMES; QUIGLEY, 1995), III (BERTON et al., 2000), IV (MURPHY; CRABBE, 1995), fibronectina (CAWSTON, 1996), tenascina-C (SIRI et al., 1995) e laminina (ALEXANDER, 2002) e a MMP-9 de degradar o colágeno tipo IV (MURPHY; CRABBE, 1995) e fibronectina (ALEXANDER, 2002).

É interessante lembrarmos que ao mesmo tempo em que a degradação de tecido mesenquimal e epitelial é crucial para o desenvolvimento, na mesma intensidade é crucial o controle dessa degradação.

A ação das MMPs na MEC é regulada por três diferentes mecanismos: a regulação da transcrição, a ativação das formas latentes e a inibição da atividade. Até o momento, a classe de inibidores de MMPs mais estudada durante a embriogênese é a dos TIMPs. Na palatogênese, a interação TIMP-MMP tem sido considerada o ponto decisivo para a manutenção da MEC e a completa fusão das paredes palatais. Entretanto, a descoberta do gene RECK e a elucidação do mecanismo de ação do seu produto sobre as MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP sugerem que, assim como estas, a proteína RECK possa estar presentes nos diferentes estágios de formação do palato secundário. Este trabalho relata pela primeira vez o padrão de expressão do gene RECK e a distribuição espacial e temporal de seu transcrito durante a palatogênese.

Na etapa de reorganização das paredes palatais (13DE), o sinal positivo para mRECK e a imunomarcagem de seu produto foram observados nas mesmas regiões que a MMP-2, porém, houve uma região, a midoral, onde o sinal positivo para mRECK foi bem evidente, sem, no entanto, ocorrer a expressão de MMP-2 ou MMP-9. Essa aparente discrepância pode ser atribuída ao intervalo de tempo entre a codificação e a expressão da proteína RECK. De sorte que, os 14DE, observamos que a MMP-2 se espalha em direção à região medial ventral

enquanto a MMP-9 passa a ser expressa por osteoblastos e células epiteliais próximas a essa região. Provavelmente mMMP-2 e mMMP-9 teriam seus sinais positivos na região medial ventral no 13DE, culminando na expressão da proteína no 14DE.

O sinal positivo para mRECK, assim como a imunomarcagem do seu produto e da MMP-2, tornaram-se menos evidentes nas regiões nasal e medial dorsal do mesênquima após o contato entre as duas cristas (14DE), ou seja, quando as células do tecido mesenquimal dessas regiões diminuem sua atividade. As regiões em processo de ossificação e as células subjacentes a CME continuam a expressar essas moléculas. No entanto, nesse estágio e no seguinte (14 e 14,5DE), MMP-2, MMP-9, RECK e mRECK se concentraram na LJ ou seus remanescentes, exatamente onde a remodelação da MEC se mostra mais necessária.

A confirmação da presença de mRNA e da proteína RECK, nos três estágios de formação do palato secundário, apresentando variação no seu padrão de distribuição temporal e espacial durante a palatogênese, semelhante ao observado para MMP-2 e MMP-9 neste trabalho e para MT1-MMP (BLAVIER et al., 2001) e TIMPs (MORRIS-WIMAN; BURCH; BASCO, 2000), sugere, fortemente, uma possível interação e modulação de atividade entre RECK, MMPs e TIMPs. Os dados obtidos no presente estudo, aliados aos resultados descritos por outros autores e que serão apresentados logo a seguir, podem representar argumentos suficientes para a elaboração dos possíveis mecanismos dessa interação.

Foram identificadas pelo menos três categorias de moléculas que causam a reversão do fenótipo tumoral. Aquelas que interferem na via de sinalização Ras; aquelas que ajudam na manutenção do fenótipo normal, mas são reguladas pela via de sinalização Ras; e aquelas que induzem a reversão do fenótipo independente da via de sinalização Ras. O RECK, provavelmente, se encaixa na segunda categoria, já que é negativamente regulado por Ras ativado (NODA et al., 2003).

O proto-oncogene RAS sintetiza um grupo de proteínas de 21 kDa, associadas à porção interna da membrana celular. Em sua forma ativa, as proteínas Ras atuam em cadeias efetoras, como as serina/treonina-quinases da família Raf (Raf-1, Raf-A e Raf-B), Rac, Rho e a fosfatidilinositol-3-quinase, que são mediadores de importantes funções celulares (RODENHUIS; SLEBOS, 1990). Especificamente a interação entre Ras e Raf produz ativação da via de sinalização por MAPK (proteinoquinases mitógeno-ativadas) e ERK (quinases reguladas por sinais extracelulares), resultando na fosforilação de alvos citoplasmáticos e nucleares que regulam a expressão gênica (CAMPBELL et al., 1998).

O mecanismo pelo qual essa via de sinalização Ras regula negativamente a expressão da proteína RECK ainda não é totalmente conhecido. No entanto, Sasahara, Tasahashi e Noda (1999) demonstraram que a supressão da expressão de RECK em resposta a ativação de Ras ocorre, pelo menos em parte, no sítio putativo Sp1 B, devido a uma modulação da atividade trans-reguladora dos fatores de crescimento Sp1 e Sp3. Fatores de crescimento Sp1 estão envolvidos na via de sinalização Ras/Raf. Essa via altera a atividade trans-ativadora de Sp1, impedindo a

ativação transcricional de RECK. Há relatos de outros oncogenes que inibem a expressão de RECK. São eles os v-fos, c-myc, v-src, v-fms, v-fes e v-mos (TAKAHASHI et al., 1998).

Há tempos vêm sendo demonstrado que a ativação de oncogenes reprime a expressão de moléculas de MEC, como o colágeno I, fibronectina (YAMADA; OLDEN, 1978; FAGAN et al., 1981; ADAMS et al., 1982; ALLEBACH et al., 1985; URTREGER et al., 2006) e receptores de integrinas (PLANTEFABER; HYNES, 1989), além de exacerbar a atividade de MMPs. Essas alterações devem ser conseqüências da inibição da expressão de RECK e ocasionam drásticas mudanças morfológicas e diminuição da interação célula-matriz com redução da adesão celular.

Apesar de todas as evidências indicarem a importância das MMPs e das TIMPs nos processos de remodelamento de MEC, sejam eles fisiológicos, patológicos ou de morfogênese, nenhum grupo de pesquisadores conseguiu demonstrar, de forma direta, esse fato. Por exemplo, camundongos nulos para MMP-2, MMP mais largamente expressa em todos os tipos de tecidos, nascem sem apresentar qualquer mudança de fenótipo (ITOH et al., 1997; ITOH et al., 1998; KATO et al., 2001). Camundongos nulos para MT1-MMP, MMP responsável pela ativação de MMP-2, apresentam somente algumas pequenas anormalidades ósseas (ZHOU et al., 2000), enquanto camundongos nulos para TIMP-1 e TIMP-2 (a TIMP-2 está envolvida no processo de ativação e inibição de MMP-2) não apresentam anormalidades após o nascimento (CATERINA et al., 2000; WANG; JUTTERMANN; SOLOWAY, 2000; BIGG et al., 2001; BAKER et al., 2002;).

Entretanto, Oh et al (2001) relataram que camundongos nulos para RECK morrem no 10,5º dia de vida intra-uterina, com baixo peso corporal e um maciço processo hemorrágico. Até esse estágio de desenvolvimento embrionário, camundongos normais apresentam um alto nível de expressão de RECK em células murais e tubo neural, e em níveis moderados em tecidos mesenquimais e nos somitos. Uma avaliação histológica dos tecidos mesenquimais provenientes desses camundongos nulos para RECK mostra diversos níveis de desorganização. A borda entre o neuro-epitélio e o mesênquima chama a atenção devido à severidade do seu nível organizacional.

Esse mistério se torna ainda mais intrigante quando, em 2004, Nuttall et al. avaliaram o padrão de expressão de TIMPs (1-4) e de RECK em cérebro, coração, pulmão, rim e fígado de embriões de camundongos, e sugerem que não há um padrão distinto entre a expressão de RECK e TIMPs que explique o fato da ausência da expressão de RECK ser letal e a de TIMPs não. Ainda, os resultados de Nuttall et al. (2004) indicam uma maior expressão de TIMPs, principalmente da TIMP-2, do que de RECK em todos os tecidos analisados por eles.

Os experimentos dos grupos de Oh e Nuttall suportam evidências de que a integridade ou adequada formação de um tecido ou órgão é conseqüência do balanço entre MMPs e o nível de interação desta com seus inibidores, não somente TIMPs, mas particularmente RECK. Um forte indício nesse sentido é a recuperação parcial do fenótipo letal de RECK^{-/-} em camundongos nulos para MMP-2. A falta de expressão de MMP-2 retarda a morte intra-uterina de camundongos

em até um dia e a comparação entre embriões de 10,5DE aponta uma organogênese menos comprometida em embriões RECK^{-/-}/MMP^{-/-} (OH et al., 2002).

O experimento de Oh (2001) fornece, ainda, evidências de que a perda do controle da atividade de MMPs durante o desenvolvimento de embriões nulos para RECK é a responsável pelo fenótipo observado nesses natimortos:

- a análise zimográfica de tecidos provenientes desses embriões indica que eles produzem elevados níveis de MMP-2 ativa;
- uma alta atividade de MMPs é observada quando se compara esses embriões com embriões controle;
- a quantidade de colágeno I e colágenos fibrilares estão drasticamente diminuídas nesses embriões;
- embriões mutantes RECK^{-/-} e MMP2^{-/-} mostram um desenvolvimento no peso corporal maior do que os RECK^{-/-}, uma arquitetura tecidual intacta e um período de vida intra-uterina prolongado em um dia.

É interessante ressaltar que camundongos MMP-2^{-/-} não sofrem qualquer alteração fenotípica. Daí se conclui que a perda do controle da atividade de MMP-2 pode ser devido à perda da atividade de RECK, e é a grande responsável pela mudança do fenótipo desses animais.

Isso leva ao questionamento da atividade inibitória das TIMPs. Qual seria o fator determinante para animais TIMPs^{-/-} não apresentarem mudanças fenotípicas enquanto animais RECK^{-/-} não sobrevivem nem a vida intra-uterina? TIMPs e RECK apresentam algumas similaridades na estrutura primária. A marcante diferença entre RECK e TIMPs está na sua localização sub-celular: RECK está ancorado à membrana enquanto as TIMPs aparecem difusas na MEC. Devido a isso, RECK atua de forma mais localizada, na vizinhança da superfície celular. Já as TIMPs atuam mais longe da superfície celular, embora possam atuar mais próximo da superfície celular quando da formação de complexos com moléculas de membrana, como as MT1-MMP. Contudo, neste caso a sua função é de ativação e não de inibição.

Em resumo, podemos sugerir que MMPs e RECK sejam proteínas moduladoras da morfogênese do palato secundário, possivelmente dependente da razão de expressão desses genes em determinado local e momento. As observações que nos levam a essa afirmação são, primeiro, o fato de observarmos, aos 13DE, que as regiões ricas em colágeno I expressam MMP-2, mas também RECK, o que ajuda a manter a integridade do tecido responsável pelo direcionamento do crescimento das paredes palatais. Uma exceção feita a essa regra é a ausência de MMP-2 na região midoral. Essa região expressa mRECK e RECK e é o ponto de atuação da força intrínseca responsável pela elevação das paredes palatais.

Segundo, que aos 14 e 14,5DE o padrão de expressão MMP-2, MMP-9 e RECK ocorre de acordo com os processos biológicos de cada região do processo palatal, porém, mantendo uma

similaridade de distribuição. No entanto, a LJ apresenta elevados níveis de expressão para essas proteínas, corroborando a hipótese de modulação entre essas moléculas durante o processo de fusão (adesão celular) com posterior degradação da LJ (degeneração de colágeno I, III, IV, fibronectina, laminina; migração e transdiferenciação celular).

Por fim, aos 15DE a expressão de MMP-2, MMP-9 e RECK é mais evidente nas membranas basais e nos sítios de ossificação, que continuam em intensa atividade celular, mostrando que as outras regiões já completaram o seu desenvolvimento, necessitando somente do remodelamento de manutenção.

Deve-se, ainda, levar em conta que durante a formação do palato secundário tanto MMP-2, MMP-9 quanto MT1-MMP estão envolvidas em outras vias de sinalização, desencadeando, *in vivo*, uma intrincada rede de mecanismos interdependentes e necessários para a completa fusão das paredes palatais.

É evidente que essa complexa rede de mecanismos de regulação envolvidos no processo de formação do palato secundário esteja, ainda, longe de ser completamente compreendida. Porém, podemos inferir que RECK seja um modulador da atividade de MMP-2 e MMP-9 durante o remodelamento da MEC, possivelmente sob o controle da via de Ras (e outros oncogenes), e que esse circuito parece ser essencial para a palatogênese. Dessa forma, seriam extremamente interessantes experimentos em que o gene RECK fosse suprimido justamente no 13, 14 e 14,5DE, comparando o fenótipo palatal destes com o de camundongos normais e camundongos MMP-2^{-/-}. Também seria interessante usar um modelo experimental onde os camundongos fossem GAP^{-/-}, já que GAP é um regulador negativo de Ras.

Apesar de ainda estarmos longe de compreender todos os processos moleculares envolvidos na formação do palato secundário, os experimentos realizados neste estudo abrem caminhos para um novo e amplo campo de pesquisas que poderá nos ajudar não somente a compreender esses intrincados mecanismos, mas também a elaborar estratégias de prevenção de fissuras.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem as seguintes conclusões:

- os períodos gestacionais em camundongos que melhor representam as principais etapas de formação do palato secundário são 13DE (crescimento vertical), 14DE (horizontalização e fusão), 14,5DE (degradação) e 15DE (completa fusão);
- RECK está presente nos três períodos de formação do palato secundário em camundongos;
- a análise do padrão de expressão temporal e espacial de RECK e mRECK indica que no transcorrer dos três estágios há variações na intensidade e nos locais de sua distribuição.
- metaloproteinase-2 e metaloproteinase-9 também estão presentes na parede palatal durante os três principais estágios de formação do palato secundário, com exceção de metaloproteinase-9 no 13DE.
- a análise subjetiva do padrão de expressão temporal e espacial entre RECK, MMP-2 e MMP-9 é, na maioria das vezes, coincidentes entre si, sugerindo que estejam envolvidas em uma mesma rede de sinalização;
- o fato da expressão máxima de RECK ocorrer no 15DE, logo após a expressão máxima de MMP-2 e MMP-9, sugere que RECK esteja modulando a atividade dessas duas enzimas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, S. L. et al. Regulation of the synthesis of extracellular matrix components in chondroblasts transformed by a temperature-sensitive mutant of Rous sarcoma virus. *Cell*, Cambridge, v. 30, n. 2, p. 373-384, Sept. 1982.

AIMES, R. T.; QUIGLEY, J. P. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific $\frac{3}{4}$ and $\frac{1}{4}$ – length fragments. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 270, n. 11, p. 5872-5876, Mar. 1995. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/reprint/270/11/5872>>. Acesso em: 15 abr. 2007.

ALEXANDER, P. Extracellular matrix proteases. *Oncogene Research Products*, Darmstadt, v. 2, p. 1-18, Jan. 2002. Disponível em: <<http://www.emdbiosciences.com/docs/docs/LIT/CB0707.pdf>>. Acesso em: 4 abr. 2005.

ALLAN, J. A. et al. Binding gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *The Biochemical Journal*, London, v. 309, n. 1, p. 299-306, July 1995.

ALLEBACH, E. S. et al. Control of types I and II collagen and fibronectin gene expression in chondrocytes delineated by viral transformation. *Molecular and Cellular Biology*, Washington, v. 5, n. 5, p. 1002-1008, May 1985.

AMIN, N. et al. Alterations in Vascular Pattern of the Developing Palate in Normal and Spontaneous Cleft Palate Mouse Embryos. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, Lewiston, v. 31, n. 5, p. 332-344, Sept. 1994.

BERNARDO, M. M.; FRIDMAN, R. TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. *The Biochemical Journal*, London, v. 374, n. 3, p. 739-745, Sept. 2003. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?iid=122179>>. Acesso em: 1 fev. 2007.

BERTON, A. et al. Analysis of the ex vivo specificity of human gelatinases A and B towards skin collagen and elastic fibers by computerized morphometry. *Matrix Biology*, Stuttgart, v. 19, n. 2, p. 139-148, May 2000.

BIAN, J.; SUN, Y. Transcriptional activation by p53 of the human type IV collagenase (gelatinase A or matrix metalloproteinase 2) promoter. *Molecular and Cellular Biology*, Washington, v. 17, n. 11, p. 6330-6338, Nov. 1997.

BIDDLE, F. G.; ZIMMERMAN, E. F. *Palate Development: Normal and Abnormal Cellular and Molecular Aspects*. Orlando: Academic Press, 1984. 251 p.

BIGG, H. F. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 inhibits but does not support the activation of gelatinase A via efficient inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *Cancer Research*, Baltimore, v. 61, n. 9, p. 3610-3618, May 2001.

BLAVIER, L. et al. TGF-Beta3-induced Palatogenesis Requires matrix Metalloproteinases. *Molecular Biology of the Cell*, Bethesda, v. 12, n. 5, p. 1457-1466, May 2001.

BRADFORD, M. M. A rapide and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, May 1976.

BRINKLEY, L. L., MORRIS-WIMAN, J. The role of extracellular matrices in palatal shelf closure. *Current Topics in Developmental Biology*, New York, v. 19, p. 17-36, 1984.

BRINKLEY, L. L.; VICKERMAN, M. M. The effects of chlorcyclizine induced alterations of glycosaminoglycans on mouse palatal shelf elevation *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, London, v. 69, p. 193-213, June 1982.

BROWN, N. L. et al. Matrix Metalloproteinases have a Role in Palatogenesis. *Journal of Dental Research*, Chicago, v. 81, n. 12, p. 826-830, Dec. 2002.

BROWN, N. L., SANDY, J. R. Basic sciences in normal and abnormal palate development. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, Piracicaba, v. 2, n. 1, p. 60-70, July/Sept. 2002.

BULLEIT, R. F.; ZIMMERMAN, E. F. The influence of the epithelium on palate shelf reorientation. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, Cambridge, v. 88, p. 265-279, Aug. 1985.

BURDETT, D. N.; WATERFIELD, J. N.; SHAH, R. M. Vertical development of the secondary palate in the hamster embryos following exposure to 6-mercaptopurine. *Teratology*, New York, v. 37, n. 6, p. 591-598, June 1988.

BUTLER, G. S. et al. The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase “receptor” regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A: a kinetic study. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 273, n. 2, p. 871-880, Jan. 1998.

CAMPBELL, S. L. et al. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*, Basingstoke, v. 17, n. 11, p. 1395-1413, Sept. 1998.

CANTEMIR, V. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression during cardiac neural crest cell migration and its role in pró-MMP-2 activation. *Developmental Dynamics*, New York, v. 231, n. 4, p. 709-719, Dec. 2004.

CARRETE, M. J. M.; FERGUSON, M. W. J. The fate of medial edge epithelial cells during palatine fusion in vitro: an analysis by Dil labelling and confocal microscopy. *Development*, Cambridge, v. 114, n. 2, p. 379-388, Feb. 1992.

CATERINA, J. J. et al. Inactivating mutation of the mouse tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (Timp-2) gene alters proMMP-2 activation. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 275, n. 34, p. 26416-26422, Aug. 2000.

CAWSTON, T. E. Metalloproteinase inhibitors and prevention of connective tissue breakdown. *Pharmacology and therapeutics*, Oxford, v. 70, n. 3, p. 163-182, 1996.

CHIRGWIN, J. M. et al. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, Washington, v. 18, n. 24, p. 5294-5299, Nov. 1979.

CURRAN, S.; MURRAY, G. I. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumor invasion and metastasis. *European Journal of Cancer*, Oxford, v. 36, n. 13, p. 1621-1630, Aug. 2000.

FOREMAN, D. M.; SHARPE, P. M.; FERGUSON, M. W. J. Comparative biochemistry of mouse and chick secondary-palate development *in vivo* and *in vitro* with particular emphasis on extracellular matrix molecules and the effects of growth factors on their synthesis. *Archives of Oral Biology*, Oxford, v. 36, n. 6, p. 457-471, June 1991.

DEGITZ, S. J.; FRANCIS, B. M.; FOLEY, J. L. Mesenchymal changes associated with retinoic acid induced cleft palate in CD-1 mice. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology*, New York, v. 18, n. 2, p. 88-99, Apr./June 1998.

DIEWERT, V. M. A morphometric analysis of craniofacial growth and changes in spatial relations during secondary palatal development in human embryos and fetusus. *The American Journal of Anatomy*, Philadelphia, v. 167, n. 4, p. 495-522, Aug. 1983.

DUDAS et al. Palatal fusion – Where do the midline cells go? A review on cleft palate, a major human birth defect. *Acta Histochemica*, Stuttgart, v. 109, n. 1, p. 1-14, Mar. 2007.

DUNCAN, M. E. et al. Human matrix metalloproteinase-9 activation by limited trypsin treatment and generation of monoclonal antibodies specific for the activated form. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, v. 258, n. 1, p. 37-43, Nov. 1998.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, London, v. 2, n. 3, p. 161-174, Mar. 2002.

ELLERBROEK, S. M.; et al. Functional Interplay between Type I Collagen and Cell Surface Matrix Metalloproteinase Activity. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 276, n. 27, p. 24833-24842, July 2001. Disponível em: <<http://www.jbc.org> 24833>. Acesso em: 23 abr. 2007.

FAGAN et al. Effects of transformation on fibronectin gene expression using cloned fibronectin cDNA. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 256, n. 1, p. 520-525, Jan. 1981.

FERGUSON, M. W. J. Palatal shelf elevation in the Wistar rat fetus. *Journal of Anatomy*, London, v. 125, n. 3, p. 555-577, Mar. 1978.

FERGUSON, M. W. J. Palate Development. *Development*, Cambridge, v. 103, ver p. 41-60, 1988.

FERNANDEZ-CATALAN, C. et al. Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix metalloproteinase-2, the soluble progelatinase A receptor. *The EMBO Journal*, Oxford, v. 17, n. 17, p. 5238-5248, Sept. 1998.

FIGUEIREDO, I. M. B. et al. Tratamento cirúrgico de fissuras palatinas completas. *Revista Brasileira em Promoção da Saúde/Brazilian Journal in Health Promotion*, Fortaleza, v. 17, n. 3, p. 156-160, July/Sept. 2004.

FITCHETT, J. E.; HAY, E. D. Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. *Developmental Biology*, New York, v. 131, n. 2, p. 455-474, Feb. 1989.

FITZGERALD, M. J. T. *Embriologia Humana*. Rio de Janeiro: Harper e Row do Brasil, 1980. 197 p.

FUNDYLER, O.; KHANNA, M.; SMOLLER, B. R. Metalloproteinase-2 expression correlates with aggressiveness of cutaneous squamous cell carcinomas. *Modern pathology*, Hagerstown, v. 17, n. 5, p. 496-502, May 2004.

FYFE, D. M.; FERGUNSON, M. W. J.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Immunocytochemical localization of tenascina during the development of scleral papillae and scleral ossicles in the embryonic chick. *Journal of Anatomy*, London, v. 159, p. 117-127, Aug. 1988.

GIANNELLI, G.; ANTONACI, S. Gelatinases and their inhibitors in tumor metastasis: from biological research to medical applications. *Histology and Histopathology*, Murcia, v. 17, n. 1, p. 339-345, Jan. 2002.

GOLDBERG, G. I. et al. Interaction of 92-kDa Type IV Collagenase with the Tissue Inhibitor of Metalloproteinases Prevents Dimerization, Complex Formation with Interstitial Collagenase, and Activation of the Proenzyme with Stromelysin. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 267, n. 7, p. 4583-4591, Mar. 1992.

GREGG, J. M.; AVERY, J. K. Experimental studies of vascular development in normal and cleft palate mouse embryos. *The Cleft Palate Journal*, Baltimore, v. 8, n.2, p. 101-117, Apr. 1971.

GROSS, J.; LAPIÈRE, C. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America*, Washington, v. 48, n. 6, p. 1014-1022, June 1962.

GURLEY, M. J.; WAMSLEY, M. S.; SANDELL, L. J. Alteration in apoptosis and Epithelial-mesenchymal transformation in vitro cleft palate model. *Plastic and Reconstructive Surgery*, Hagerstown, v. 113, n. 3, p. 907-914, Mar. 2004.

HANDSLEY, M. M.; EDWARDS, D. R. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *International Journal of Cancer*, New York, v. 115, n. 6, p. 849-860, July 2005.

HAY, E. D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anatomica*, Basel, v. 154, n. 1, p. 8-20, Jan. 1995.

HEHN, B. M. et al. In vivo and in vitro assessment of mitogen activated protein kinase involvement during quail secondary palate formation. *The Anatomical Record*, New York, v. 252, n. 2, p. 194-204, Oct. 1998.

HIMELSTEIN, B. P. et al. Tumor cell contact mediated transcriptional activation of the fibroblast matrix metalloproteinase-9 gene: involvement of multiple transcription factors including Ets and an alternating purine-pyrimidine repeat. *Clinical and Experimental Metastasis*, London, v. 16, n. 2, p. 169-177, Feb. 1998.

HOLTGRAVE, E. A.; STOLTENBURG-DIDINGER, G. Apoptotic epithelial cell death: a prerequisite for palatal fusion. An in vivo study in rabbits. *Journal of Maxillofacial Surgery*, Edinburgh, v. 30, n. 6, p. 329-336, Dec. 2002.

HRUBEC, T. C. et al. Reduction in diabetes-induced craniofacial defects by maternal immune stimulation. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology*, New Jersey, v. 77, n. 1, p. 1-9, Feb. 2006.

HUDSON, C. D.; SHAPIRO, B. L. A radioautographic study of deoxyribonucleic acid synthesis in embryonic rat palatal shelf epithelium with reference to the concept of programmed cell death. *Archives of Oral Biology*, Oxford, v. 18, n. 1, p. 77-84, Jan. 1973.

HUHTALA, P. et al. Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92- and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 266, n. 25, p. 16485-16490, Sept. 1991.

IMAI, K. et al. Membrane-Type Matrix Metalloproteinase 1 Is a Gelatinolytic Enzyme and Is Secreted in a Complex with Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2. *Cancer Research*, Chicago, v. 56, p. 2707-2710, June 1996.

ITO, Y. et al. Conditional inactivation of Tgfb β 2 in cranial neural crest causes cleft palate and calvaria defects. *Development*, Cambridge, v. 130, n. 21, p. 5269-5280, Nov. 2003.

ITOH, T. et al. Unaltered secretion of beta-amyloid precursor protein in gelatinase A (matrix metalloproteinase 2)-deficient mice. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 36, p. 22389-22392, Sept. 1997.

ITOH, Y. et al. Plasma membrane-bound tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 specifically inhibits matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) activated on the cell surface. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 273, n. 38, p. 24360-24367, Sept. 1998.

IZADNEGAHDAR, M. F.; RATHANASWAMI, P.; SHAH, R. M. Effect of EGF and TGF β 1 on c-myc gene expression and DNA synthesis in embryonic hamster palate mesenchymal cells. *The Anatomical Record*, New York, v. 254, n. 4, p. 453-464, Apr. 1999.

JELINEK, R.; PETERKA, M. The role of the mandible in mouse palatal development revisited. *The Cleft Palate Journal*, Baltimore, v. 14, n. 3, p. 211-221, July 1977.

JEZEWSKI, P. A. et al. Complete sequencing shows a role for *MSX1* in non-syndromic cleft lip and palate. *Journal of Medical Genetics*, London, v. 40, n. 6, p. 399-407, June 2003.

KANG, P.; SVOBODA, K. K. PI-3 kinase activity is required for epithelial-mesenchymal transformation during palate fusion. *Developmental Dynamics*, New York, v. 225, n. 3, p. 316-321, Nov. 2002.

KATO, T. et al. Diminished corneal angiogenesis in gelatinase A-deficient mice. *FEBS Letter*, Amsterdam, v. 508, n. 2, p. 187-190, Nov. 2001.

KAWAMURA, K. et al. In situ gelatinolytic activity correlates with tumor progression and prognosis in patients with bladder cancer. *The Journal of Urology*, Hagerstown, v. 172, n. 4, part 1, p. 1480-1484, Oct. 2004.

KERRIGAN, J. J. et al. Palatogenesis and potential mechanisms for clefting. *Journal of the Royal College of Surgeons of Edinburgh*, Edinburgh, v. 45, n. 6, p. 351-358, Dec. 2000.

KNUDSEN, T. B., BULLEIT, R. F., ZIMMERMAN, E. F. Histochemical localization of glycosaminoglycans during morphogenesis of the secondary palate in mice. *Anatomy and Embryology*, Berlin, v. 173, n. 1, p. 137-142, Jan. 1985.

KONTTINEN, Y. T. et al. Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, London, v. 58, n. 11, p. 691-697, Nov. 1999.

KURJAK, A. et al. Three- and four-dimensional ultrasonography for the structural and functional evaluation of the fetal face. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, New York, v. 196, n. 1, p. 16-28, Jan. 2007.

LAN, Y. et al. Odd-skipped related 2 (Osr2) encodes a key intrinsic regulator of secondary palate growth and morphogenesis. *Development*, Cambridge, v. 131, n. 13, p. 3207-3216, July 2004.

LAN, Y. et al. Osr2, a new mouse gene related to Drosophila odd-skipped, exhibits dynamic expression patterns during craniofacial, limb, and kidney development. *Mechanisms of Development*, Limerick, v. 107, n. 1-2, p. 175-179, Sept. 2001.

LAZZARO, C. Sul meccanismo di chiusura del palato secondario. In: DIEWERT, V.M.; TAIT, B. Palatal process movement in the rat as demonstrated in frozen sections. *Journal of Anatomy*, London, v. 128, n. 3, p. 609-618, Mar. 1979.

LEE, J. M. et al. Modulation of cell proliferation during palatogenesis by the interplay between Tbx3 and Bmp4. *Cell and Tissue Research*, Berlin, v. 327, n. 2, p. 285-292, Feb. 2007.

LEE, S. et al. Immunolocalization of fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in mouse palate development. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 107, n. 7, p. 1776-1786, June 2001.

LEGALLICIER, B. et al. Expression of the type IV collagenase system during mouse kidney development and tubule segmentation. *Journal of the American Society of Nephrology*, Baltimore, v. 12, n. 11, p. 2358-2369, Nov. 2001.

LEKANNE DEPREZ, R. H. et al. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Analytical Biochemistry*, Orlando, v. 307, n. 1, p. 63-69, Aug. 2002.

LIOTTA, L. A.; THORGEIRSSON, U. P.; GARBISA, S. Role of collagenases in tumor cell invasion. *Cancer and Metastasis Reviews*, Dordrecht, v. 1, n. 4, p. 277-288, Dec. 1982.

LOHI, J. et al. Epilysin, a Novel Human Matrix Metalloproteinase (MMP-28) Expressed in Testis and Keratinocytes and in Response to Injury. *The Journal Of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 276, n. 13, p. 10134-10144, Mar. 2001.

LU, H.; JIN, Y.; TIPOE, G. L. Alteration in the expression of bone morphogenetic protein-2,3,4,5 mRNA during pathogenesis of cleft palate in BALB/c mice. *Archives of Oral biology*, Oxford, v. 45, n. 2, p. 133-140, Feb. 2000.

LUKE, D. A. Epithelial proliferation and development of rugae in relation to palatina shelf elevation in the mouse. *Journal of Anatomy*, London, v. 138, n. 2, p. 251-258, Mar. 1984.

MANSELL, J. P. et al. Temporal changes in collagen composition and metabolism during rodent palatogenesis. *Mechanisms of Ageing and Development*, Limerick, v. 119, n. 1-2, p. 49-62, Oct. 2000.

MARCHENKO, G. N. et al. Characterization of matrix metalloproteinase-26, a novel metalloproteinase widely expressed in câncer cells of epithelial origin. *The Biochemical Journal*, London, v. 356, n. 3, p. 705-718, June 2001.

MARCHENKO, G. N.; STRONGIN, A. Y. MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors. *Gene*, Amsterdam, v. 265, n. 1-2, p. 87-93, Mar. 2001.

MARSCHITZ, I. et al. Differential expression of cell-cell adhesion proteins and cyclin D in MEK1-transdifferentiated MDCK cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, Bethesda, v. 279, n. 5, p. C1472-C1482, Nov. 2000. Disponível em: <<http://ajpcell.physiology.org>>. Acesso em: 23 abr. 2007.

MARTINEZ-ALVAREZ, C. et al. Medial edge epithelial cell fate during palatal fusion. *Developmental Biology*, New York, v. 220, n. 2, p. 343-357, Apr. 2000.

MASURE, S. et al. Human hepatoma cells produce an 85 kDa gelatinase regulated by phorbol 12-myristate 13-acetate. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1054, n. 3, 317-325, Sept. 1990.

MERTENS, P. R. et al. Glomerular mesangial cell-specific transactivation of matrix metalloproteinase 2 transcription is mediated by YB-1. *The Journal Biological Chemistry*, Baltimore, v. 272, p. 22905-22912, Sept. 1997.

MIETTINEN, P. J. et al. Epidermal growth factor receptor function is necessary for normal craniofacial development and palate closure. *Nature Genetics*, New York, v. 22, n. 1, p. 69-73, May 1999.

MO, R. et al. Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development*, New York, v. 124, n. 1, p. 113-123, Jan. 1997.

MOGASS, M.; BRINGAS JR, P.; SHULER, C. F. Characterization of desmosomal component expression during palatogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, Vizcaya, v. 44, n. 3, p. 317-322, Apr. 2000.

- MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. *Embriologia clínica*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 609 p.
- MOOSSEY, P. A.; LITTLE, J. Epidemiology of oral clefts: an international perspective. In: WYSZYNSKI, D. F. *Cleft lip and palate from origin to treatment*. New York: Oxford University Press, 2002. p. 127-158.
- MORRIS-WIMAN, J.; BURCH, H.; BASCO, E. 2000. Temporospacial distribution of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases during murine secondary palate morphogenesis. *Anatomy and Embryology*, Berlin, v. 202, n. 2, p. 129-141, Aug. 2000.
- MORRIS-WIMAN, J.; BRINKLEY, L. An extracellular matrix infrastructure provides support for murine secondary palatal shelf remodelling. *The Anatomical Record*, New York, v. 234, n. 4, p. 575-586, Dec. 1992.
- MORRIS-WIMAN, J.; BRINKLEY, L. Rapid changes in the extracellular matrix accompany in vitro palatal shelf remodelling. *Anatomy and Embryology*, Berlin, v. 188, n. 1, p. 75-85, July 1993.
- MOTT, W. J.; TOTO, P. D.; HILGERS, D. C. Labeling Index and Cellular Density in Palatine Shelves of Cleft-Palate Mice. *Jornal of Dental Research*, Chicago, v. 48, n. 2, p. 263-265, Mar./Apr. 1969.
- MURPHY, G. et al. Gelatinase (type IV collagenase) immunolocalization in cells and tissues: use of an antiserum to rabbit bone gelatinase that identifies high and low Mr forms. *Journal of Cell Science*, London, v. 92, n. 3, p. 487-495, Mar. 1989.
- MURPHY, G.; CRABBE, T. Gelatinases A and B. *Methods in Enzymology*, New York, v. 248, n. 2, p. 470-484, 1995.
- MURPHY, G.; REYNOLDS, J. J. Extracellular matrix degradation. In: ROYCE, P. M.; STEINMANN, B. *Connective tissue and its heritable disorders*. New York: Wiley-Liss, 1993. p. 287-316.
- MURRAY, J. C.; SCHUTTE, B. C. Cleft palate: players, pathways, and pursuits. *The Journal of Clinical Investigation*, New Haven, v. 113, n. 12, p. 1676-1678, June 2004.
- NAGASE, H.; WOESSNER, JR, J. F. Matrix Metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 274, n. 31, p. 21491-21494, July 1999.
- NAWSHAD, A.; LaGAMBA, D.; HAY, E. D. Transforming growth factor beta? (TGFbeta?) signalling in palatal growth, apoptosis and epithelial mesenchymal transformation (EMT). *Archives Oral Biology*, Oxford, v. 49, n. 9, p. 675-689, Sept. 2004.
- NEVES, A. C. C.; MONTEIRO, A. M.; GIWA, H. N. Prevalência das fissuras labiopalatinas na Associação de fissurados lábio palatinos de São José dos Campos/SP. *Biociências Revista da Universidade de Taubaté*, Taubaté, v. 8, n.2, p. 27-34, 1-7, II semestre 2002.
- NODA, M. et al. RECK: A novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. *Cancer and Metastasis Reviews*, Dordrecht, v. 22, n. 2-3, p. 167-175, June 2003.

NUTTALL, R. K. Expression analysis of the entire MMP and TIMP gene families during mouse tissue development. *FEBS Letters*, Amsterdam, v. 563, n. 1-3, p. 129-134, Apr. 2004.

O'CONNELL, J. P. et al. Analysis of the role of the COOH-terminal domain in the activation, proteolytic activity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction of gelatinase B. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 269, n. 21, p. 14967-14973, May 1994.

OGATA, Y. et al. Steps involved in activation of the pro-matrix metalloproteinase 9 (progelatinaseB) – tissue inhibitor of metalloproteinase-1 complex by 4-aminophenylmercuric acetate and proteinases. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 270, n. 31, p. 18506-18511, Aug. 1995.

OH, J. et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of Extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell*, Cambridge, v. 107, n. 6, p. 789-800, Dec. 2001.

OHSAKI, Y.; NAGATA, K.; KURISU, K. Localization of types I and III collagen and fibronectin in the developing mouse palatal shelves. *Acta Anatomica*, Basel, v. 153, n. 3, p. 161-167, Mar. 1995.

OKADA, Y. et al. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92 kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts implications for bone resorption. *Laboratory Investigation*, Thomson, v. 72, n. 3, p. 311-322, Mar. 1995.

OKADA, Y. et al. Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/ type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 267, n. 30, p. 21712-21719, Oct. 1992.

PETERS, H. et al. Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes and Development*, New York, v. 12, n. 17, p. 2735-2747, Sept. 1998.

PLANTEFABER, L. C.; HYNES, R. O. Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. *Cell*. Cambridge, v. 56, n. 2, p. 281-290, Jan. 1989.

PRATT, R. M. et al. Acid mucopolysaccharide synthesis in the secondary palate of the developing rat at the time rotation and fusion. *Developmental Biology*, San Diego, v. 32, n. 1, p. 230-237, May 1973.

QIN, H.; SUN, Y.; BENVENISTE, E. N. The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 274, n. 41, p. 29130-29137, Oct. 1999.

REDDY, C. S. et al. Protein kinase C and chemical-induced abnormal palate development. *Human and Experimental Toxicology*, London, v. 24, n. 4, p. 203-214, Apr. 2005.

RIBEIRO, E. M.; MOREIRA, A. S. C. G. Atualização sobre o tratamento multidisciplinar das fissuras labiais e palatinas. *Revista Brasileira em Promoção da Saúde/Brazilian Journal in Health Promotion*, Fortaleza, v. 18, n. 1, p. 31-40, jan./mar. 2005.

RICE, R. et al., Disruption of *Fgf10/Fgfr2b*-coordinated epithelial-mesenchymal interactions causes cleft palate. *The Journal of Clinical Investigation*, New Haven, v. 113, n. 12, p. 1692-1700, June 2004.

RIJLI, F. M. et al. A homeotic transformation is generated in the rostral branchial region of the head by disruption of *Hoxa-2*, which acts a selector gene. *Cell*, Cambridge, v. 75, n. 7, p. 1333-1349, Dec. 1993.

RODENHUIS, S.; SLEBOS, R. J. The ras oncogenes in human lung cancer. *The American review of respiratory disease*, Baltimore, v. 142, n. 6, part 2, p. S27-30, Dec. 1990.

SAHLBERG, C. et al. Timp-1, -2 and -3 show coexpression with gelatinases A and B during mouse tooth morphogenesis. *European Journal of Oral Sciences*, Copenhagen, v. 107, n. 2, p. 121-130, Apr. 1999.

SAKIYAMA, H. et al. Immunologicalization of complement C1s and matrix metalloproteinase 9 (92kDa gelatinase/type IV collagenase) in the primary ossification center of the human femur. *Cell and Tissue Research*, Berlin, v. 277, n. 2, p. 239-245, Aug. 1994.

SANDRINI, F. A. L. et al. Estudo familiar de pacientes com anomalias associadas às fissuras labiopalatinas no serviço de defeitos de face da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. *Revista de Cirurgia Traumatologia Buco-Maxilo-Facial*, Camaragibe, v. 6, n. 2, p. 57-68, abr./jun. 2006.

SANFORD, L. P. et al. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development*, New York, v. 124, n. 13, p. 2659-2670, July 1997.

SANTOS JR., A. R.; WADA, M. L. In: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. *A Célula 2001*. 1. ed. Barueri: Manole Ltda, 2001. cap. 22, p. 260-274.

SASAHARA, R. M.; TASHAHASHI, C.; NODA, M. Involvement of the Sp1 site in ras-mediated downregulation of the RECK metastasis suppressor gene. *Biochememical and Biophysical Research Communications*, New York, v. 264, n. 3, p. 668-675, Sept. 1999.

SASAKI, Y. et al. Deficient Cell Proliferation in Palatal Shelf Mesenchyme of CL/Fr Mouse Embryos. *Journal of Dental Research*, Chicago, v. 83, n. 10, p. 797-801, Oct. 2004.

SATO, H. et al. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature*, Basingstoke, v. 370, n. 6484, p. 61-65, July 1994.

SATO, H.; SEIKI, M. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene*, Basingstoke, v. 8, n. 2, p. 395-405, Feb. 1993.

SATOKA, I.; MAAS, R. *Msx1* deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nature genetics*, New York, v. 6, n. 4, p. 348-355, Apr. 1994.

SCHMITTGEN, T. D. Real-Time quantitative PCR. *Methods*, San Diego, v. 25, n. 4, p. 383-385, Dec. 2001.

- SHAPIRO, B. L.; SWENEY, L. R. Electron microscopic and histochemical examination of oral epithelial-mesenchymal interaction (programmed cell death). *Journal of Dental Research*, Chicago, v. 48, n. 5, p. 652-660, Sept. 1969.
- SILVA, E. B.; FURIA, C. L. B.; DI NINNO, C. Q. M. S. Aleitamento materno em recém nascidos portadores de fissura labiopalatina: dificuldades e métodos utilizados. *Revista CEFAC Atualização Científica em Fonoaudiologia*, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 21-28, jan./mar. 2005.
- SILVA-VALENZUELA, et al. Hibridização *in situ* com sonda não-radioativa para mRNA: princípios e aplicações em patologia. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Rio de Janeiro, v. 42, n. 3, p. 207-213, jun. 2006.
- SINGH, G. D. et al. Changes in the composition of glycosaminoglycans during normal palatogenesis in the rat. *Archives of Oral Biology*, Oxford, v. 39, n. 5, 401-407, May 1994.
- SINGH, G. D. et al. Cleft palate formation in fetal Br Mice with midfacial retrusion: tenascin, fibronectin, laminin, and type IV collagen immunolocalization. *The Cleft Palate Craniofacial Journal*, Pittsburgh, v. 35, n. 1, p. 65-76, Jan. 1998.
- SINGH, G. D. et al. Glycosaminoglycan biosynthesis during 5-fluoro-2-deoxyuridine-induced palatal clefts in the rat. *Archives of Oral Biology*, Oxford, v. 42, n. 5, p. 355-363, May 1997.
- SIRI, A. et al. Different susceptibility of small and large human tenascin-C isoforms to degradation by matrix metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 270, n. 15, p. 8650-8654, 1995.
- SOMERVILLE, R. P. T.; OBLANDER S. A.; APTE, S. S. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biology*, London, v. 4, n. 6, article 216, p. 216.1-216-11, 2003. Disponível em: <<http://genomebiology.com/2003/4/6/216>>. Acesso em: 15 dez. 2006.
- SORSA, T. et al. Activation of Type IV Procollagenases by Human Tumor-associated Trypsin-2. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 272, n. 34, p. 21067-21074, Aug. 1997.
- SOTTRUP-JENSEN, L. Alpha-macroglobulins structure shape and mechanism of proteinase complex formation. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 264, n. 20, p. 11539-11542, July 1989.
- SOTTRUP-JENSEN, L. et al. The alpha-macroglobulin bait sequence diversity and localization of cleavage sites for proteinases in five mammalian alpha-macroglobulins. *Biological Chemistry*, Berlin, v. 264, n. 27, p. 15781-15789, Sept. 1989.
- SOUZA, A. P.; GERLACH, R. F.; LINE, S. R. P. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metals salts. *Dental Materials*, Kidlington, v.16, n. 2, p. 103-108, Mar. 2000.
- SPINA, V. A Proposed Modification for the Classification of Cleft Lip and Cleft Palate. *The Cleft Palate Journal*, Baltimore, v. 10, n. 3, p. 251-2, July 1973.

SPRINGMAN, E. B. et al. Multiple modes of activation fo latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a cys⁷³. Active-site zinc complex in latency and a cysteine switch. Mechanism for activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington, v. 87, n. 1, p. 364-368, Jan. 1990.

STANIER, P.; MOORE, G.E. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of nonsyndromic clefts. *Human Molecular Genetics*, Oxford, v. 13, suppl. 1, p. R73-R81, Jan. 2004.

STEEN, P. E. VAN DEN et al. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, Philadelphia, v. 37, n. 6, p. 375-536, Nov./Dec. 2002.

STERNLICHT, M.D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Palo Alto, v. 17, 463-516, Nov. 2001.

STOCKER, W. et al. The metzincins--Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralyins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Science*, New York, v. 4, n. 5, p. 823-840, May 1995. Disponível em: <<http://www.proteinscience.org/cgi/content/abstract/4/5/823#otherarticles>>. Acesso em: 25 jan. 2007.

STRONGIN, et al. Mechanism of cell surface activation of 72-kda type iv collagenase isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 270, n. 10, p. 5331-5338, Mar. 1995.

SUN, D.; BAUR, S.; HAY, E. D. Epithelial-mesenchymal transformation is the mechanism for fusion of the chicken lip. *Developmental Biology*, New York, v. 228, n. 2, p. 337-349, Dec. 2000.

TAKAHASHI, C. et al. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América*, Washington, v. 95, n. 22, p. 13221-13226, Oct. 1998.

TJÄDERHANE, L. et al. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *Journal of Dental Research*, Chicago, v. 77, n. 8, p. 1622-1629, Aug. 1998.

URTREGER, A. J. et al. Fibronectin is distinctly downregulated in murine mammary adenocarcinoma cells with high metastatic potential. *Oncology Reports*, Athens, v. 16, n. 6, p. 1403-1410, Nov. 2006.

VASCONCELOS, B. C. E. et al. Incidências de malformações congênitas lábio-palatais. *Revista de Cirurgia Traumatologia Buco-Maxilo-Facial*, Camaragibe, v. 2, n. 1, p. 41-46, jul./dez. 2002.

WANG, Z.; JUTTERMANN, R.; SOLOWAY, P. D. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 275, n. 34, p. 26411-26415, Aug. 2000.

WHITTEN, W. K.; BRONSON, F. H.; GREENSTEIN, J. A. Estrus-inducing pheromone of male mice: transport by movement of air. *Science*, Washington, v. 161, n. 3841, p. 584-585, Aug. 1968. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/161/3841/584?ck=nck>>. Acesso em: 5 mar. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Human genetics Programme. *Global strategies to reduce the health-care burden of craniofacial anomalies*. Report of WHO meetings on international collaborative research on craniofacial anomalies: Geneva, Switzerland, 5-8 November 2000; Park City, Utah, U.S.A., 24-26 May 2001. Geneva: World Health Organization, 2002. cap. 2, p. 4-13.

WRAGG, L. E.; SMITH, J. A.; BORDEN, C. S. Myoneural maturation and function of the foetal rat tongue at the time of secondary palate closure. *Archives of Oral Biology*, Oxford, v. 17, n. 4, p. 673-682, Apr. 1972.

WU, D. K.; OH, S. H. Sensory organ generation in the chick inner ear. *The Journal of neuroscience*, v. 16, n. 20, p. 6454-6462, Oct. 1996.

XUAN, D. et al. Identification and characterization of a novel gene, *mcpr1*, and its possible function in the proliferation of embryonic palatal mesenchymal cells. *Journal of Biological chemistry*, Baltimore, v. 281, n. 45, p. 33997-34008, Nov. 2006.

YAMADA, K. M.; OLDEN, K. Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature*, London, v. 275, n. 5641, p. 179-184, Sept. 1978.

ZHANG, Z. et al. Rescue of cleft palate in *Mx1*-deficient mice by transgenic *Bmp4* reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of mammalian palatogenesis. *Development*, Cambridge, v. 129, n. 17, p. 4135-4146, Sept. 2002.

ZHAO, Y. et al. Isolated cleft palate in mice with a target mutation of the LIM homeobox gene *Lhx8*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América*, Washington, v. 96, n. 26, p. 15002-15006, Dec. 1999.

ZHOU, Z. et al. Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América*, Washington, v. 97, n. 8, p. 4052-4057, Apr. 2000.

ZUCKER, S. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell surface receptor, membrane type 1-matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 273, n. 2, p. 1216-1222, Jan. 1998.

CURRICULUM LATTES

Ana Cláudia Cardoso de Oliveira Demarchi

possui graduação em Farmácia pela Universidade do Sagrado Coração (1990) e mestrado em Ciências Biológicas (Farmacologia) pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (2000). Atualmente é coordenadora de laboratório da Universidade do Sagrado Coração. Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em Análise Clínica, atuando principalmente nos seguintes temas: ph, calcium, chumbo, ah plus e calcio.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização em 22/07/2007

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/1077229479466127>

Dados Pessoais

Nome	Ana Cláudia Cardoso de Oliveira Demarchi
Filiação	José Rodrigues de Oliveira e Isabel Cardoso de Oliveira
Nascimento	02/07/1968 - Ituiutaba/MG - Brasil
Carteira de Identidade	345327688 ssp - SP - 20/05/1996
CPF	62295861691
Endereço residencial	Av. Mário Ranieri 4-45 Vila Shangrila - Bauru 171000000, SP - Brasil Telefone: 14 81314550
Endereço profissional	Universidade do Sagrado Coração Rua Irmã Arminda, n.º 10-50 Laboratório de Análises Clínicas J. Planalto - Bauru 17044-160, SP - Brasil Telefone: 14 21077395
Endereço eletrônico	e-mail para contato : ademarchi@usc.br e-mail alternativo : ademarchi@usc.br

Formação Acadêmica/Titulação

2002	Doutorado em Biologia Funcional e Molecular. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil Título: Expressão temporal e espacial de RECK, metaloproteinase 2 e metaloproteinase 9 durante a palatogenese em camundongos Orientador: Prof. Dr. Jose Mauro Granjeiro
1998 - 2000	Mestrado em Ciências Biológicas (Farmacologia). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil Título: Uso do gluconato de cálcio no tratamento de intoxicação por monofluoroacetato de sódio em coelhos. Otimização de uma metodologia para quantificação deste composto., Ano de obtenção: 2000

Orientador: Prof Dr. Igor Vassillief

- | | |
|-------------|--|
| 1991 - 1991 | Especialização em Habilitação Análises Clínicas.
Universidade do Sagrado Coração, USC, Bauru, Brasil |
| 1991 - 1992 | Especialização em Especialização Em Farmacologia.
Universidade do Sagrado Coração, USC, Bauru, Brasil |
| 1992 - 1993 | Especialização em Análises Clínicas.
Universidade do Sagrado Coração, USC, Bauru, Brasil |
| 1992 - 1994 | Especialização em Aprimoramento Em Análises Clínicas.
Instituto Lauro de Souza Lima, ILSL, Brasil
Bolsista do(a): Fundação do Desenvolvimento Administrativo |
| 1988 - 1990 | Graduação em Farmácia.
Universidade do Sagrado Coração, USC, Bauru, Brasil |

Formação complementar

- | | |
|-------------|--|
| 1991 - 1991 | Curso de curta duração em Micobacterias.
Instituto Lauro de Souza Lima, ILSL, Bauru, Brasil |
| 1992 - 1992 | Curso de curta duração em Hansenologia.
Instituto Lauro de Souza Lima, ILSL, Bauru, Brasil |

Atuação profissional

1. Universidade do Sagrado Coração - USC

Vínculo institucional

- | | |
|--------------|--|
| 1994 - 2003 | Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Técnico
Especializado Nível Superior , Carga horária: 40, Regime: Dedicação
Exclusiva |
| 2003 - Atual | Vínculo: Coordenadora de laboratório , Enquadramento funcional:
Coordenadora de laboratório , Carga horária: 40, Regime: Dedicação
Exclusiva |

Atividades

- | | |
|----------------------|---|
| 04/1994 -
08/2003 | Serviço Técnico Especializado, Centro de Ciências Biológicas e da
Saúde, Laboratório de Análises e Pesquisas Clínicas

<i>Especificação:
Responsável Técnico</i> |
| 03/1996 -
12/1996 | Estágio, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de
Análises e Pesquisas Clínicas

<i>Estágio:
Hormônio</i> |
| 03/1996 -
12/1996 | Estágio, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de
Análises e Pesquisas Clínicas

<i>Estágio:
Toxicologia</i> |

06/1999 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Linhas de Pesquisa:
Liberção de ions calcio

08/2003 - Atual Direção e Administração, Laboratório de Análises Clínicas

Cargos Ocupados:
Chefe de Departamento

2. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Vínculo institucional

2002 - Atual Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Pesquisador voluntário, Regime: Parcial

Atividades

02/2002 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Biologia

Linhas de Pesquisa:
Expressão de RECK e metaloproteínas 2 e metaloproteína 9 durante a palatogenese

Linhas de pesquisa

1. Liberação de ions calcio

 Objetivos:

 Expressão de RECK e metaloproteínas 2 e metaloproteína 9 durante a palatogenese
2.

 Objetivos:

Áreas de atuação

1. Análise Clínica
2. Biologia Molecular
3. Análise Toxicológica

Idiomas

Inglês	Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem
Espanhol	Compreende Razoavelmente , Fala Pouco, Escreve Razoavelmente, Lê Razoavelmente

Prêmios e Títulos

Certificado de HONRA AO MÉRITO ao trabalho apresentado:
"Avaliação Espaço-Temporal da Expressão das Metaloproteínas 2 e

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

-  DUARTE, M. A. H., MARTINS, C. S., DEMARCHI, A. C. C. O., GODOY, L. F., KUGA, M. C., YAMASHITA, Jose Carlos
1. Calcium and hydroxide release from different pulp-capping materials. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics. , v.104, p.e66 - e69, 2007.
 - DUARTE, M. A. H., DEMARCHI, A. C. C. O., YAMASHITA, Jose Carlos, KUGA, M. C., FRAGA, S. C.
 2. Arsenic release provide by MTA an Potland cement.. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics. , v.99, p.648 - 650, 2005.
 - DEMARCHI, A. C. C. O., DUARTE, M. A. H., MORAES, I.G. de
 3. Determination of pH and calcium ion release provided by pure and calcium hydroxide-containing AHPlus. International endodontic Journal. , v.37, p.42 - 45, 2004.
 - DUARTE, M. A. H., DEMARCHI, A. C. C. O., MORAES, I.G. de
 4. Determination of pH and calcium ion release provided by pure and calcium hydroxide-containing AHPlus. International Endodontic Journal. , v.37, p.42 - 45, 2004.
 - DEMARCHI, A. C. C. O., DUARTE, M. A. H., YAMASHITA, Jose Carlos, KUGA, M. C., FRAGA, S. C.
 5. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. Oral Surgey Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics. , v.95, p.345 - 347, 2003.
 - ★ DEMARCHI, A. C. C. O., MENEZES, M. L., MERCADANTE, A., VASSILIEFF, I.
 6. Determination of Sodium Monofluoroacetate in Serum by Gas Chromatograph. Chromatographia (Wiesbaden). , v.54, p.1 - 3, 2001.
 - ★ DEMARCHI, A. C. C. O., DUARTE, M. A. H., GIAXA, M. H., KUGA, M. C., FRAGA, S. C., SOUZA, L. C. D.
 7. Evaluation of PH and Calciun Ion Release of Threere Root Canal Sealers. Journal of Endodontics. , v.26, p.389 - 390, 2000.
 - DEMARCHI, A. C. C. O., SOUZA, L. C. D., SANTOS, L. S., MENEZES, M. L.
 8. Avaliação da Exposição ao chumbo em trabalhadores das indústrias de Bauru. Revista Salusvita. , v.18, p.27 - 36, 1999.
 - ★ DEMARCHI, A. C. C. O., MENEZES, M. L.
 9. Off Line Extraction of Phenol From Human Urine Sample With Isoamyl Alcohol and Determination by HPLC. Journal Of Liquid Chromatography Related Technologies. , v.21, p.2355 - 2363, 1998.
 - ★ DEMARCHI, A. C. C. O., MENEZES, M. L., FELIX, G.
 10. On Line Extraction and Determination of Carbofuran in Raw Milk by Direct HPLC Injetion on an ISRP Column . Chromatographia. , v.47, p.81 - 84, 1998.

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (resumo)

PAIVA, K.B.S., ZAMBUZZI, W. F., DEMARCHI, A. C. C. O., MENDONCA, T.

- A., GRANJEIRO, J. M.
 Expression of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 and RECK During Amelogenesis
 In: Comparative Endocrinology of Calcium Regulation Workshop
Bone. Londres: Elsevier, 2005. v.36. p.S103 - S479
- DEMARCHI, A. C. C. O., ZAMBUZZI, W. F., PAIVA, K.B.S., NUNES, F. D., VALENZUELA, M. G. S., SOGAYAR, M. C., GRANJEIRO, J. M.
 Expression of MMP -2, -9 and RECK During Palatogenesis In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005, Aguas de Lindoia.
XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. , 2005.
- MENDONCA, T. A., ZAMBUZZI, W. F., PAIVA, K.B.S., DEMARCHI, A. C. C. O., CESTARI, T. M., TAGA, R., LAURIS, J.R.P., GRANJEIRO, J. M.
 Metalloproteinase 2 Expression During Cellular Response to the Xenograft of Cancellous Bovine Bone In: XXXIV Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2005, Aguas de Lindoia - MG/Brasil.
 XXXIV Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Biologia Molecular e Bioquímica, 2005, Águas de Lindoia.
XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Biologia Molecular e Bioquímica. , 2005.
- DEMARCHI, A. C. C. O., ZAMBUZZI, W. F., PAIVA, K.B.S., MENDONCA, T. A., SOGAYAR, M. C., GRANJEIRO, J. M.
 Avaliação Espaço-Temporal da Expressão das Metaloproteínas-2 e -9 Durante a Palatogênese In: XIX Reunião Anual da FeSBE, 2004, Aguas de Lindoia.
XIX Reunião Anual da FeSBE. , 2004.
- Zanelatto, G.N., ZAMBUZZI, W. F., PAIVA, K.B.S., DEMARCHI, A. C. C. O., MENDONCA, T. A., OLIVEIRA, R. C., GRANJEIRO, J. M.
 Expressão da Gelatinase B e CD68 na Resposta Tecidual ao Implante de Osso Inorgânico Bovino In: 17ª Jornada Odontológica de Bauru, 2004, Bauru
17ª Jornada Odontológica de Bauru, 2004, Bauru. , 2004.
- PAIVA, K.B.S., ZAMBUZZI, W. F., Zanelatto, G.N., DEMARCHI, A. C. C. O., MENDONCA, T. A., GRANJEIRO, J. M.
 Expression of Metalloproteinases-2 and -9 During Amelogenesis In: III International Symposium on Extracellular Matrix and VIII Simpósio Brasileiro sobre Matriz Extracelular, 2004, Angra dos Reis.
III International Symposium on Extracellular Matrix and VIII Simpósio Brasileiro sobre Matriz Extracelular. , 2004.
- MENEZES, R., ZAMBUZZI, W. F., PAIVA, K.B.S., DEMARCHI, A. C. C. O., MENDONCA, T. A., Zanelatto, G.N., SOGAYAR, M. C., GRANJEIRO, J. M.
 MMP-9 Expression in Response to Fully-Processed Inorganic Medullar Bovine Bone In: IADR, 2004, Honolulu/Hawaii.
Journal of Dental Research. , 2004. v.83. p.3569 - 3569
- PAIVA, K.B.S., ZAMBUZZI, W. F., MENDONCA, T. A., DEMARCHI, A. C. C. O., Zanelatto, G.N., GRANJEIRO, J. M.
 Temporal and Spatial Analysis of Gelatinases Distribution During Endochondral Ossification in Mice In: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2004, Caxambu.
XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. , 2004.
- ZAMBUZZI, W. F., OLIVEIRA, L.C.S., PAIVA, K.B.S., CESTARI, T. M., DEMARCHI, A. C. C. O., MENDONCA, T. A., SOGAYAR, M. C., GRANJEIRO, J. M.
 Expression of Gelatinases a (MMP-2, 72kDa) and b (MMP-9, 92kDa) During the

Alveolar Bone Repair In: 20. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2003, Aguas de Lindoia.

20. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica. , 2003. v.17. p.80 - 80

- DEMARCHI, A. C. C. O., ZAMBUZZI, W. F., GRANJEIRO, J. M.
10. **ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA ENZIMA iNOS NA MORFOGÊNESE DA LÍNGUA DE RATOS** In: SBPqO, 2002, Aguas de Lindoia.
Pesquisa Odontológica Brasileira. , 2002. p.96 - 96
- BRANDÃO, C. G., DEMARCHI, A. C. C. O., DUARTE, M. A. H.
11. **Calcium Release and pH from Calcium-containing Root Canal Sealers** In: 78th General Session of the International Association for Dental Research, 2000, Washington.
Journal of Dental Research Special Issue. Washington, DC, USA.: , 2000. v.79. p.549 -
- BRANDÃO, C. G., DEMARCHI, A. C. C. O., DUARTE, M. A. H.
12. **Calcium release and pH of AH Plus pure and modified** In: 78th General Session of the International Association for Dental Research, 2000, Washington, DC, USA..
Journal of Dental Research. Washington,DC,USA.: , 2000. v.79. p.549 - 549
- GIAXA, M. H., DUARTE, M. A. H., KUGA, M. C., DEMARCHI, A. C. C. O.
13. **Avaliação do pH e liberação de íons cálcio produzidos pelos cimentos Sealapex, Sealer 26 e Apexit em função do tempo** In: 26 Jornada Odontológica e 11 Jornada acadêmica da Faculdade de Odontologia de Lins, 1997, Lins.
Anais da 26 Jornada Odontológica e 11 Jornada acadêmica da Faculdade de Odontologia de Lins. , 1997. p.36 - 36

Demais produções bibliográficas

- DEMARCHI, A. C. C. O., MENEZES, M. L.
1. **Off Line Extration Of Phenol From Human Urine Sample With Isoamyl Alcohol anbd Determinatio by HPLC**, 1997. (Comunicação,Apresentação de Trabalho)
- DEMARCHI, A. C. C. O., MENEZES, M. L., VASSILIEFF, I., MERCADANTE, A.
2. **Improvement of one methodology for quantification of sodium monofluoroacetate in serum**, 2000. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
- DEMARCHI, A. C. C. O., BRANDÃO, C. G., DUARTE, M. A. H.
3. **Calcium Release and pH from Calcium-containing Root Canal Sealers**, 2000. (Outra,Apresentação de Trabalho)
- DEMARCHI, A. C. C. O., DUARTE, M. A. H., BRANDÃO, C. G.
4. **Calcium release and pH of AH Plus pure and modified** , 2000. (Outra,Apresentação de Trabalho)
- DEMARCHI, A. C. C. O., SOUZA, L. C. D., MENEZES, M. L., SANTOS, L. S.
5. **Avaliação da Exposição ao Chumbo em Trabalhadores das Indústrias de Bauru**, 1997. (Outra,Apresentação de Trabalho)
- DEMARCHI, A. C. C. O., MENEZES, M. L., FELIX, G.
6. **Extration and Determination on Line of Carbofuran Pesticidies From Raw Milk by Directic Injection Into HPLC On ISRP Column**, 1997. (Outra,Apresentação de Trabalho)

Produção Técnica

Demais produções técnicas

- DEMARCHI, A. C. C. O., DUARTE, M. A. H.
1. **Analise do pH e liberação de íons de Cálcio do Hidroxido de Cálcio associado a**

diferentes veículos., 1999. (Outra produção técnica)

DEMARCHI, A. C. C. O., KUGA, M. C.

2. **Avaliação do pH e Liberação de Ions de Cálcio Produzidos pelos Cimentos Sealapex, Sealer 26 e Apexit e Função do Tempo.**, 1999. (Outra produção técnica)

DEMARCHI, A. C. C. O.

3. **Intoxicação por Monofluoroacetato em coelhos: Otimização de um Método para Quantificação deste composto no soro e Avaliação da Eficácia ou não do uso do Bicarbonato de Sódio sobre a Metabolização do Monofluoroacetato**, 1999. (Outra produção técnica)

DEMARCHI, A. C. C. O.

4. **Práticas Toxicológicas em Cromatografia Gasosa para Identificação de Inseticidas e Herbicidas**, 1999. (Outra produção técnica)

DEMARCHI, A. C. C. O.

5. **Avaliação da Liberação de íons cálcio e hidroxila quando da associação de hidróxido de cálcio com diferentes veículos de demora intracanal**, 1998. (Outra produção técnica)

DEMARCHI, A. C. C. O.

6. **Intoxicação de Operários por Chumbo e Análise por Espectrofotometria de Absorção Atômica em Amostras de Sangue**, 1996. (Outra produção técnica)

DEMARCHI, A. C. C. O.

7. **Interpretação de Exames Laboratoriais**, 1994. (Outra produção técnica)

Orientações e Supervisões

Orientações e Supervisões concluídas



(Orientações de teses e dissertações coincidentes com informações na base CAPES, a partir do ano de 1996)

Monografias de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização

1. Milene Baio Dota. **Hipocalcemia e suas complicações**. 2001. Monografia (Especialização em Análises Clínicas) - Universidade do Sagrado Coração
2. Alcione Marin. **A Hiperlipemia como fator de risco na doença aterosclerótica**. 2001. Monografia (Especialização em Análises Clínicas) - Universidade do Sagrado Coração

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicado em periódico	10
Comunicações em anais de congressos e periódicos (proceedings e suplementos)	13
Apresentações de Trabalhos (Comunicação)	1
Apresentações de Trabalhos (Congresso)	1
Apresentações de Trabalhos (Outra)	4

Produção técnica

Outra produção técnica	7
------------------------	---

Orientações

Orientação concluída (monografia de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização)	1
---	---

Orientação concluída (monografia de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização)	1
---	---



Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Of.CEEPA-FOB/USP Nº 001/2008

Bauru, 23 de janeiro de 2008.

Senhor Professor,

Em atenção à solicitação de Vossa Senhoria aprovamos a inclusão da pesquisadora Dr^a Ana Cláudia Demarchi no desenvolvimento do projeto de pesquisa **"Expressão temporal e espacial de metaloproteinase-2, metaloproteinase-9 e reck durante a palatogênese em camundongos"**, (Proc.04/2004), de autoria da CD. Thaís Accorsi Mendonça, sob sua orientação.

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

Docente do Departamento de Biologia Celular e Molecular-Universidade Federal Fluminense