UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

KATIÚCIA BATISTA DA SILVA PAIVA

DESENVOLVIMENTO ÓSSEO E DENTÁRIO: ASPECTOS BIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES DA REMODELAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR REGULADA PELAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ E SEUS INIBIDORES

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Katiúcia Batista da Silva Paiva e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

P166d

Paiva, Katiúcia Batista da Silva
Desenvolvimento ósseo e dentário: aspectos biológicos, bioquímicos e moleculares da remodelação da matriz extracelular regulada pelas metaloproteinases de matriz e seus inibidores / Katiúcia Batista da Silva Paiva. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

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

1. Metaloproteinases de matriz. 2. Inibidores tissulares de metaloproteinases. 3. RECK. 4. Tecidos mineralizados. I. Granjeiro, José Mauro. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Dental and bone development: biology, biochemistry, and molecular aspects of the matrix metalloproteinases and their inhibitors during extracellular matrix remodeling.
Palavras-chave em inglês: Matrix metalloproteinases; Tissue inhibitor of metalloproteinases; RECK; Mineralized tissues.
Área de concentração: Bioquímica.
Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular.
Banca examinadora: José Mauro Granjeiro, Hiroshi Aoyama, Sérgio Roberto Peres Line, Fábio Daumas Nunes, Mari Cleide Sogayar.
Data da defesa: 27/02/2007.
Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 27 de fevereiro de 2007

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro (Orientador) _____
Assinatura

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama _____
Assinatura

Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes _____
Assinatura

Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar _____
Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line _____
Assinatura

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira _____
Assinatura

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet _____
Assinatura

Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira _____
Assinatura

“[...] talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito [...] Não somos o que deveríamos ser, mas somos o que iremos ser. E graças a Deus, não somos o que éramos”.

Martim Luther King

Dedicatória

À Família Paiva

Aos meus queridos pais,

Vanda e Paiva

obrigada por terem me colocado no caminho do bem, me ensinado a ser honesta e digna em todos os momentos

Aos meus queridos irmãos,

Bruno e Renan

por serem meninos de boa índole, inteligentes, lindos e que ainda crescerão muito nessa longa jornada

As minhas avós

Maria e Benedita (in memorian)

por serem, incondicionalmente, as melhores avós do mundo em todos os momentos

À Família Fraguglia

A minha queridas e amadas primas, que na verdade são irmãs,

Vanessa, Caroline e Natália

E as meus tios e primo

Thelma, Tuca e Thales

muito obrigada por todo o apoio e carinho durantes todos estes anos

À família Rodrigues

obrigada por me acolherem tão bem em todos os momentos

Ao Leonardo

por todo o apoio, dedicação e amor

Agradecimentos

Ao ***Professor Dr. José Mauro Granjeiro,***

Meus sinceros agradecimentos, não apenas pela orientação, mas pelo incentivo e confiança demonstrados não somente neste trabalho, mas em muitos outros que realizamos juntos. Ao amigo Mauro, muito obrigada por ser esta pessoa excepcionalmente humana, compreensiva e divertida que sempre está disposta a ajudar seus amigos incondicionalmente.

Muito Obrigada!!!!!!

Ao ***Professor Dr. Henry Magloire,***

Por ter desempenhado um papel fundamental para a realização de um sonho... que me proporcionou conhecer um novo mundo do outro lado do oceano... Obrigada por toda a ajuda imprescindível para a sobrevivência no velho mundo.

Merci beaucoup pour tout mon ami!!!!!

Ao ***Professor Dr. Hiroshi Aoyama,***

Por todo apoio e amizade de um verdadeiro mestre da bondade, gentileza e simplicidade... Um ser humano único!!!

À ***Professora Dra. Mari Cleide Sogayar,***

Obrigada por sempre ter deixado as portas de seu laboratório abertas para mim e a muitos outros colegas e amigos, pela co-orientação e colaboração fundamental para o desenvolvimento deste e muitos outros trabalhos.

A todos os meus queridos amigos de turma da Biologia que sempre estiveram comigo desde o primeiro dia em que nos conhecemos e continuaremos assim até o último dia de nossas vidas...

À “Galera da Imuno” (Thais Accorsi-Mendonça, Willian Fernando Zambuzzi e Ana Claudia Cardoso de Oliveira Demarchi) por terem sido colegas de trabalho tão inteligentes e competentes, que tanto me auxiliaram a concluir este e outros trabalhos muito importantes. Aos amigos Thaizinha, Willy e Ana por serem tão especiais e por me ajudarem a amenizar as dificuldades nos momentos difíceis e por trazerem um colorido diferente a minha vida.

Á todos os amigos e colegas do Laboratório de Bioquímica, FOB/USP, Thais, Willian, Ana Claudia, Ariadne, Renato, Everdan, Rodrigo Cardoso, Juliano, Flávia Levy, Vanessa, Irene, Élide, Gustavo (Basílio), Flávia Iano, Vandinha, Esther, Eduardo, Tatiana Salles, Flávio Amado, Renato (Insulina), Pitty, José Vitor, Juliane, Maria Heloísa, Tatiana Furlani, Rodrigo e Wilson e a todos os outros que estiveram por lá, mesmo que temporariamente, por terem criado um ambiente mágico de alegria e diversão associado à competência e responsabilidade.

A Profa. Dra. Marília A. R. Buzalaf e aos funcionários do Laboratório de Bioquímica, FOB/USP, Thelma, Gilmar, Flávio, Eva e Ovídio pelos ensinamentos diários durante o período que trabalhamos juntos.

À melhor secretária e “boleira” da FOB/USP, Vera Ruffino, por não deixar que a “burrocracia” atrapalhasse ainda mais a burocracia.

A todos do Laboratório de Histologia, FOB/USP, principalmente ao Prof. Dr. Rumio Taga, Tânia Mari Cestari e Daniele Ceolin, por sempre nos ajudarem tecnicamente e intelectualmente.

Aos professores, alunos e funcionários do Laboratório de Patologia, FOB/UP, em especial a Profa. Dra. Vanessa Soares Lara que sempre esteve do nosso lado, principalmente, em dias difíceis.

Aos professores e funcionários do Laboratório de Anatomia, FOB/USP, por toda a ajuda, principalmente, ao Prof. Dr. Jesus Andreo.

Aos funcionários do Biotério da FOB/USP por sempre terem facilitado o fornecimento, manutenção e manuseio dos animais.

A todos os professores, funcionários e alunos do Laboratório de Enzimologia, IB/UNICAMP, Prof. Dr. Hiroshi Aoyama, Érika, Luciana Leite (Luli), Márcio Miranda, Roberta, Camila e Marilena por sempre me receberem maravilhosamente bem na casa de vocês e por serem a companhia ideal de todos os SBBqs.

Aos professores, alunos e funcionários do Laboratório de Transdução de Sinais, Profa. Dra. Carmen Lúcia Verríssima, Profa. Dra. Giselle Zenker Justo, Profa. Dra. Silvia Mika Shishido, Dra. Claudia de Lourdes Soraggi, Willian, Denise, Ana Carolina, Rodrigo, Dayse, Antônio e Paula por terem me proporcionado bons momentos e uma grande ajuda no final da tese.

Às adoradas secretárias da SCPG-BMF e do Departamento de Bioquímica (IB/UNICAMP) Andréia Vigilato e Marina Cruz que sempre facilitarem a minha vida acadêmica e por serem pessoas maravilhosas.

Aos professores, alunos e funcionários do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, IQ/USP, Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar, Sheila, Antero, Wagner, Christian, Márcio, Fernanda Festa, Leonardo, Fernando, Karin, Zizi, Andréia, Gabriela (Pipoca), Theri, Dna. Helena, entre outros, por estarem sempre prontos a ajudar e por tudo que me ensinaram. Um agradecimento especial a Rita por ter cuidado muito bem dos meus "DNAs".

A Profa. Dra. Christina Maeda Takiya (UFRJ) por ter aberto a primeira porta para o meu estágio de doutorado na França.

A todos os professores, pesquisadores, alunos e funcionários do *Laboratoire du Développement et Régénération des Tissues Dentaire, Faculté d'Odontologie de Lyon/França,* Prof. Dr. Henry Magloire, Dra. Françoise Bleicher, Annick Romeas, Christelle Langneau, Florence Carrouel, Dra. Marie-Jeanne Staquet, Marie-Lise Couble, Dr. Jean-Christophe Farges, Dr. Jean-Christophe Maurin, Dominique Seux, Dra. Marion Lucchini, Nicolas Lehmann, Dra. Stéphanie Durand e Dra. Béatrice Simon-Thivichon por terem tornado os meus dias mais alegres, "menos frios" e enriquecedores durante toda a minha estada na França.

A Simone Peyrol por ter sido a minha "mãe francesa" e, sem ela, eu não teria conseguido me desvencilhar da burocracia e toda a angústia inicial do desconhecido.

Aos funcionários e pesquisadores do *Centre Commun d'Imagerie de Laennec (CeCil), Faculté de Médicine, Lyon/França,* Dra. Simone Peyrol, Christel Cassin, Chantal Thevenon, Annabelle Bouchardon e Christophe Vanbelle por todo o auxílio técnico e muitas risadas durante as intermináveis tardes ao criostato.

À Fapesp por nos ter auxiliado através da inserção deste trabalho no Projeto Temático (proc. n. 01/10707-7) co-ordenado pela Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar.

A CAPES por ter financiado todo o meu doutorado aqui no Brasil e no exterior (BEX 2415/04-6).

As agências de Fomento francesas *Institut Nacional de la Santé et de la Recherche Médicale* (INSERM) e *Institute Fédératif de Recherche* (IFR).

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	xv
Lista de Figuras	xxi
Lista de Quadros	xxv
Resumo	xxvii
Abstract	xxix
1 – Introdução	**01**
1.1 – Matriz Extracelular	02
1.2 – Proteinases	03
1.2.1 – Metaloproteinases de Matriz (MMPs)	04
1.2.1.1 – Gelatinases	13
MMP-2	15
MMP-9	19
1.3 – Inibidores das Metaloproteinases de Matriz	20
1.3.1 – Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs)	21
TIMP-1	24
TIMP-2	25
1.3.2 – RECK (*Reversion-Inducing-Cysteine- Rich Protein with Kazal Motifs*)	26
1.4 – Desenvolvimento Crânio-Facial	29
1.4.1 – Odontogênese	30
1.4.1.1 – Formação do Esmalte (Amelogênese)	32
1.4.1.2 – Formação da Dentina (Dentinogênese)	39

1.4.2 – Osteogênese 39

1.4.2.1 – Ossificação Intramembranosa 40

Mandíbula 41

1.5 – Desenvolvimento dos Ossos Longos 42

1.5.1 – Ossificação Endocondral 42

2 – Objetivos 58

3 – Materiais e Métodos 60

3.1 – Animais e Coleta dos Tecidos 60

3.1.1 – Tecidos Embrionários 60

3.1.2 – Tecidos Adultos 60

3.2 – Processamento dos Tecidos 61

3.2.1 – Tecidos Parafinados 61

3.2.2 – Tecidos Congelados 62

3.3 – Histoquímica 62

3.4 – Imunohistoquímica 62

3.4.1 – Padronização dos anticorpos 62

MMPs 63

RECK 63

TIMPs 63

3.4.2 – Imuno-marcações para as MMPs e RECK (Tecidos Embrionários) 65

3.4.3 - Imuno-marcações para as MMPs e RECK (Tecidos Adultos) 66

3.4.4 - Imuno-marcações para as TIMPs (Tecidos Embrionários) 66

3.4.5 - Imuno-marcações para as TIMPs (Tecidos Adultos) 67

3.5 – Hibridização *in situ* 67

3.5.1 – Desenho das Sondas 67

3.5.2 – Geração dos *Templates* 68

3.5.3 – Teste das Sondas 69

3.5.4 – Quantificação das Sondas 70

3.5.5 – Marcação das Sondas com Isótopo Radioativo 71

3.5.6 – Verificação da Incorporação do Isótopo Radioativo 71

3.5.7 – Precipitação das Sondas Radioativas 72

3.5.8 – Teste das Sondas Controle – Colágeno tipo I (αI) e Osteocalcina 73

3.5.9 – Preparação das Lâminas RNAse *Free* 73

3.5.10 – Pré-Tratamento das Lâminas 73

3.5.11 - Pré-Hibridização 76

3.5.12 – Hibridização 76

3.5.13 - Lavagens e Desibridização 77

3.5.14 – Auto-radiografia 77

3.5.15 – Revelação 78

3.5.16 – Contra-Coloração 78

4 – Resultados e Discussão 80

4.1 – Formação do Incisivo do Rato Adulto 80

Ameloblastos 83

Células Imunocompetentes Não-Epiteliais 83

Odontoblastos 86

4.2 – Desenvolvimento Crânio-Facial 91

4.2.1 – Odontogênese 91

4.2.2 – Ossificação Intramembranosa 100

4.3 – Desenvolvimento dos Ossos Longos 105

5 – Conclusões 122

6 – Considerações Finais 123

7 – Perspectivas Futuras 124

8 – Referências Bibliográficas 125

9 – Anexos 170

LISTA DE ABREVIATURAS

A: ameloblasto

AC: alça cervical

ADAM: desintegrina e metaloproteinase

ADAM-TS: ADAMs com repetições trombospondina

AM: ameloblastos de maturação

AO: osso alveolar

AS: ameloblastos secretores

AP-1:

AT: ameloblastos de transição

BD: broto dentário

BSA: albumina de soro bovino (*bovine serum albumin*)

C: condrócitos

CA: cartilagem articular

Cb: cementoblasto

Cc: cementócito

CCC: condrócitos da cartilagem condilar

CCN: células da crista neural

Cd: condroclasto

CD44: receptor de hialurona

cDNA: DNA complementar

CE: células endoteliais

CH: condrócitos hipertróficos

CM: cartilagem de Meckel

Cm: condrócitos maduros

CO: colar ósseo

COMP: proteína de matriz oligomérica da cartilage (*cartilage oligomeric matrix protein*)

Cp: camada papilar

CP: condrócitos em proliferação

CR: condrócitos em repouso

CT-PCPE: *carboxy-terminal fragment of procollagen carboxy-terminal proteinase enhancer*

C1q: componente complemento (component complement)

D: dentina

dATP: 2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato

dCTP: 2'-desoxicitodina 5'-trifosfato

dGTP: 2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato

dNTP: 2'-desoxinucleosídeo 5'-trifosfatos

dTTP: 2'-desoxitimidina 5'-trifosfato

DM: dentina do manto

DTT: *ditiotreitol*

E: esmalte

eD: endósteo

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético (*ethylene diamine tetracetic acid*)

EEOE: epitélio externo do órgão do esmalte

EGF: *epidermal growth factor*

EI: estrato intermediário

EIOE: epitélio interno do órgão do esmalte

EMMPRIN: *extracellular matrix metalloproteinase inducer*

EO: epitélio oral

F: fibroblasto

FASL: ligante de Fas

FCG: fluído crevicular gengival

FD: folículo dentário

FGF: *fibroblast growth factor*

GD: germe dentário

GPI: glicosilfosfatidilinositol

ICAM: molécula de adesão intercelular 1 (*intercellular adhesion molecule 1*)

IE: invaginação epitelial

IGFBP-3: *insulin-like growth factor binding protein-3*

IL: interleucina

JAD: junção amelo-dentinária

JOC: junção osteocondral

KGF: *keratinocyte growth factor*

LD: lâmina dentária

LDL-RP: *low-density lipoprotein receptor protein*

LS: líquido sinovial

LTBP1: proteína ligadora do TGF-β latente 1 (*latent TGF-β-binding protein-1*)

MB: membrana basal

MCP-3: *monocyte chemoattractant protein-3*

MD: molde cartilaginoso

MEC: matriz extracelular

MMP: metaloproteinase de matriz

MO: medula óssea

MP: metaloproteinases de mamíferos

MT-MMP: metaloproteinase de matriz tipo de membrana

mRNA: RNA mensageiro

MUC: mucina transmembrana

NEP: nó-do-esmalte primário

NES: nó-do-esmalte secundário

NGF: *nerve growth factor*

OAr: osteoartrite

Ob: osteoblasto

oc: osteócitos

Oc: osteoclasto

Od: odontoblasto

od: odontoclasto

OE: órgão do esmalte

OO: osso osteofítico

P.M.S.F.: fluoreto de fenil metil sulfonila (*phenylmethylsulphonylfluoride)*

pA: pré-ameloblasto

PAI-2: inibidor do ativador de plasminogênio 2 (*plasminogen activator ainhibitor-2*)

p-APMA: p-aminophenylmercuric acetate

pb: par de bases

PBS: tampão fosfato salino

pC: pericôndrio

PC: placa de crescimento

PCR: *polymerase chain reaction*

PD: papila dentária

PDGF: *platelet-derived growth factor*

pD: pré-dentina

pO: periósteo

pOc: pré-osteoclasto

pOd: pré-odontoblasto

PTHrP: *parathyroid hormone related peptide*

PZP: proteína da zona de pregnância (*pregnancy zone protein*)

RANKL: ligante de RANK

RE: retículo estrelado

RECK: *reversion-inducing cysteine-rich with Kazal motifs*

RGD: proteínas que contêm a seqüência Arg-Gly-Asp (RGD)

rpm: rotações por minuto

RT-PCR: *reversion transcription polymerase chain reaction*

SDF: fator derivado de célula estromal 1 *(stromal cell-derived factor-1)*.

SDS: docedil sulfato de sódio

TBE: *tris-borate-EDTA buffer*

TBS: *tris-buffered saline*

TCG: tumor de células gigantes

TFPI-2: *tissue factor pathway inhibitor 2*

TGF-β: *tumor growth factor-beta*

TIMP: inibidor tecidual de metaloproteinases de matriz

TNF-α: *tumor necrosis factor-alpha*

TRAP: tirosina fosfatase resistente a fosfatase ácida (*tartrate resistant acid phosphatase*)

Tris: Tris (hidroxi metil aminometano)

tRNA: RNA transportador

uPA: *urokinase type plasminogen activator*

VEGF: vascular endothelial growth factor

α1-PI: inibidor de proteinase α1 (*α1-proteinase inhibitor*)

α2-M: α2-macroblogulina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Cascata de ativação das MMPs. 08

Figura 1.2: Domínios das MMPs. 11

Figura 1.3: Diversas vias de regulação intra e extracelular das MMPs. 12

Figura 1.4: Representação esquemática da ativação da pró-MMP-2 no perímetro pericelular. 17

Figura 1.5: Localização das TIMPs no meio peri e extracelular. 23

Figura 1.6: Representação esquemática da estrutura primária da glicoproteína RECK. 27

Figura 1.7: Regulação das MMPs pela glicoproteína RECK. 28

Figura 1.8: Regulação das MMPs e RECK pela via de Ras. 29

Figura 1.9: Representação esquemática das etapas da odontogênese durante o desenvolvimento embrionário (Adaptado de Thesleff, 2003). 32

Figura 1.10: Representação esquemática da anatomia do incisivo de rato de crescimento contínuo. 39

Figura 1.11: Representação esquemática das fases da amelogênese em incisivos de rato adulto e as células presentes em cada fase. 40

Figura 1.12: Representação anatômica das regiões da cartilagem de Meckel que sofrerão diferentes formas de ossificação. 42

Figura 1.13: Representação esquemática da formação óssea endocondral durante o desenvolvimento embrionário. 48

Figura 3.1: Coleta dos embriões de camundongo. 61

Figura 3.2: Câncer de mama humano. 64

Figura 3.3: Embriões de camundongo (E16). 64

Figura 3.4: Órgãos de camundongo adulto. 64

Figura 3.5: Representação esquemática da técnica de purificação em gel (eletro-eluição) dos oligonucleotídeos. 70

Figura 3.6: Gel de agarose a 2% com o fragmento de cDNA amplificado de (1) RECK (323 pb) por RT-PCR e (2) o fragmento digerido enzimaticamente (265 pb). 69

Figura 3.7: Gel de agarose a 2% com (1) a sonda purificada de RECK quantificada (323 pb). 71

Figura 3.8: Representação esquemática da verificação da radioatividade total e incorporada pelas sondas para HIS. 74

Figura 3.9: Representação esquemática da precipitação das sondas radioativas para HIS. 74

Figura 3.10: Hibridização *in situ* para o colágeno tipo I (α1). 75

Figura 3.11: Hibridização *in situ* para a osteocalcina. 75

Figura 4.1: Imunolocalização das MMPs e RECK durante a amelogênese em incisivos de rato. 88

Figura 4.2: Imunolocalização da TIMP-1 e TIMP-2 durante a amelogênese em incisivos de rato. 89

Figura 4.3: Imunolocalização da MMP-9 e RECK em odontoblastos durante a amelogênese em incisivos de rato. 89

Figura 4.4: Fotomicrografias da fase pré-secretora e secretora da amelogênese em incisivos de rato. 89

Figura 4.5: Imunolocalização de RECK durante a odontogênese. 95

Figura 4.6: Hibridização *in situ* para RECK nos germes dentários na fase de capuz 96

(molar) (E15).

Figura 4.7: Hibridização *in situ* para RECK nos germes dentários na fase de campânula inicial (molar) (E18). 97

Figura 4.8: Hibridização *in situ* para RECK nos germes dentários na fase de campânula final (E20). 98

Figura 4.9: Imunolocalização das MMPs, TIMPs e RECK na cartilagem de Meckel. 102

Figura 4.10: Hibridização *in situ* para RECK na cartilagem de Meckel (E16). 103

Figura 4.11: Imunolocalização das MMPs, TIMPs e RECK no desenvolvimento da maxila. 104

Figura 4.12: Imunolocalização das MMPs, TIMPs e RECK na fase de diferenciação condrocítica da ossificação endocondral (E13). 110

Figura 4.13: Imunolocalização das MMPs, TIMPs e RECK na fase de molde cartilaginoso da ossificação endocondral (E14). 111

Figura 4.14: Imunolocalização das MMPs, TIMPs e RECK na fase de invasão vascular e celular inicial da ossificação endocondral (E15). 112

Figura 4.15: Imunolocalização das MMPs, TIMPs e RECK na fase de invasão vascular e celular final da ossificação endocondral (E15). 113

Figura 4.16: Imunolocalização das MMPs, TIMPs e RECK aos 16 dias do desenvolvimento embrionário (E16). 114

Figura 4.17: Imunolocalização das MMPs, TIMPs e RECK de 17 aos 20 dias do desenvolvimento embrionário (E17). 115

Figura 4.18: Imunolocalização das MMPs, TIMPs e RECK no recém nascido de 1 dia de vida (PN1). 116

Figura 4.19: Hibridização *in situ* para RECK em ossos longos (E16). 117

Figura 4.20: Hibridização *in situ* para RECK em ossos longos (E18). 118

Figura 4.21: Hibridização *in situ* para RECK em ossos longos (E18). 119

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1: Classificação das MMPs e seus respectivos substratos conhecidos. 06

Quadro 1.2: Substratos das gelatinases. 14

Quadro 1.3: Classificação, propriedades bioquímicas e atuação biológica das TIMPs. 22

Quadro 1.4: Fenótipos encontrados em animais normais, *knockout*, mutantes ou em modelos de doenças genéticas humanas para as MMPs durante a odontogênese. 33

Quadro 1.5: Fenótipos encontrados em animais normais, *knockout*, mutantes ou em modelos de doenças genéticas humanas para as TIMPs durante a odontogênese. 37

Quadro 1.6: Fenótipos ósseos encontrados em animais *knockout*, mutantes ou em modelos de doenças genéticas humanas de MMPs durante a ossificação intramembranosa e a formação da cartilagem de Meckel. 43

Quadro 1.7: Fenótipos ósseos encontrados em animais *knockout*, mutantes ou em modelos de doenças genéticas humanas de TIMPs durante a ossificação intramembranosa e a formação da cartilagem de Meckel. 45

Quadro 1.8: Fenótipos ósseos encontrados em animais normais, *knockout*, mutantes ou em modelos de doenças genéticas humanas para as MMP durante a ossificação endocondral. 49

Quadro 1.9: Fenótipos ósseos encontrados em animais *knockout*, mutantes ou em modelos de doenças genéticas humanas de TIMPs durante a ossificação endocondral. 56

Quadro 3.1: Padronização da concentração dos anticorpos primários. 62

Quadro 3.2: Soros normais utilizados como controle negativo. 65

Quadro 3.3: Lista de anticorpos utilizados em imunohistoquímica. 67

Quadro 3.4: Vectastain® Elite ABC Kit utilizados. 67

Quadro 3.5: Seqüência dos *primers* utilizados na geração das sondas para hibridização *in situ*. 68

Quadro 3.6: Enzima de restrição utilizada para a verificação da especificidade da sonda de RECK para hibridização *in situ*. 70

Quadro 4.1: Resumo dos resultados encontrados em imunohistoquímica durante a formação do incisivo de rato. 90

Quadro 4.2: Resumo dos resultados encontrados em imunohistoquímica durante a odontogênese. 99

Quadro 4.3: Resumo dos resultados encontrados em imunohistoquímica durante os estágios iniciais da ossificação endocondral em camundongos. 120

Quadro 4.4: Resumo dos resultados encontrados em imunohistoquímica durante os estágios finais da ossificação endocondral em camundongos. 121

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi delinear o perfil de expressão temporal e espacial das MMP-2 e -9, TIMP-1 e -2 e RECK durante os eventos de formação de tecidos mineralizados (osso, esmalte e dentina) em camundongos em fase embrionária, recém-nascidos e indivíduos adultos através de imunohistoquímica e hibridização *in situ*. Durante a amelogênese em incisivos de rato adulto, na fase de secreção, as MMPs e RECK foram imunocoradas na região infracelular dos ameloblastos de secreção e RECK foi ainda detectado difuso no citoplasma destas células. MMP-9 foi localizada nas células do retículo estrelado e RECK nas células do epitélio externo. Na fase de transição, detectados uma fraca imunomarcação ao nível da membrana dos ameloblastos de transição para as MMPs e RECK esteve difuso no citoplasma destas células. Na camada papilar, as MMPs e RECK foram imunomarcadas nos macrófagos ou células dendríticas. Do início ao final da fase de maturação, a expressão de RECK foi aumentando nos ameloblastos de maturação e nas células da camada papilar, enquanto que a expressão das MMPs foi diminuindo nestas células. AS TIMPs foram detectadas somente nos ameloblastos na fase de maturação. Nós observamos RECK e a MMP-9 no citoplasma do odontoblastos, provavelmente, no complexo de Golgi ou na rede do retículo endoplasmático rugoso. Durante a ossificação intramembranosa da mandíbula e maxila, os osteoblastos foram imunocorados pelas MMPs, TIMPs e RECK. Na degradação da cartilagem de Meckel, MMPs, TIMPs e RECK foram imunomarcadas nas células do pericôndrio, bem como o mRNA de RECK. Durante a odontogênese, RECK foi imunocorado nas células do epitélio oral migrando ao ecto-mesênquima, na fase de broto, no epitélio interno do órgão do esmalte, na fase de capuz e em odontoblastos e ameloblastos na fase final de campânula. Transcritos de RECK foram localizados em todo o germe dentário na fase de capuz, mais concentrado no nó-do-esmalte secundário, na

fase de campânula inicial e nos odontoblastos e ameloblastos, na fase final de campânula. O osso alveolar foi marcado em todos os períodos. Durante a ossificação endocondral, os condrócitos foram imunopositivos para as MMPs, TIMPs e RECK, na fase de diferenciação dos condrócitos (E13). Na fase de molde cartilaginoso (E14) os condrócitos hipertróficos foram imunocorados para as MMPs e RECK. RECK e TIMPs foram também encontradas no pericôndrio. Na fase de invasão vascular e celular (E15), MMPs, TIMPs e RECK foram expressos por células que migram do colar ósseo para o centro da diáfise, bem como por osteoclastos/condroclastos próximos ao septo transverso. Os condrócitos hipertróficos continuam imunocorados. De E16 a PN1, as MMPs, TIMPs e RECK foram expressas por osteoblastos e condrócitos hipertróficos na placa de crescimento e pelas células do periósteo e pericôndrio. Os resultados obtidos apontam para a expressão diferenciada de MMPs, TIMPs e RECK nos diversos eventos estudados, sugerindo que a atividade biológica destas proteínas regula a degradação da matriz extracelular tanto durante o desenvolvimento dos tecidos como sua manutenção. Além disso, pela primeira vez, demonstra-se a expressão de RECK pelas células formadoras de tecido ósseo e dentário.

ABSTRACT

Our objective was to analyse the spatial-temporal distribution of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 and RECK during development of mineralized tissue (bone, enamel, and dentine) in embryos, newborn, and adult mice by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. During rat amelogenesis, at the secretion phase, MMPs and RECK were immunostained in the ameloblast infracelular region and RECK was also detected in the cytoplasm of these cells. MMP-9 was localized in the stellated cells and RECK in the outer enamel epithelium cells. At the transition phase, a weak immunostaining was observed at the ameloblast membranes for MMPs and RECK. RECK was also detected in the cytoplasm of these cells. At the papillary layer, MMPs and RECK have been observed in macrophages and/or dendritic cells. At early and late maturation phases, MMPs and Reck profiles were similar to the transition phase, but the immunostaining was less pronounced. TIMPs were identified exclusively in maturation ameloblasts throughout the maturation phase. We also observed that the cytoplasm of odontoblasts, probably at the Golgi apparatus and/or the RER network were immunostained for Reck and MMP-9. During mandible and maxillae intramembranous ossification, osteoblasts were immunostained for MMPs (early stage), TIMPs (late stage) and RECK. In Meckel cartilage degradation, MMPs, RECK and TIMPs mRNA and protein were found in perichondrial cells. During odontogenesis migrating epithelial cells in bud stage, enamel inner epithelial cells in cap stage, and ameloblasts and odontoblasts in bell stage were immunostained for RECK. Also, RECK mRNA was found difuse in all tooth germ in cap stage, mainly localized in primary enamel knout in early bell stage, and in ameloblasts and odontoblasts in late bell stage. The alveolar bone was immunolabelled in all periods. During endochondral ossification, chondrocytes were immunopositive for MMPs, RECK, and TIMPs during chondrocyte differentiation (E13). At the cartilaginous template (E14), the hypertrophic

chondrocytes (HC) were immunostained for MMPs and RECK. RECK and TIMPs immunopositive cells were found in the perichondrium. At the vascular and cellular invasion (E15), MMPs, RECK and TIMPs were expressed by migrating cells from bone collar as well as by osteoclasts/chondroclasts close to the transverse septum. HC remained immunostained. From E16 to PN1, MMPs, TIMPs, and RECK were expressed by osteoblasts and HC in the growth plate and by cells in the perichondrium and periosteum. The results show the differential expression of MMPs, TIMPs, and RECK during the processess studied, sugesting that the biological activity these proteins regulates the MEC degradation and its maintenance in tissue development. Our results show for the first time that RECK is expressed by bone-forming and tooth-forming cells during mouse endochondral and intramembranous and in embryonic and adult odontogenesis, even if these cells are from different embryonic origins.

Introdução

1 - Introdução

A matriz extracelular mineralizada (produzida por ameloblastos, osteoblastos e odontoblastos) confere marcante rigidez e resistência ao esqueleto e tecidos dentários enquanto mantém certa elasticidade. Particularmente com relação ao tecido ósseo, ela desempenha, ainda, um importante papel na manutenção da homeostase do organismo. A remodelação da matriz óssea requer a solubilização da fase mineral e, em seguida, a degradação da matriz orgânica pela ação de proteinases.

As metaloproteinases de matriz são endopeptidases zinco dependentes que, em conjunto, podem degradar todos os componentes da matriz extracelular. São as principais responsáveis pelo remodelamento tecidual durante eventos fisiológicos normais como a embriogênese e organogênese, bem como em eventos patológicos como a invasão tumoral nos tecidos. As MMP-2 e MMP-9 são as responsáveis pela degradação do colágeno tipo IV e laminina presentes na membrana basal celular. As pesquisas nessa área têm buscado identificar as MMPs envolvidas nos mecanismos moleculares que regulam os processos de mineralização biológica, tanto na osteogênese quanto na odontogênese, já que é sabido que algumas doenças ósseas e dentárias são atribuídas a ausência ou super-expressão destas enzimas. As evidências atuais sugerem que o balanço entre as MMPs e seus inibidores, tais como os inibidores teciduais das MMPs (TIMPs) e RECK, determinam o grau de remodelação da matriz extracelular.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi delinear o perfil de expressão temporal e espacial da MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e RECK durante os eventos de formação de tecidos mineralizados (osso, dentina e esmalte) em camundongos em fase embrionária, recém-nascidos e indivíduos adultos. Para tanto foram utilizadas técnicas de biologia molecular (hibridização *in situ* e real time PCR), imuno-ensaios (imunohistoquímica) e bioquímicos (zimografia em gel).

Os resultados obtidos apontam para a expressão diferenciada de MMPs, TIMPs e RECK nos diversos eventos estudados, sugerindo que a atividade biológica destas proteínas regula a degradação da matriz extracelular tanto durante o desenvolvimento dos tecidos como sua manutenção. Além disso, pela primeira vez, demonstra-se a expressão de RECK pelas células formadoras de tecido ósseo e dentário. Estudos posteriores enfocarão a análise dos fatores de transcrição envolvidos na expressão de MMPs, TIMPs e RECK durante o desenvolvimento dos tecidos mineralizados e remodelação óssea.

1.1 - Matriz Extracelular

Matriz extracelular (MEC) é uma rede de macromoléculas dinâmica constituída principalmente de colágeno, proteoglicanas e glicoproteínas, tais como laminina e fibronectina, a qual forma uma barreira entre os tecidos e prove um molde estrutural para o suporte dos mesmos (Pimentel, 2001). A MEC funciona também como um reservatório de fatores de crescimento que podem ser rapidamente utilizados durante a sua degradação e remodelação. Assim, prove um ambiente propício para a proliferação, migração e diferenciação celular que são essenciais para a contínua remodelação tecidual necessária durante o desenvolvimento e crescimento, tais como morfogênese vascular (revisado por Brooke et al., 2003), angiogênese (revisado por Li et al., 2003) e desenvolvimento do esqueleto (revisado por Aszódi et al., 2000). Por outro lado, a remodelação da MEC também é importante em certos eventos patológicos, tais como reparo, osteoporose, artrite reumatóide e câncer (revisado por Sternlicht e Werb, 2001).

A MEC interage com as células via receptores tais como integrinas (Fata et al., 2004), sindecan (Saunders et al., 1989), tenascina (Lightner e Ericson, 1990), β-1,4-galactosiltransferase (GalTase) (Hathaway e Shurr, 1996), distroglicana (Durbeej e Ekblom, 1997; Muschler et al., 2002), domínio receptor de discoidina 1 (*discoidin domain*

receptor 1 – DDR1) (Vogel, 2001) e receptores tipo Toll (Schaefer et al., 2005) que são importantes para regular a vias de transdução de sinais intracelulares imprescindíveis para a polarização, diferenciação, sobrevivência e proliferação celular (Rohrbach, 1993).

As células utilizam varias estratégias para regularem as proteinases da MEC: regulação da transcrição, controle do tráfico de vesículas ou de estruturas ligadas à membrana celular (secreção e endocitose), ativação de pró-enzimas e a produção de inibidores endógenos.

1.2 - Proteinases

Proteinases são todas as enzimas do tipo hidrolases peptídicas pertencentes ao subgrupo 3.4 da *Enzyme Commission* (Grassmann e Dyckerhoff, 1928). Estas enzimas que podem hidrolisar ligações peptídicas terminais (peptidases ou exopeptidases) ou internas (proteinases ou endopeptidases) das proteínas e constituem mais de 550 membros identificados no genoma humano e de camundongo (Puente et al., 2003). Estas enzimas são classificadas de acordo com a composição de aminoácidos de seus sítios catalíticos como aspártica, cisteína, metalo, serina ou treonina proteinases e são divididas em clãs de acordo com suas similaridades estruturais (Barrett et al., 2001).

As metaloproteinases de matriz (MMPs), as serralisinas (enzimas de bactérias), as astacinas e as adamalisinas (ADAMs - desintegrina e metaloproteinase - e as ADAM-TS - ADAMs com repetições de trombospondina) são membros das metaloproteinases de mamíferos (MPs) dentro da superfamília metzincina. Estas enzimas possuem múltiplos domínios, são endopeptidases zinco-dependentes, com um perfil estrutural comum e todas apresentam a mesma configuração terciária do sítio catalítico (estrutura secundária caracterizada pela presença de uma seqüência altamente conservada contendo 3 histidinas ligadas ao zinco - no sítio catalítico - e uma metionina), chamada de metzincina

(Stöcker et al., 1995). As MPs apresentam uma seqüência peptídica ligada ao zinco característica (HEBXHXBGBXH**Z**), onde o aminoácido variável "Z" é específico de cada família (Stöcker et al., 1995). Embora elas tenham uma alta similaridade estrutural, as funções desempenhadas pelas MPs são enormemente variadas (Brinckerhoff e Matrisian, 2002).

1.2.1 - Metaloproteinases de Matriz (MMPs)

As MMPs são uma importante família e representam a maior classe de enzimas responsáveis pela degradação ou reabsorção dos componentes da MEC. Elas processam e degradam inúmeras proteínas peri e extracelulares e, coletivamente, são capazes de degradar todos os componentes da MEC (Birkedal-Hansen, 1993), além de serem as únicas enzimas capazes de clivar colágenos fibrilares (Curran e Murray, 1999).

A primeira MMP descrita foi encontrada em caudas de girinos em metamorfose e esta foi denominada de colagenase por Gross e Lapière (1962). As MMPs de mamíferos são classificadas em solúveis e MMPs ancoradas à membrana celular (MT-MMP), de acordo com suas especificidades enzima-substrato *in vitro*. A maioria das MMPs solúveis é secretada como pró-enzimas e requerem ativação no meio extracelular (Harper et al., 1971), enquanto que as MT-MMPs são ativadas intracelularmente e expressas na superfície celular na forma ativa (Nabeshima et al., 2002). As MMPs solúveis são classificadas em colagenases, gelatinases, estromelisinas, matrilisinas e outras. Já as MT-MMPs são compostas por seis membros diferentes. A subclassificação das MMPs foi, originalmente, baseada em seus correspondentes substratos da MEC, mas, atualmente, as MMPs são designadas numericamente de acordo com a ordem cronológica na qual elas foram identificadas e agrupadas de acordo com sua estrutura tridimensional (revisado por Egeblad e Werb, 2002) (Quadro 1.1). As MMPs -4, -5, -6 e -22 foram

removidas da lista por serem idênticas a outros membros (Nagase et al., 2006). As MMPs são proteinases extracelulares, mas, recentes estudos têm mostrado que as MMPs -1 (Limb et al., 2005), -2 (Kwan et al., 2004) e -11 (Luo et al., 2002) são também encontradas intracelularmente e podem interagir com proteínas intracelulares.

Inicialmente classificadas como proteinases capazes de clivar todos os componentes da MEC, as MMPs tiveram seus alvos proteolíticos específicos ampliados nesta última década incluindo outras moléculas da superfície celular eproteínas pericelulares não relacionadas à MEC, atuando assim na regulação do comportamento celular em várias vias, principalmente ao nível da sinalização celular. Estas incluem outras proteinases, inibidores de proteinases, moléculas quimiotáticas, fatores de crescimento latentes (pró-TGF-β, entre outros), proteínas ligadas a fatores de crescimento, receptores ancorados à membrana plasmática (integrinas, CD44, etc) e moléculas de adesão célula-célula e célula-matriz.

Enzimas envolvidas em tais processamentos proteolíticos formam cascatas de ativação proteolítica, como é o caso das MMPs (Figura 1.1). Através destas variadas formas de atuação, as MMPs podem afetar profundamente o ambiente pericelular e a promoção ou desfavorecimento da integridade tecidual não somente pela degradação da MEC, mas também pela geração de moléculas bioativas (revisado por Egeblad e Werb, 2002). As MMPs são sintetizadas como pré-pró-enzimas e a maioria é secretada na forma latente, ou seja, pró-enzimas (zimogênio), contendo 5 domínios básicos: (I) N-terminal pré-peptídico (cerca de 10 kDa), sinalizador da secreção e removido no retículo endoplasmático rugoso; (II) N-terminal pró-peptídico, removido intra ou extracelularmente (cerca de 80 aminoácidos, contendo a sequência conservada PRC**XX**PD); (III) catalítico (20 kDa); (IV) região da alça; e (V) C-terminal tipo hemopexina (30 kDa) (revisado por Visse e Nagase, 2003) (Figura 1.2). Estes domínios representam a composição básica de

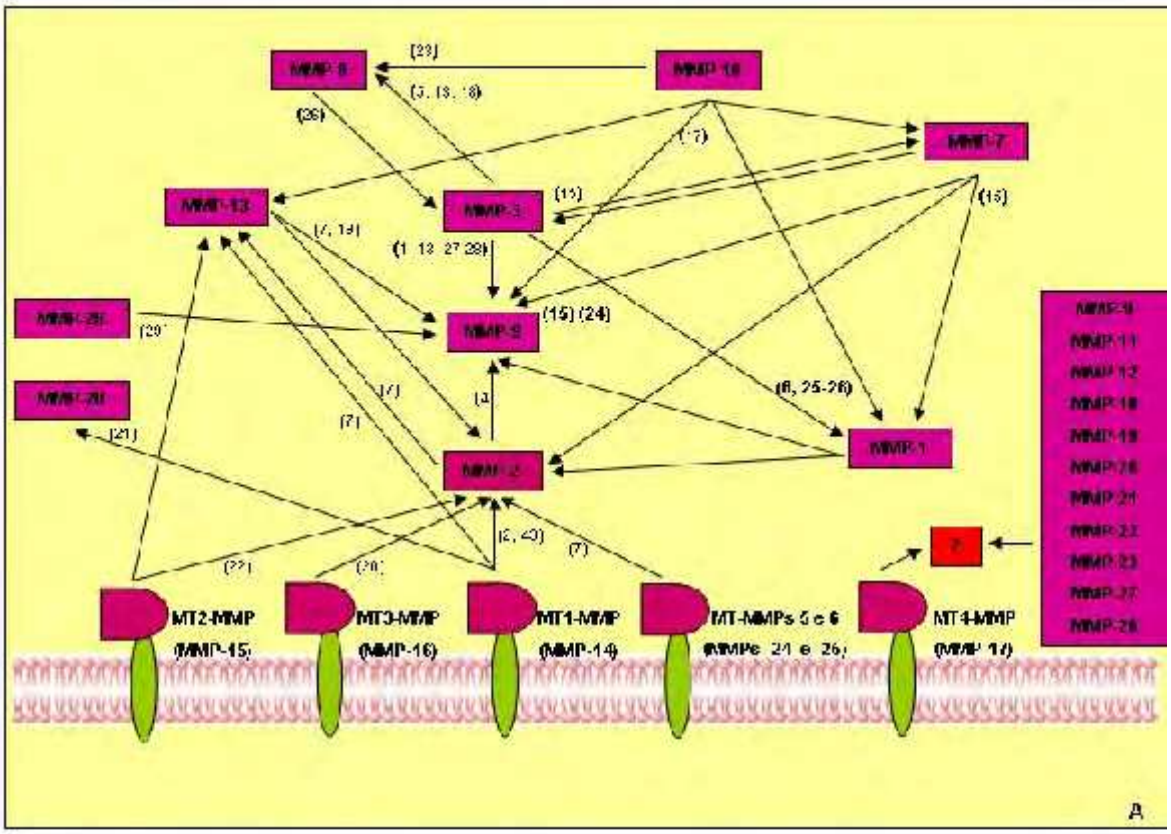
Quadro 1.1: Classificação das MMPs e seus respectivos substratos conhecidos.

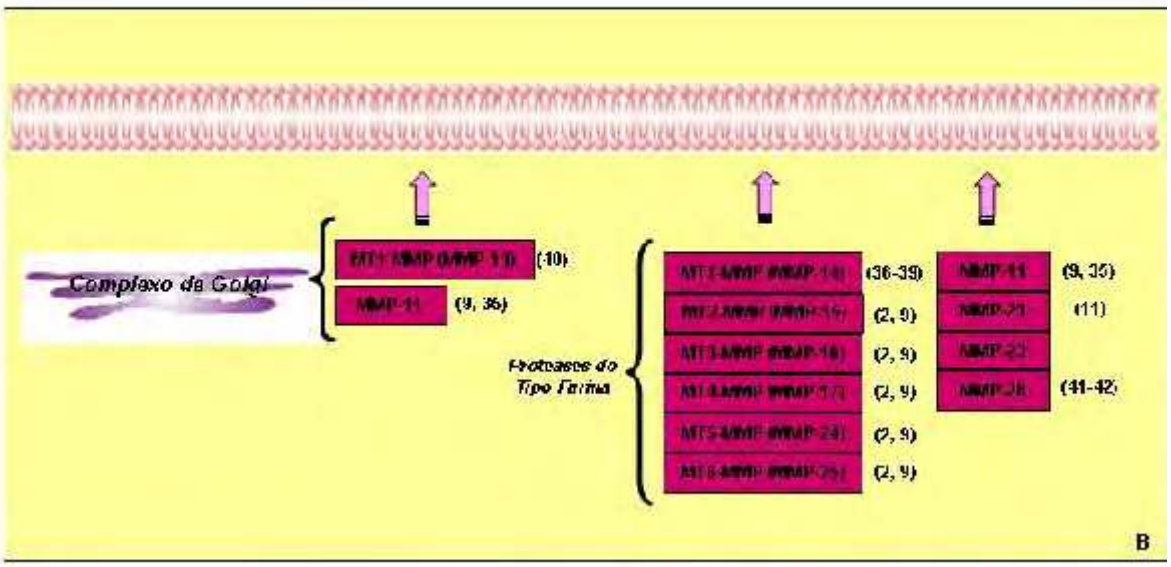
Grupo	*MMP*	*Nome*	*Formas latente e Ativa (kDa)*	*Substratos*
Colagenases	1	Colagenase Intersticial, Colagenase Fibroblástica, Colagenase Tecidual ou Colagenase-1	55/45	Col I, II, III, VII, VIII, X, gelatina, aggrecan, versican, perlecan, fibronectina, proteína link, caseína, α2-M, ovostatina, nidogênio, pró-TNF-α, L-selectina, α1-PI, PZP, IGFBP-3, pró-IL-1β e IL-1β, MCP-3, SDF-1
	8	Colagenase Neutrofílica, Colagenase de Neutrófilo Polimorfonuclear, Colagenase Granulocítica ou Colagenase-2	75/58	Col I, II, III, V, VII, VIII, X, gelatina, aggrecan, α1-PI, antiplasmina-α2, fibronectina, receptor de proteinase ativada 1
	13	Colagenase-3	60/48	Col I, II, III e IV, XVIII, gelatina, PAI-2, aggrecan, perlecan, laminina, elastina, tenascina, fibrilina, fibronectina, osteonectina, MCP-3, SDF-1
Gelatinases	2	Gelatinase A, Gelatinase Neutrofílica ou Colagenases tipo IV de 72 kDa	72/66	Vide Tabela 1.2
	9	Gelatinase B ou Colagenase tipo IV de 92 kDa	92/86	
Estromelisinas	3	Estromelisina-1, Transina-1, Proteoglicanase ou Proteína Ativadora de Pró-colagenase	57/45	Col III, IV, IX, X, XVIII, gelatina, aggrecan, versican, decorina, perlecan, fibrilina, nidogênio, fibronectina, laminina, elastina, plasminogênio, caseína, fibrinogênio, antitrombina-III, α2-M, ovostatina, α1-PI, pró-TNF, IGFBP-3, E-caderina, osteonectina, pró-IL-1β, MCP-3, SDF-1
	10	Estromelisina-2 ou Transina-2 Estromelisina-3	57/44	Col III, IV, V, gelatina, caseína, aggrecan, elastina, proteína link, fibronectina
	11		51/44	Laminina, fibronectina, gelatina, α1-PI, IGF, IGFBP-1
MMPs Tipo de Membrana	14	MT1-MMP	66/56	Col I, II, III, XVIII, aggrecan, gelatina I, caseína, elastina, fibronectina, fator XIII, fibrina, fibrilina, fibrinogênio, vitronectina, laminina-1, -5 (γ2), 5(β3), pró-TNF, sindecan-1, proteoglicana dermatan sulfato, CD44, MCP-3, transglutaminase tecidual da superfície celular, MUC1, lumicam, LDL-RP, integrina αv, SDF-1
	15	MT2-MMP	72/60	Gelatina, fibronectina, tenascina, laminina, nidogênio, transglutaminase tecidual da superfície celular
	16	MT3-MMP	64/52	Col III e fibronectina, transglutaminase tecidual da superfície celular
	17	MT4-MMP	57/53	-
	24	MT5-MMP	-	-
	25	MT6-MMP ou Leucosina	-	-
Matrilisina	7	Matrilisina, Matrina, Metaloproteinase Uterina ou PUMP-1	28/19	Col IV, X, XVIII, gelatina, aggrecan, proteína link, elastina, fibronectina, decorina, laminina, plasminogênio, entactina, caseína, transferrina, mielina básica, α1-PI, pró-TNF-α, FASL, criptina, osteonectina, IGFBP-3, E-caderina, RANKL, EGF ligado a heparina
	26	Endometase ou Matrilisina-2	-	Col IV, fibronectina, vitronectina
Outras	12	Metaloelastase Macrofágica, Elastase Macrofágica ou Metaloelastase Colagenase-4 (*Xenopus*)	54/45-22	Col IV, XVIII, gelatina, elastina, α1-PI, fibronectina, aggrecan, entactina/nidogênio, plasminogênio, vitronectina, fibrilina, laminina, pró-TNF, mielina básica, receptor ativador de plasminogênio tipo urokinase
	18	RASI-1	-	Col IV, gelatina, tenascina, aggrecan, IGFBP-3, laminina-5 (γ2), nidogênio-1, COMP
	19	Enamelisina	54/22	Amelogenina, Col XVIII, aggrecan, COMP
	20	Homóloga ao *Xenopus* XMMP	-	-
	21	CMMP (*chicken*) ou MMP associada à Artrite Reumatóide	54/46-41	Aggrecan
	23	Cisteína Array MMP (CA-MMP), Femalisina, MIFR ou MMP-21/MMP-22¥	55/?	-
	27	Epilisina		-
Sem Grupo	-	Mcol-A (*mouse*)	-	-
	-	Mcol-B (*mouse*)	-	-
	-	Gelatinase de 75-kDa (*Chicken*)	-	-

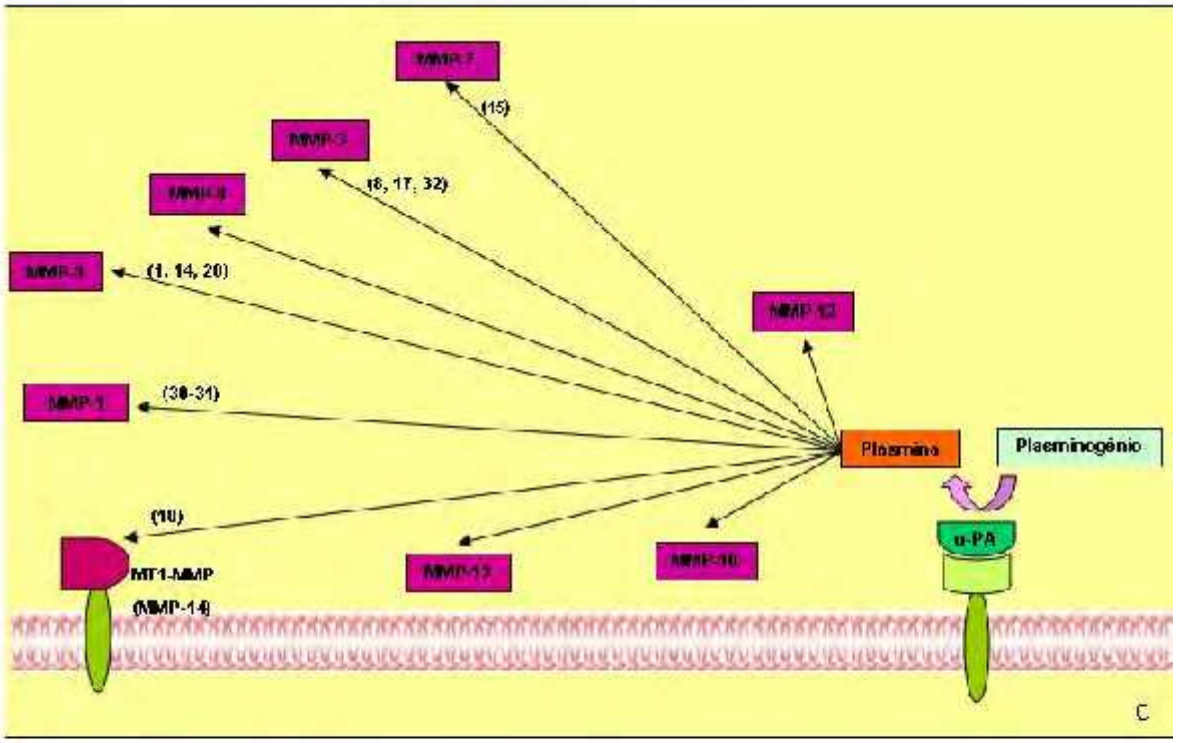
α2-M: α2-macroblogulina, α1-PI: inibidor de proteinase α1 (*α1-proteinase inhibitor*), COMP: Proteína de matriz oligomérica da cartilage (*cartilage oligomeric matrix protein*), FASL: ligante de Fas, IGFBP: *insulin-like growth factor binding protein*; LDL-RP: receptor relacionado a lipoproteína de baixa densidade (*low-density lipoprotein receptor protein*), MCP-3: proteína quimiotática de monócitos-3 (*monocyte chemoattractant protein-3*), MUC: mucina transmembrana, PAI-2: inibidor do ativador de plasminogênio 2 (*plasminogen activator inhibitor-2*), PZP: proteína da zona de pregnância (*pregnancy zone protein*), RANKL: ligante de RANK, SDF: Fator derivado de célula estromal 1 *(stromal cell-derived factor-1)*. Dados extraídos de: Shapiro et al., 1993; Murphy et al., 1993; Fowlkes et al., 1994; Ellerbroek e Stack, 1999; Bartlett e Simmer, 1999; Ashworth et al., 1999; Hahn-Dantona et al., 2000; Haro et al., 2000; Ferreras et al., 2000; Stracke et al., 2000; Lin et al., 2001; Sternlicht e Werb, 2001; Egeblad e Werb, 2002; Souza e Line, 2002; Sadowski et al., 2003; Shirafuji et al., 2003; Udayakumar et al., 2003; Hao et al., 2004; Thathiah e Carson, 2004; Titz et al., 2004; Miyamoto et al., 2004; Sadowski et al., 2005; Lynch et al., 2005; Boire et al., 2005; Itoh e Seiki, 2006; Lemaître e D'Armiento, 2006.

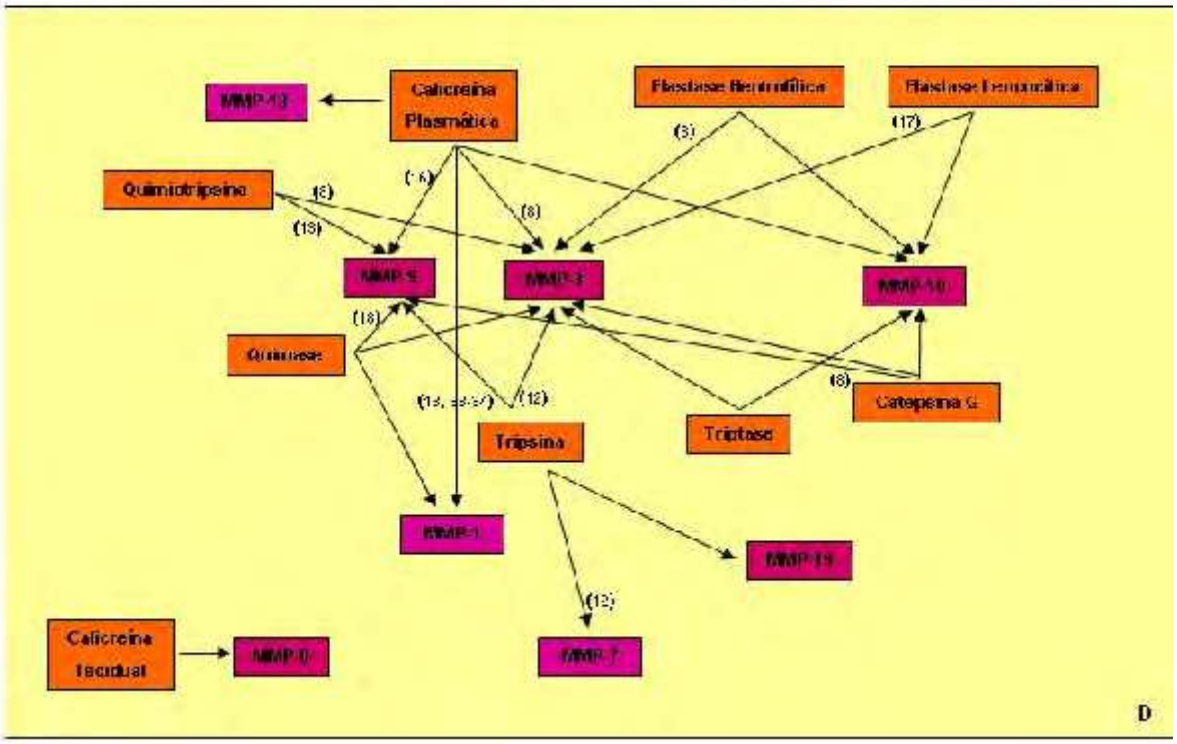
todas as MMPs (exceto das MMPs -7 e -23, as mais simples dentre as MMPs e não possuem o domínio hemopexina e nem a região da alça), e o aumento dos domínios está diretamente relacionado com o aumento da especificidade enzima-substrato ou em relação a sua localização celular, como é o caso das MT-MMPs. Todas MMPs são ativas em pH neutro, requerem Ca^{2+} para ativação e manutenção da conformação tridimensional. As MMPs solúveis são ativadas por clivagem enzimática (por serina proteinases e outras MMPs – Figura 1.1A e D) do domínio pró-peptídico (PRCGVPDV - especificamente entre a cisteína e o Zn^{+2}), liberando um fragmento de, aproximadamente, 10 kDa.Este processo resulta na alteração conformacional da proteína, revelando assim o seu sítio ativo e este é o mecanismo de ativação conhecido como *cysteine switch* (Springman et al., 1990; Van Wart e Birkedal-Hansen, 1990).

Figura 1.1: *Representação esquemática da cascata de ativação das MMPs. (A), intracelularmente por proteinasess do tipo furina (B), pela via da serino proteinases uPa (C) e por outras serinas proteinasess (D). (1) O'Connell et al., 1994; (2) Sato et al., 1994; (3) Atkinson et al., 1995; (4) Fridman et al., 1995; (5) Ogata et al., 1992; (6) Suzuki et al., 1990; (7) Knäuper et al., 1996a; (8) Nagase et al., 1990; (9) Pei e Weiss, 1995; (10) Okumura et al., 1997; (11) Ahokas et al., 2002; (12) Crabbe et al., 1994a; (13) Okada et al., 1992a; (14) Ramos-DeSimone et al., 1999; (15) Imai et al., 1995; (16) Desrivieres et al., 1993; (17) Okada et al., 1988; (18) Fang et al., 1997; (19) Knäuper et al., 1997; (20) Takino et al., 1995; (21) Palosaari et al., 2002; (22) D'Ortho et al., 1997; (23) Knäuper et al., 1996b; (24) von Bredow et al.,1998; (25) Murphy et al., 1987;(26) Knäuper et al., 1993; (27) Shapiro et al., 1995; (28) Goldberg et al., 1992; (29) Uria e Lopez-Otin, 2000; (30) Okada et al., 1990; (31) Gavrilovic e Murphy, 1990; (32) Murphy et al., 1991; (33) Ogata et al., 1995; (34) Sorsa et al., 1997; (35) Basset et al., 1990; (36) Sato et al., 1996; (37) Yana e Weiss, 2000; (38) Stawowy et al., 2004; (39) Stawowy et al., 2005;(40) Mazzone et al., 2004; (41) Marchenko e Strongin , 2001; (42) Lohi et al., 2001.*


MT2-MMP
(MMP-15)
MT3-MMP
(MMP-16)
MT1-MMP
(MMP-14)
MT-MMPs 5 e 6
(MMPs 24 e 25)
MT4-MMP
(MMP-17)
A


Complexo de Golgi
(10)
(9, 35)
Proteases do
Tipo Furina
(36-39)
(2, 9)
(11)
(41-42)
B


(15)
(8, 17, 32)
(1, 14, 20)
(30-31)
Plasmina
Plasminogênio
u-PA
(10)
MT1-MMP
(MMP-14)
C


Calicreína Plasmática
Quimiotripsina
(18)
Quimase
Triptase
Catepsina G
Tripsina
(12)
Calicreína Tecidual
D

Existe ainda outro mecanismo de ativação chamado *stepwise activation* (Nagase, et al., 1990) onde a clivagem de um determinado ponto do domínio pró-peptídico remove apenas uma parte da seqüência peptídica e sua completa remoção é, freqüentemente, efetuada por uma MMP intermediária ou por outra ativa.

Embora a maior parte destas enzimas seja secretada como pró-enzimas, dez pró-MMPs possuem uma seqüência de reconhecimento da pró-proteína convertase tipo furina localizada no final do segmento pró-peptídeo e podem ser ativadas intracelularmente e secretadas para a MEC ou ancoradas á membrana celular na forma ativa (Sato et al., 1994; Pei e Weiss, 1995). Elas podem ainda ser ativadas por agentes não proteolíticos, tais como agentes reativos de SH, compostos de mercúrio, espécies reativas de oxigênio e desnaturantes, pelo mesmo mecanismo de clivagem entre a Cys-Zn^{+2} (Nagase, 1997).

MMPs presentes em células normais e localizadas pericelularmente, no tempo e quantidades corretas, são ativadas ou inibidas apropriadamente. Então, estas enzimas são fortemente reguladas aos níveis transcricional, pós-transcricional, ao nível protéico via seus ativadores e inibidores e interação com componentes específicos da MEC (revisado por Nagase e Woessner, 1999 e Sternlicht e Werb, 2001) (Figura 1.3).

A expressão gênica destas enzimas é regulada por diversos fatores estimulantes e supressores que influenciam muitas vias de sinalização. Por exemplo, a expressão de várias MMPs pode ser regulada positiva e negativamente por ésteres de forbol, sinais derivados de integrinas, proteínas da MEC, stress celular e alteração na morfologia (Kheradmand et al., 1998; Sternlicht e Werb, 1999). A expressão é ainda regulada por hormônios, fatores de crescimento, oncogenes e citocinas, tais como interleucinas, interferons, EGF (*epidermal growth factor*), KGF *(keratinocyte growth factor*), NGF (*nerve growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), PDGF *(platelet-derived growth factor*), TNF-α (*tumor necrosis factor-alpha*), TGF-β (*tumor*

growth factor-beta), EMMPRIN (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*) (Fini et al., 1998).Muitos destes estímulos induzem a expressão e/ou ativação de produtos dos proto-oncogenes *c-fos* e *c-jun*, os quais se heterodimerizam e ligam-se aos sítios do ativador de proteína 1 (AP-1) onde se encontram vários genes promotores das MMPs. Embora o

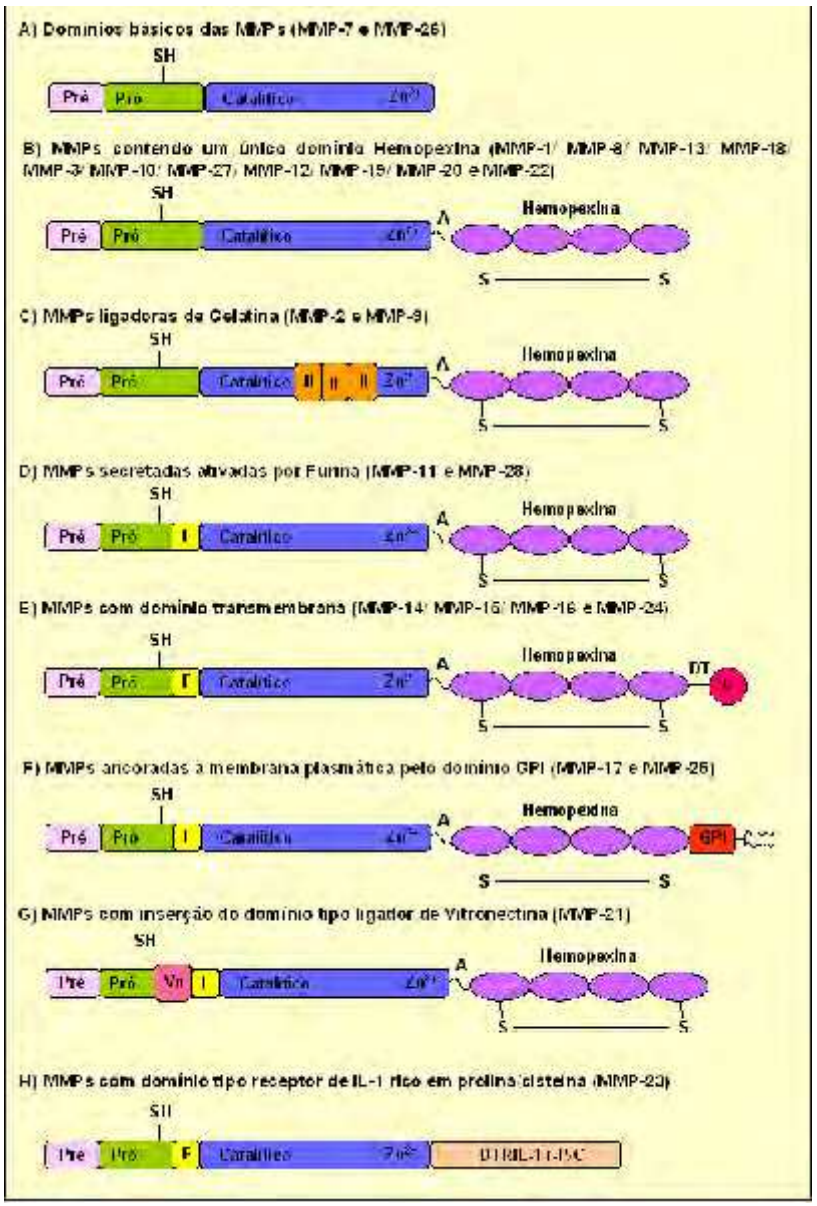


Figura 1.2: *Domínios das MMPs. Pré: segmento pré-peptídico sinal (N-terminal); Pró: segmento pró-peptídico com um grupamento tiol (SH) livre ligador de zinco (N-terminal); A: região da alça; F: sítio susceptível a atuação de enzimas tipo furina; DT: domínio transmembrana (C-terminal); C: cauda citoplasmática (C-terminal); GPI: domínio glicosilfosfatidilinositol ancorado á membrana plasmática (C-terminal); Vn: domínio tipo vitronectina/hemopexina contendo 4 repetições, sendo que a primeira e a última estão ligadas por ponte dissulfeto; DTRIL-1 r-P/C: domínio tipo receptor de IL-1 (interleucina-1) rico em prolina/cisteína (C-terminal) (Adaptado de Sternlicht e Werb, 2001).*

complexo AP-1 desempenhe uma importante função na regulação de diversos genes das MMPs, outros fatores também estão envolvidos. Em alguns casos, um sinal pode coordenadamente regular alguns genes de MMPs e diferencialmente regular outros, como acontece com o TGB-β, retinóides e glicocorticóides (Benbow e Brinckerhoff, 1997). Existem também evidências que sugerem que membros ou grupos da família das MMPs são regulados independentemente (Brown et al., 1990; Vincenti et al., 1998).

Durante o processamento pós-transcricional, muitos mRNAs das MMPs sofrem *splicing* alternativo acarretando em algumas das isoformas da MMP-3, por exemplo (Matsumoto et al., 1997), ou poliadenilação (Sternlicht e Werb, 1999). Muitos transcritos podem ser ainda estabilizados ou desestabilizados por ésteres de forbol, glicocorticóides e fatores de crescimento (Delany et al., 1995; Vincenti, 2001).

Ao nível do processamento pós-traducional, muitas MMPs recebem grupamentos químicos ou domínios específicos (como o GPI). A maioria delas é secretada como

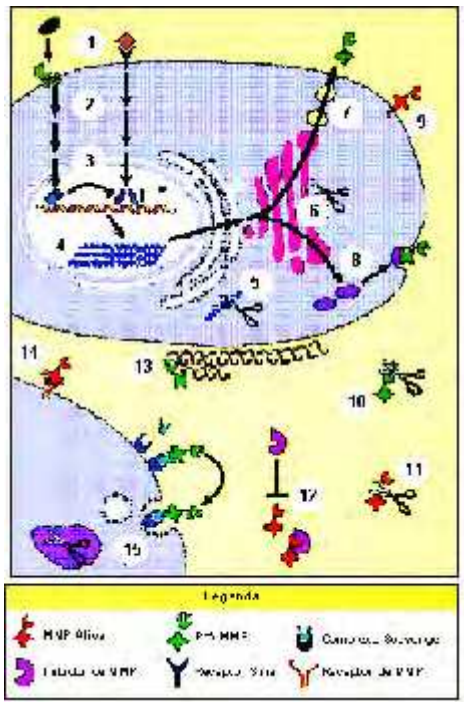


Figura 1.3: *Diversas vias de regulação intra e extracelular das MMPs. (1) Sinalização indutora ou supressora da expressão gênica; (2) transdução do sinal intracelular; (3) ativação ou repressão da transcrição; (4) processamento do mRNA após a transcrição; (5) degradação do mRNA; (6) ativação intracelular de MMPs susceptíveis a furina; (7) secreção constitutiva; (8) regulação da secreção; (9) expressão na superfície celular; (10) ativação proteolítica; (11) processamento proteolítico ou inativação; (12) inibição da atividade enzimática; (13) localização na MEC; (14) localização na superfície celular; (15) endocitose e degradação intracelular (Adaptado de Sternlicht e Werb, 2001).*

glicoproteínas e contêm um ou mais sequências para *N*-glicosilação (Asn-Xaa-Ser/Thr/(Cys), Xaa pode ser qualquer aminoácido, exceto prolina). Interessantemente, existe um sítio de glicosilação no domínio ativo, contendo a sequência TY/FXIXNY/VT/S, que é conservado na maioria das MMPs, exceto para as MMPs -2, -7, -11, -14 e -25, e é freqüentemente cercado por outros sítios de *N*-glicosilação.

Este domínio conservado sugere uma potencial função para as MMPs (revisado por Van den Steen et al., 2001). Embora a maioria destas enzimas seja secretada constitutivamente, elas podem ser armazenadas em grânulos ou vesículas no citoplasma e serem secretadas após um sinal específico, como ocorre em neutrófilos onde a MMP-9 é armazenada e secretada após a ativação neutrofílica por mediadores inflamatórios (Hasty et al., 1990).

Tanto a pró-enzima como a enzima ativa pode ser inibida na MEC por seus inibidores, situados na membrana plasmática e no perímetro pericelular, ou por aqueles ligados a moléculas da MEC, presentes em locais mais distantes do sítio de secreção da enzima. Além disso, a expressão temporal e espacial destas enzimas parece estar altamente ligada à célula ou tecido-específico (Curran e Murray, 1999).

As MMPs participam de muitos processos biológicos normais, tais como desenvolvimento embrionário, morfo e organogênese, apoptose, proliferação e diferenciação celulares, angiogênese e em eventos patológicos, como o câncer (Coussens et al., 2002).

1.2.1.1 - Gelatinases

As gelatinases MMP-2 (gelatinase A ou colagenase tipo IV de 72 kDa) (Collier et al., 1988) e MMP-9 (gelatinase B ou colagenase tipo IV de 92 kDa) (Wilhelm et al., 1989), estão envolvidas na proteólise e rompimento de membranas basais, pela degradação de

diversos tipos de colágenos, colágenos desnaturados (gelatinas), proteoglicanas e glicoproteínas (Quadro 1.2) (Thomas et al, 1999; Kahari e Saarialho-Kere, 1999). Elas possuem 3 inserções de repetições ricas em cisteína no sítio catalítico (domínio tipo fibronectina II - *fibronectin-type II*) (Allan et al., 1995; Steffensen et al., 1995), inexistentes em outros grupos de MMPs. Estas inserções lembram a repetições tipo ligadoras de colágeno tipo II ou de fibronectina e são requeridas para a ligação e clivagem de colágeno IV, gelatinas e elastina, mas não afeta a hidrólise de pequenos peptídeos (Collier et al., 1992; Murphy et al., 1994; Shipley et al., 1996). As gelatinases possuem ainda um domínio ligador de colágeno tipo fibronectina (*fibronectin-like collagen-binding domain*) que é responsável pela ligação de ambas as enzimas a gelatina (Collier et al., 1988; Wilhelm et al., 1989) e a MMP-9 tem um domínio a mais do tipo colágeno α_2(IV) (Wilhelm et al., 1989). As gelatinases podem também se ligar, porém sem degradar, ao colágeno tipo IV, gelatina e laminina, presentes no ambiente pericelular (Allan et al., 1995). Elas têm similares substratos específicos, mas são reguladas em diferentes vias e níveis (Stetler-Stevenson, 1990).

Quadro 1.2: Substratos das gelatinases.

Gelatinase	*Substrato*
MMP-2	Colágeno tipo I (Aimes e Quigley, 1995), II, III (Berton et al., 2000), IV (Fessler et al., 1984), V (Fessler et al., 1984), VII (Seltzer et al., 1989), X (Welgus et al., 1990), XI, XIV, XVIII (Ferreras et al., 2000), gelatina tipo I (Collier et al., 1988), decorina (Imai et al., 1997), elastina (Shipley et al., 1996; Mecham et al., 1997), entactina/nidogênio, fibrilina (Ashworth et al., 1999), fibrina, fibrinogênio, fibronectina, fibulina, laminina-5 (γ2) (Giannelli et al., 1997), plasminogênio, tenascina (Siri et al., 1995), vitronectina, aggrecan (Fosang et al., 1992), versican, mielina básica, osteonectina (Sasaki et al 1997), amelogenina (Caron et al., 2001), condroitina sulfato (Krekoski et al., 2002), IGFBP-3 (Fowlkes et al., 1994), pró-IL-1β, IL-1β (Ito et al., 1996), IL-8, pró-TGF-β (Yu e Stamenkovic, 2000), pró-TNF-α, proteína link, substância P, C1q, α1-AC, α1-PI, receptor de FGF 1 (Levi et al., 1996), MCP-3 (McQuibban et al., 2000), SDF-1 (Zhang et al., 2003), adrenomodulina (Martinez et al., 2004), endotelina grande (Fernandez-Patron et al., 1999), LTBP1 (Dallas et al., 2002), galactina-3 (Ochieng et al., 1994), DSPP (Yamakoshi et al., 2006).
MMP-9	Colágeno tipo II (Itoh et al., 2002; Van den Steen et al., 2002), IV (Fessler et al., 1984), V (Fessler et al., 1984), VII (Seltzer et al., 1989), X (Welgus et al., 1990), XI, XIV e XVIII (Ferreras et al., 2000), gelatina tipo I, caseína, decorina, elastina (Shipley et al., 1996; Mecham et al., 1997), fibrilina (Ashworth et al., 1999), fibrina, fibrinogênio, plasminogênio (Patterson e Sang, 1997; Pozzi et al., 2000), vitronectina, aggrecan (Fosang et al., 1992), versican, entactina/nidogênio, ICAM-1 (Fiore et al., 2002), galactina-3 (Ochieng et al., 1994), mielina básica, osteonectina (Sasaki et al 1997), pró-IL-1β (Schonbeck et al., 1998), IL-1β (Ito et al., 1996), IL-2Rα (Sheu et al., 2001), pró-TGF-β (Yu e Stamenkovic, 2000), pró-TNF-α (Gearing et al., 1994), proteína link, proteína P, C1q, α1-PI,α2-M, MCP-2, SDF-1 (McQuibban et al., 2001), LTBP1 (Dallas et al., 2002).

α1-AC: anti-quimiotripsina α1, α1-PI: inibidor de proteinase α1 (*α1-proteinase inhibitor*), α2-M: α2-macroblogulina, C1q: componente complemento (*component complement*), DSPP: sialo fosfoproteína da dentina (*dentin sialophosphoprotein*), ICAM: molécula de adesão intercelular 1 (*intercellular adhesion molecule 1*), IGFBP-3: *insulin-like growth factor binding protein-3*, IL: interleucina, LTBP1: proteína ligadora de latente TGF-β 1 *(latent TGF-β-binding protein-1)*, MCP: proteína quimiotática de monócitos (*monocyte chemoattractant protein*), SDF: Fator derivado de célula estromal 1 *(stromal cell-derived factor-1)*, TGF-β: fator de crecimento tecidual *(tissue growth factor β)*, TNF-α: fator de necrose tecidual *(tissue necrosis factor α)*.

MMP-2

A secreção da MMP-2 tem sido observada em células originárias de todos os folhetos embrionários, além de ser expressa por diversas linhagens de células tumorais. Ela é freqüentemente expressa constitutivamente por células normais e pode sua expressão serregulada ao nível transcricional e pós-transcricional por TGF-β1 (Overall et al., 1991).

Esta enzima pode ser removida da superfície celular por ligar-se a componentes da MEC que apresentam afinidade por certos receptores de membrana específicos, os quais promovem a endocitose e posterior degradação. No caso da MMP-2, isso ocorre pela sua ligação a trombospondina-2 que forma um complexo irreversível que facilita a remoção e *clearance* desta enzima via endocitose mediada por *scavenger receptors* (Yang et al., 2001).

A maioria das pró-MMPs é ativada por proteinases teciduais ou do plasma sanguíneo e, em casos especiais, por proteinases de bactérias, mas a pró-MMP-2 é uma exceção, por não possuir necessariamente o mesmo sítio de clivagem entre o domínio pró-peptídico e o sítio catalítico, como as demais MMPs.

A pró-MMP-2 é ativada ao nível da membrana plasmática (Zucker et al., 1990; Ward et al., 1991) e necessita da TIMP-2 (Strongin et al., 1995; Butler et al., 1998; Kinoshita et al., 1998) e de um componente ligado à superfície celular, a MT1-MMP (Sato et al., 1994; Takino et al., 1995; Will e Hinzmann, 1995). Primeiramente, o complexo ternário ancorado à membrana constituído pelas MT1-MMP/TIMP-2/pró-MMP-2 é formado (Strongin et al., 1995), onde o domínio N-terminal da TIMP-2 se liga ao sítio ativo da MT1-MMP (K_i em escala subnanomolar), enquanto que o seu domínio C-terminal se liga ao domínio C-terminal da pró-MMP-2 (Butler et al., 1998; Overall et al., 1999), com uma aparente K_d 6,6 x 10^{-8} M (Bigg et al., 1997). A observação de que a pró-MMP-2, mas não

o complexo pré-formado MMP-2/TIMP-2, interage e é ativada por preparações contendo frações de membrana plasmática sugerem que a ordem macromolecular da formação do trímero involve a ligação da TIMP-2 com a MT1-MMP antes da associação desta com a pró-MMP-2 (Strongin et al., 1995). Subseqüentemente, a pró-MMP-2 é clivada em um sítio específico do domínio pró-peptídico (Asn^{37}-Leu^{38}) por uma segunda molécula de MT1-MMP e, então, instala-se a forma intermediária da enzima de 64kDa (Atkinson et al., 1995; Kinoshita et al., 1996). Em seguida, a remoção completa do segmento pró-peptídico ocorre através de um processo autoproteolítico auxiliado por outra MMP-2 ativa (Deryugina et al., 2001) e, finalmente, a forma ativa é liberada da superfície celular (Figura 1.4).

Tomazek e colaboradores (1997) verificaram que a actina do citoesqueleto é importante para a ativação da MMP-2, concluindo que a transdução de sinal da MEC e citoesqueleto modulam a ativação da pró-MMP-2, importante para a remodelação tecidual.

Embora este mecanismo tenha sido muito investigado através do complexo formado pela MT1-MMP, as MT-MMPs -2 (Butler et al., 1997), -3 (Takino et al., 1995), -5 (Llano et al., 1999; Pei, 1999) e -6 (Velasco et al., 2000) também podem ativar a pró-MMP-2. Bigg e colaboradores (1997) propuseram que a pró-MMP-2 poderia ser ativada pela MT4-MMP, mas English e colegas (2000) demonstraram que a conclusão deste autor estava equivocada.

O entendimento deste evento pode explicar como a regulação positiva da TIMP-2 acarreta a regulação negativa de MMP-2 já que esta é conhecida por inibir a atividade enzimática das MMP-2 e MT1-MMP *in vitro*. Além da TIMP-2 inibir a MT1-MMP ela também a estabiliza na superfície celular (Sato et al., 1996; Hernandez-Barrantes et al.,

2000). Camundongos MT1-MMP mutantes demonstraram que a ativação da pró-MMP-2 foi severamente suprimida (Zhou et al., 2000).

O domínio hemopexina da MMP-2 pode ainda ligar-se a integrina *αvβ3* (receptor de vitronectina) na superfície celular (Brooks et al., 1996). A precisa função do complexo MMP-2/*αvβ3* no contexto de ligação e ativação da pró-MMP-2 pela MT1-MMP, não está muito claro. Outro potencial mecanismo de localização (indireta) da MMP-2 na superfície celular é a ligação desta a integrina *α2β1* associada ao colágeno tipo I (Steffensen et al., 1998). Com isso, a pró-MMP-2 associada ao complexo *α2β1*/col I pode atuar como uma forma de estocar a pró-enzima que pode ser, posteriormente, ativada pela MT1-MMP. O mecanismo de liberação da pró-MMP-2 do colágeno pericelular é desconhecido, mas a desestabilização das fibrilas de colágeno através da atividade colagenolítica pode desempenhar um papel fundamental neste processo (Ellenbroek e Stack, 1999).

Os substratos da MMP-2 podem alterar sua expressão e a sua ativação, bem como da TIMP-2, como é o caso do colágeno tipo IV, que reduz os níveis protéicos da TIMP-2 e eleva os da MMP-2, mas, não necessariamente, os níveis de transcritos de TIMP-2, MMP-2 e MT1-MMP são afetados durante este processo (Maquoi et al., 2000).

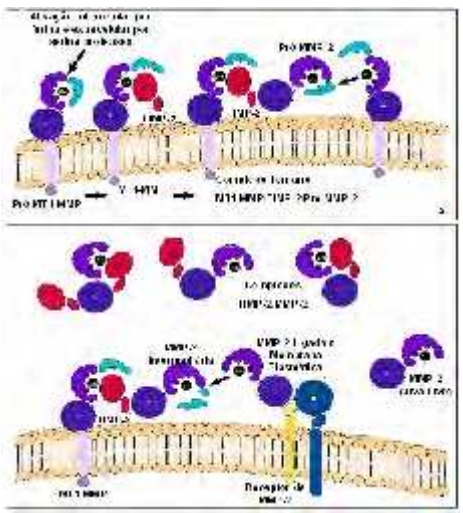


Figura 1.4: *Representação esquemática da ativação da pró-MMP-2 no perímetro pericelular. (A) Inicialmente, a MT1-MMP ancorada a membrana plasmática está ou será ativada e, em seguida, uma TIMP-2 se ligará a ela. Posteriormente, a pró-MMP-2 é secretada para a MEC e ancora-se ao complexo MT1-MMP/TIMP-2 e sua ativação é iniciada. (B) A forma intermediária da MMP-2 é estabelecida e sua completa ativação é efetuada por um processo autoproteolítico auxiliado por uma MMP-2 já ativa ligada a seu receptor de membrana (Adaptado de Sternilich e Werb, 2001).*

A ativação da pró-MMP-2 pode ser também favorecida por células cultivadas em géis tridimensionais de colágeno tipo I (Azzam e Thompson, 1992; Tomasek et al., 1997; Haas et al., 1998; Ellerbroeck et al., 1999), mesmo se a colagenólise e o colágeno desnaturado não sejam requeridos para a sua ativação.

Entretanto, Ellerbrock e colaboradores (2001) demonstraram que *clusters* de integrinas *α3β1* promovem fortemente a ativação da pró-MMP-2, enquanto que os *clusters* de *α2β1* não se mostraram muito efetivos. Eles observaram ainda que os *clusters* de *α2β1* estimulam a expressão da MT1-MMP, e a sua localização próxima a eles e a ativação da pró-MMP-2. Com isso, os autores sugerem que a invasão de matrizes de colágeno tipo I é promovida pela MT1-MMP e MMP-2 e bloqueada por TIMP-2. A pró-MMP-2 pode se ligar ainda a elastina insolúvel e ser totalmente convertida em sua forma ativa independente de seus ativadores proteolíticos (Emonard Hornebeck, 1997).

Teti e colaboradores (1998) verificaram que células GCT23 de tumor de células gigantes humano secretam a MMP-2 e esta é ativada após a sua possível associação a integrina αvβ3 e/ou a seqüência RGD encontrada nestas células. A enzima é ativada por osteopontina, sialoproteína óssea e um peptídeo análogo a seqüência RGD solúveis.

Lee e colaboradores (1997) demonstraram que fibroblastos podem ativar a pró-MMP-2 por outra via. Estas células cultivadas sobre matriz de colágeno a ativam intracelularmente, ao nível do complexo de Golgi, e ela já havia sido anteriormente imunolocalizada neste compartimento celular (Salamonsen et al., 1993).

A pró-MMP-2 pode ser ativada por compostos de mercúrio (por exemplo, p-APMA - *p-aminophenylmercuric acetate*) e sofrer um processo autocatalítico resultando em uma enzima estável e ativa de 62kDa. Embora a ativação da MMP-2 por mercúrio tenha sido caracterizada, existem poucas informações que possam aproximá-la de alguma via fisiológica conhecida (Stetler-Stevenson et al., 1989).

Estudos cinéticos demonstraram que a TIMP-2 liga-se mais rapidamente a MMP-2 do que a TIMP-1 (Willenbrock et al., 1993) e que a pró-MMP-2 liga-se a TIMP-2 formando um complexo não-covalente (Goldberg et al., 1989) e de proporção estequiométrica de 1:1 (Stetler-Stevenson et al., 1989), enquanto que todas as outras MMPs podem se ligar a TIMP-2 somente estando na forma ativa.

MMP-9

A MMP-9 tem sido observada em células mesenquimais, epiteliais e hematopoiéticas, além de diversas linhagens de células tumorais. Sua expressão é induzida por citocinas (Moll et al., 1990; Unemori et al., 1991), fatores de crescimento (Kondapaka et al., 1997) e interações célula-estroma (Himelstein et al., 1994; Heppner et al., 1996; Partridge et al., 1997). Recentemente Lyer e colaboradores (2005) demonstraram que a expressão gênica da MMP-9 pode ser mediada pela integrina *α3β1* através da estabilização do seu mRNA.

A MMP-9 é ativada pelo mecanismo clássico (*cysteine switch*) e por serina proteinasess associadas à membrana celular ou por outras MMPs. Entretanto, sua participação na ativação de outras MMPs é desconhecida.

A pró-MMP-9 pode se ligar a diversos componentes da MEC para o favorecimento ou desfavorecimento da sua ativação. A habilidade da pró-MMP-9 em formar um complexo de alta afinidade com a cadeia colágeno α_2 (IV), sem que haja sua ativação ou internalização, na superfície celular de muitos tipos celulares favorece a concentração desta enzima na interface célula-MEC podendo ser utilizada facilmente quando recrutada ou em contato direto com seu alvo proteolítico (Olson et al., 1998; Toth et al., 1999). Por outro lado, a pró-MMP-9 liga-se a elastina insolúvel e fica protegida da ação proteolítica de muitos dos seus ativadores, tais como a calicreína tecidual, a elastase neutrofílica e

plasmina (Emonard Hornebeck, 1997). Já sua associação à trombospondina 1, uma grande glicoproteína extracelular, diminui o nível de ativação da MMP-9 (Rodriguez-Manzaneque et al., 2001).

Á MMP-9 ativa pode se ligar ao receptor de hialurona na superfície celular (CD44) (Bourguignon et al., 1998) e isto parece estar associado com a promoção da invasão tumoral e angiogênese e pode ainda intermediar a ativação da pró-TGF-β pela enzima ativa (Yu e Stamenkovic, 1999). Além disso, a MMP-9 é co-localizada a integrina *β1* em células endoteliais (Partridge et al., 1997) e com vesículas de membrana enriquecidas com integrinas *β1* em células de câncer de mama (Dolo et al., 1998).

1.3 - Inibidores das Metaloproteinases de Matriz

O balanço entre as MMPs e seus inibidores é um pré-requisito necessário para o funcionamento de eventos fisiopatológicos envolvendo a remodelação da MEC (desenvolvimento, morfogênese, remodelação tecidual, inflamação, doenças degenerativas, crescimento tumoral, invasão e metástase) (Birkedal-Hansen, 1995).

As MMPs podem ser inibidas reversivelmente por seus inibidores fisiológicos (TIMPs) (Bauer et al., 1975), irreversivelmente pela α2-macroglobulina (serina proteinase que é a maior inibidora das MMPs do plasma sanguíneo) (Sottrup-Jensen e Birkedal-Hansen, 1989), pela PZP (*pregnancy zone protein*) (Arbeláez et al., 1997), pelo domínio NC1 (produto da clivagem da extremidade C-terminal do colágeno tipo IV) (Netzer et al., 1998), pela TFPI-2 (*tissue factor pathway inhibitor 2*) (Herman et al., 2001), pela CT-PCPE (*carboxy-terminal fragment of procollagen carboxy-terminal proteinase enhancer*), que apresenta um segmento C-terminal, que tem atividade inibidora de MMPs, com similaridades estruturais com o domínio N-terminal das TIMPs (Mott et al., 2000), pela proteína precursora da β-amilóide ligada a membrana (Miyazaki et al., 1993), pela

trombospondina-2 (Yang et al., 2001) e pela glicoproteína RECK que é o único inibidor das MMPs ancorado à membrana plasmática (Takahashi et al., 1998).

1.3.1 - Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs)

As TIMPs são conhecidas como sendo os inibidores fisiológicos de todos os membros da família das MMPs (TIMPs 1-4). Estas apresentam de 37-51% de homologia na seqüência primária, mas exibem distintos perfis estruturais, propriedades bioquímicas e padrões de expressão (Quadro 1.3). Elas são proteínas pequenas de, aproximadamente, 21 kDa de peso molecular e variavelmente glicosiladas. Estas moléculas são compostas por dois domínios: (I) um domínio N-terminal, com cerca de 125 resíduos de aminoácidos, ligado a um oligosacarídeo/oligonucleotídeo, que representa dois terços da molécula, o grande *three-loop*; e (II) um pequeno domínio C-terminal com cerca de 65 resíduos de aminoácidos, que apresenta uma estrutura secundária rica em folhas β-pregueadas, entretanto, pouco elucidada, o pequeno *three-loop* (Tuuttila et al., 1998; Gomis-Rüth et al., 1997; Williamson et al., 1994). A conformação tridimensional apresenta, então, 6 *loops* formados pelas 12 cisteínas que estabelecem as 6 pontes dissulfeto (Williamson et al., 1990; Murphy et al., 1991).

As TIMPs são proteínas secretadas, mas podem ser encontradas na superfície celular associadas a proteínas de membrana ou associadas a moléculas da MEC (Figura 1.5). Elas podem interagir os seus domínios C-terminal com o domínio hemopexina das pró-MMPs -2, -9 e -3, preferencialmente TIMP-1/MMP-9 (Murphy et al., 1991; Goldberg et al., 1992; Murphy e Willenbrock, 1995; Gomez et al., 1997) e TIMP-2/MMP-2 (Murphy et al., 1991; Olson et al., 1997; Hernandez-Barrantes et al., 2001), formando um complexo inibidor/zimogênio. Esta estrutura favorece um rearranjo intermolecular facilitando a interação do domínio N-terminal da TIMP com o sítio catalítico das enzimas promovendo,

Quadro 1.3: Classificação, propriedades bioquímicas e atuações biológicas das TIMPs.

	TIMP-1	*TIMP-2*	*TIMP-3*	*TIMP-4*
Peso Molecular (kDa)	28	21	24/27	22
Locais de N-glicosilação	2	0	1	0
Localização da Proteína	Solúvel na MEC	Solúvel na MEC e Superfície Celular	Insolúvel na MEC	Solúvel na MEC e Superfície Celular
Associação com pró-MMPs	Pró-MMP-9	Pró-MMP-2	Pró-MMP-9/ Pró-MMP-2	Pró-MMP-2
MMPs inibidas	MMP-9	MMP-2 e MT1-MMP	MMPs -1, -2, -3, -9, -13 e MT1-MMP	MMPs -1, -2, -3, -7, -9 e MT1-MMP
MMPs fracamente inibidas	MT2-MMP MT3-MMP MT5-MMP MMP-19	-	-	-
Inibição de ADAMs	ADAM 10	-	ADAM 12 ADAM 17 ADAM 19 ADAM 10 ADAMTS-1, 4, 5	-
Proliferação Celular	↑ Precursores Eritrocitários ↑ Células Tumorais	↑ Precursores Eritrocitários ↑ Células Tumorais ↑ Fibroblastos ↑ Células de Músculo Liso ↓ Células Endoteliais	↑ Células de Músculo Liso e Células Tumorais*	↑ Células Tumorais de Mama ↓ Células Tumorais de Wilm
Apoptose	↓ Células do Linfoma de Burkitt	↑ Células Tumorais Cólon-retais ↓ Melanoma	↑ Células de Músculo Liso ↑ Células Tumorais ↑ Células do Epitélio Pigmentado da Retina	↑ Fibroblastos Cardíacos
Angiogênese Tumoral	↑ Mama ↓ Fígado	↓ Melanoma ↓ Mama	↓ Melanoma	-
Angiogênese em colágeno 3D/gel de fibrina	Sem efeito	Inibe	Inibe	Inibe
Efeitos Tumorigênicos	Inibe	Inibe	Inibe	Inibe
Efeitos Metastásicos	Estimula	-	-	Estimula

Dados extraídos de: Apte et al., 1995; Sato et al., 1996; Will et al., 1996; Liu et al., 1997; Bigg et al., 1997; Baker et al., 2002; Chirco et al., 2006.

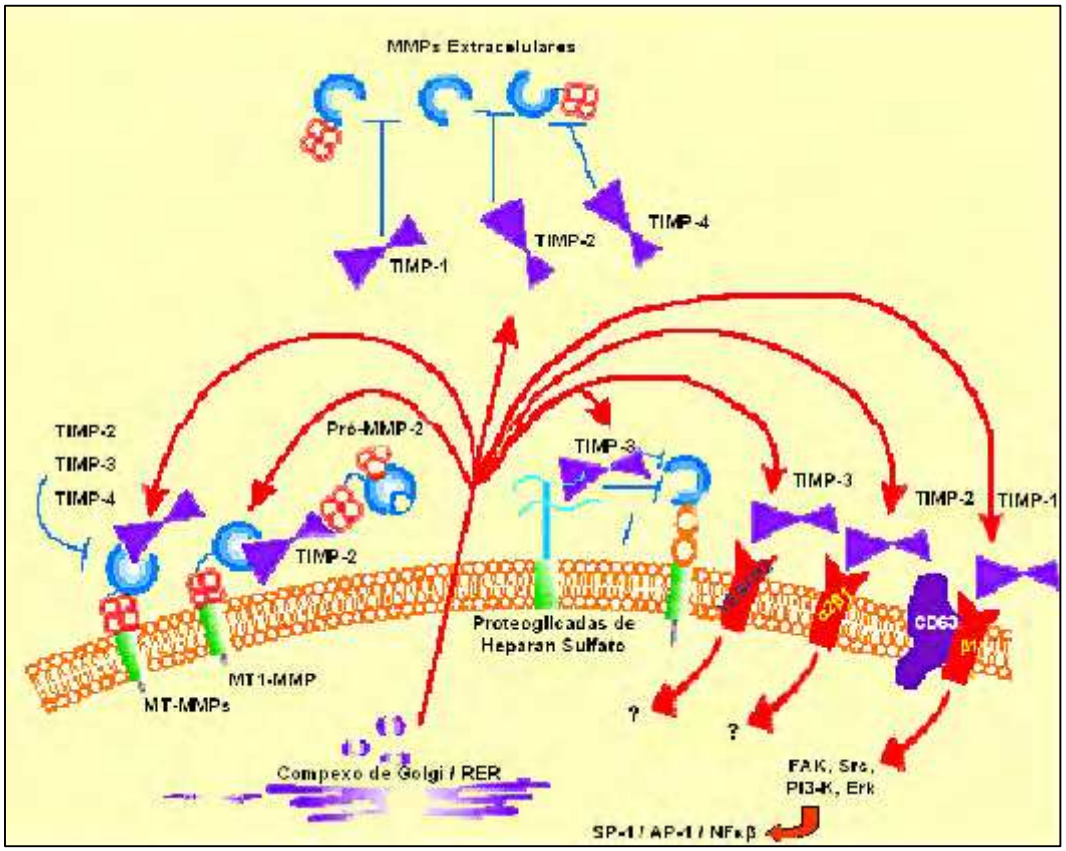


Figura 1.5: *Localização das TIMPs no meio peri e extracelular. As TIMPs podem inibir virtualmente todas as MMPs. TIMP-1 liga-se ao complexo CD63/integrin β1, TIMP-2 a integrina α3β1, TIMP-3 ao receptor de VEGF do tipo 2 (vascular endothelial growth factor receptor-2) e não conhece-se receptores para a TIMP-4. Estes receptores estão diretamente ligados a vias de sinalização intracelulares regulando assim o comportamento celular. TIMP-2 atua conjuntamente com a MT1-MMP como um receptor para a pró-MMP-2 na superfície celular. TIMP-3 é uma proteína da MEC provavelmente associada a proteoglicanas de heparan sulfato (Adaptado de Baker et al., 2002; Seo et al., 2003; Qi et al., 2003; Jung et al., 2006).*

assim, a inibição das pró-MMPs (Nguyen et al., 1994; Itoh et al., 1995; Wojtowicz-Praga et al., 1997). As TIMPs podem ainda inibir as MMPs ativas pela interação direta e forte (K_i menores de 1nM), não-covalente e reversível, do domínio N-terminal da TIMP com o átomo de zinco do sítio catalítico da enzima (Gomis-Rüth et al., 1997), resultando na formação de um complexo de alta afinidade de proporção estequiométrica de 1:1 (Cawston et al., 1981, 1983; Welgus et al., 1985; Okada et al., 1986; Murphy et al., 1987; Gomez et al., 1997). Este mecanismo foi demonstrado pela capacidade do domínio N-

terminal isolado das TIMPs em formar um complexo estável com propriedades inibitórias contra as MMPs (Murphy et al., 1991; Kleiner et al., 1992; DeClerck et al., 1993; Willenbrock et al., 1993; Huang et al., 1996).

As TIMPs podem ser reguladas ao nível da transcrição (Overall et al., 1991) e por eventos pós-traducionais. As TIMPs podem ser inibidas na MEC por diversas proteínas relacionadas a eventos biológicos específicos.

As TIMPs podem ser reguladas também na MEC pela sua degradação por proteinases, tais como catepsinas, bloqueando, então, sua atividade inibitória sobre as MMPs (Kostoulas et al., 1999). Okada e colaboradores (1988) demonstraram que a elastase neutrofílica, a tripsina e α-quimiotripsina destroem a atividade inibitória da TIMP-1 em relação a MMP-3 por clivarem a molécula em pequenos fragmentos em polpas dentárias bovinas inflamadas.

As TIMPs podem ter várias funções incluindo a ativação e inibição da atividade enzimática das MMPs, bem como funções independentes das MMPs. Muitos estudos têm avaliado a influência destas proteínas no comportamento celular, tais como: angiogênese (Moses e Langer, 1991), crescimento celular, apoptose (Guedez et al., 1998; Boudreau et al., 1995), migração (Mignatti et al., 1986) e diferenciação celulares (Baker et al., 2002).

TIMP-1

TIMP-1 foi primeiramente identificada por sua atividade eritróide (propriedades tipo fator de crescimento) (Gasson et al., 1985) e, subseqüentemente, como um agente que estimula o crescimento celular em várias linhagens celulares (Bertaux et al., 1991; Hayakawa et al., 1992). Ela é produzida por muitos tipos celulares e sua expressão parece estar altamente relacionada ao estímulo-resposta como, por exemplo, ao soro,

FGF, PDGF, EGF, TGF-β, membros da família do IL-6 e IL-1, retinóides, progesterona e ésteres de forbol (Denhardt et al., 1993).

Sua expressão parece ser regulada negativamente por dexametasona e existem evidências que sua expressão é também regulada indiretamente pelo oncogene *ras* (Tuck et al., 1991; Leco et al., 1992).

TIMP-2

TIMP-2 foi inicialmente isolada de células de melanoma (Stetler-Stevenson et al., 1989), também exerce atividade eritróide como a TIMP-1 (Stetler-Stevenson et al., 1992), estimula o crescimento de diversos tipos celulares (Hayakawa et al., 1994), inclusive fibroblastos (Corcoran e Stetler-Stevenson, 1995). Esta proteína é produzida constitutivamente por uma grande variedade de células e, geralmente, não apresenta resposta à atuação de citocinas. Entretanto, quando sua expressão é regulada, ela apresenta um perfil diferente das TIMPs -1 e -3, ou seja, a expressão é reprimida pelo TGF-β em vários tipos celulares.

Ela pode ser encontrada em sua forma livre ou ligada a MMP-2 (Goldberg et al., 1989; Blavier e DeClerck, 1997). Virtualmente ela pode inibir todas as MMPs em concentrações da ordem nanomolar, onde ela forma o complexo inibidor/zimogênio (Fernandez-Catalan et al., 1998).

Animais mutantes para TIMP-2 não apresentam anormalidades anatômicas ou microscópicas e não perderam a capacidade reprodutiva, entretanto a ativação da pró-MMP-2 foi muito comprometida (Caterina et al., 2000a), indicando que a sua função fisiológica especializada é a ativação da MMP-2 (Wang et al., 2000), já que estes animais apresentaram o mesmo fenótipo dos animais mutantes para a MMP-2 (Itoh et al., 1997).

1.3.2 - RECK (***Re****version-Inducing-****C****ysteine- Rich Protein with* ***K****azal Motifs*)

O gene *RECK* foi inicialmente identificado pela capacidade de induzir a reversão fenotípica de uma linhagem de fibroblastos de camundongo (NIH-3T3) transformada pelo oncogene *RAS* ativado (transformação *v*-Ki-*RAS*) (Takahashi et al., 1998). Este gene é altamente expresso em diversos órgãos humanos e em camundongos (Nutall et al., 2004), mas baixa ou indetectável expressão em linhagens celulares tumorais, além de poder ser regulado negativamente por diversos oncogenes, incluindo o *Ras* e *myc* (Takahashi et al., 1998; Sasahara et al., 1999a, 1999b, Sasahara et al., 2002).

RECK codifica uma glicoproteína que apresenta uma seqüência primária de 971 aminoácidos, deduzida a partir do cDNA humano, com 93% dos aminoácidos idênticos à seqüência de camundongos, cerca de 9,2% de resíduos de cisteína, apresenta regiões hidrofóbicas em ambas as extremidades amino e carboxi-terminais e peso molecular de 110 kDa (forma glicosilada) ou 100 kDa (forma deglicosilada). Seu ancoramento à membrana plasmática é dado pelo domínio GPI, com 29 resíduos de aminoácidos presentes na extremidade C-terminal (Low, 1989). Já a extremidade N-terminal, que representa um terço da proteína, com 26 resíduos de aminoácidos, que atuam como um peptídeo sinal (Neurath, 1989), 5 domínios de cisteína (C_2-X_{7-8}-C-X_3-C-X_{12-22}-C-X_{9-12}-C, resíduos 37-84, 104-141, 151-197, 216-263 e 292-338) e 5 potenciais sítios de glicosilação (asparaginas nas posições 39, 86, 200, 297 e 352). A região central da glicoproteína contém 3 domínios tipo inibidor de serina proteinase (*serine-protease inhibitor-like domains*): o primeiro domínio (resíduos 635-654) apresenta a seqüência completa do domínio Kazal (C-X_7-C-X_6-Y-X_3-C-$X_{2,3}$-C) (Laskowski e Kato, 1980); enquanto que o segundo (resíduos 716-735) e o terceiro domínios (resíduos 754-772) apresentam a seqüência incompleta do domínio Kazal. Existem ainda 2 regiões (resíduos 493-523 e 676-709) que apresentam homologia com repetições tipo fator de crescimento epidermal

(*EGF-like repeats*). A representação esquemática da estrutura primária da glicoproteína esta mostrada na Figura 1.6.

RECK é um inibidor exclusivo das MMPs -2 (Takahashi et al., 1998), -9 e MT1-MMP (Oh et al., 2001; Sasahara et al., 2002) *in vitro* e *in vivo* (Figura 1.7). O exato mecanismo molecular envolvido na regulação da secreção das MMPs e/ou da regulação da atividade enzimática por RECK ainda permanecem sem resposta, mas interações diretas proteína-proteína são requeridas, entretanto a estequiometria envolvida nestes eventos é desconhecida. Camundongos *knockout* para RECK (*RECK*$^{-/-}$ e *RECK*$^{+/-}$) demonstraram que dois terços dos embriões homozigotos para a mutação morreram aos 10,5 dias de vida intra-uterina (E10,5) e o um terço restante não ultrapassou os 11,5 dias de vida (E11,5). Estes animais apresentaram tamanho e integridade estrutural reduzidos e hemorragia abdominal intensa.

A análise histológica revelou que os tecidos mesenquimais apresentaram severo desarranjo na arquitetura tecidual, anormal organogênese principalmente ao nível da angiogênese, pois o sistema vascular foi formado, mas as células endoteliais não eram capazes de formar túbulos.

Além disso, estes animais apresentaram altos níveis de MMP-2 ativa, entretanto, a pró-MMP-9 não foi detectada, e intensa degradação da MEC, principalmente na redução significativa de colágeno tipo I, comparado aos níveis em mutantes heterozigotos ou em

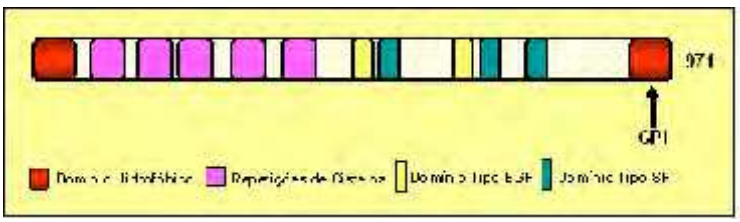


Figura 1.6: *Representação esquemática da estrutura primária da glicoproteína RECK. GPI: glicosilfosfatidilinositol (Adaptado de Takahashi et al., 1998).*

indivíduos normais. Camundongos com dupla mutação para RECK/MMP-2 (*MMP-2*$^{-/-}$ *e RECK*$^{-/-}$) sobreviveram 1 dia a mais que os animais *RECK*$^{-/-}$e apresentaram perfil anatômico e histológico parecidos, mas menos severos.

Com isso, muitas evidências sugerem que a desregulação das MMPs pode ter colaborado, em grande parte, para o fenótipo encontrado em camundongos *RECK*$^{-/-}$. Em camundongos normais (E10,5), RECK foi detectado em células ao redor de vasos sanguíneos (mais em células murais do que em células endoteliais), alta expressão ao redor do tubo neural e moderada no mesênquima e nos somitos, justamente no tecidos mais afetados nos animais *RECK*$^{-/-}$ (Oh et al., 2001).

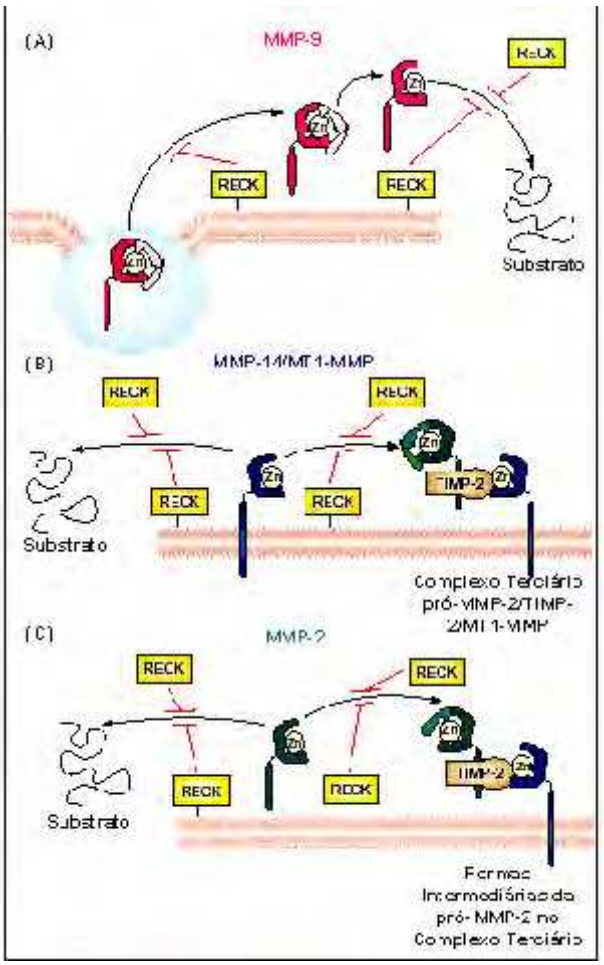


Figura 1.7: *Regulação das MMPs pela glicoproteína RECK. (A) A secreção da pró-MMP-9 para a MEC e bloqueada pela proteína RECK por um mecanismo ainda não elucidado. Além disso, o RECK, na forma solúvel ou ancorada à membrana, inibe a atividade catalítica da MMP-9 ativa; (B) A forma ativa da MT1-MMP também tem sua atividade catalítica inibida pela forma solubilizada ou ancorada à membrana do RECK, e, também, limitando o estágio inicial de ativação da pró-MMP-2 quando esta está complexada com a TIMP-2 e MT1-MMP; (C) A proteína RECK inibe a atividade catalítica da MMP-2 ativa bem como o processo final de ativação autoproteolítica da MMP-2 intermediária (Adaptado de Rhee e Coussens, 2002).*

A descoberta de que o colágeno tipo I é a proteína mais afetada em animais *RECK*$^{-/-}$ e que camundongos homozigotos mutantes para o gene do *colágeno α1(I)* também morrem *in utero* pela ruptura de grandes vasos sanguíneos (Lohler et al., 1984), sugere que RECK pode ser um regulador da remodelação da MEC através do controle da via de sinalização de Ras. Camundongos *knockout* para GAP, um regulador negativo de Ras, apresentam defeitos similares durante a angiogênese embrionária (Henkemeyer et al., 1995).

Camundongos *knockout* para GAP, um regulador negativo de Ras, apresentam defeitos similares durante a angiogênese embrionária (Henkemeyer et al., 1995). A via de Ras estimula a produção de MMPs enquanto regula negativamente RECK, fato que também suporta a hipótese de que o controle deste circuito é importante para a angiogênese (Noda et al., 2003) (Figura 1.8). Recentemente, Echizenya e colaboradores (2005) demonstraram que RECK está envolvido no desenvolvimento muscular através da regulação de MMPs em mioblastos.

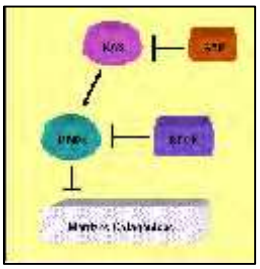


Figura 1.8: *Regulação das MMPs e RECK pela via de Ras. Ras estimula a expressão das MMPs, favorecendo assim a degradação da MEC. Por outro lado, Ras suprime a expressão de RECK. GAP é um regulador negativo de Ras, favorecendo a preservação da MEC (Adaptado de Noda et al., 2003).*

1.4 – Desenvolvimento Crânio-Facial

O complexo crânio-facial é anatomicamente a parte do corpo mais sofisticada e, para funcionar, requer uma integração organizada do viscerocrânio e neurocrânio, sistemas nervoso central e periférico, músculos faciais, tecido conjuntivo, vasculatura e a derme (revisado por Trainor, 2005).

Células da crista neural (CCN) são populações de células-tronco que migram em estágios iniciais do desenvolvimento crânio-facial e contribuem para a formação da condensação do mesênquima oral, papila dentária, odontoblastos, matriz dentinária, polpa, cemento, ligametos periodontais, condrócitos da cartilagem de Meckel e mandíbula (Chai et al., 2000). A regulação inicial do momento e local onde a formação da cartilagem, ossos e dentes devem ocorrer parece ser controlada por sinais indutivos do epitélio mandibular oral em camundongos de E9-E11 e a sua interação com o mesênquima subjacente (Hall, 1991; Hall et al., 1991; Imai et al., 1996; Kollar e Mina, 1997).

Diversos estudos têm mostrado que as MMPs desempenham um papel fundamental na morfogênese de estruturas derivadas do epitélio (sulco oral), mesoderma dos somitos (língua) e da crista neural (cartilagem de Meckel), bem como seus inibidores (Werb e Chin, 1998).

Avanços nas técnicas de microdissecção, biologia molecular, determinação dos estágios do desenvolvimento embrionário de camundongos e cultura de órgãos *in vitro* provêm à oportunidade de investigar quando, onde e como ocorrem as induções da formação de cartilagens, osso e dentes.

1.4.1 - Odontogênese

A odontogênese é um complexo processo que tem como mecanismo central às interações seqüenciais e recíprocas entre o ectoderma e o mesoderma e que ocorre de forma semelhante em todos os organismos. No início da formação do germe dentário, a camada ectodérmica forma uma placa celular que cresce em direção ao mesênquima, derivado da crista neural. O epitélio sinaliza ao mesênquima que, então, começa a se condensar em contato com o brotamento epitelial (fase de broto). Subseqüentemente, o epitélio dobra-se (nó-do-esmalte primário) e cresce ao redor da papila dentária (fase de

capuz). A morfologia final do dente, isto é, a formação das cúspides dentárias (nó-do-esmalte secundário), torna-se visível durante a fase de sino ou campânula, onde as células formadoras de tecido duro (odontoblastos e ameloblastos) se diferenciam na interface entre o epitélio e o mesênquima e depositam a matriz da dentina e do esmalte, respectivamente (Figura 1.9) (revisado por Thesleff, 2003).

A dentina de dentes de mamíferos é recoberta por dois tecidos mineralizados distintos. O esmalte recobre a dentina na porção coronal do dente e não contém colágeno, enquanto que o cemento, um tecido mineralizado baseado em colágeno, forma-se ao longo da raiz. O esmalte é formado por ameloblastos que se diferenciaram do epitélio interno do esmalte. A origem dos cementoblastos, entretanto, é menos clara. Acredita-se que os cementoblastos diferenciam-se de células do folículo dentário o qual é derivado de células da crista neural (Cho e Garant, 1996). Entretanto, sugere-se também que células da bainha epitelial de Hertwig, a extensão apical do órgão do esmalte, pode sofrer transformação epitélio-mesenquimal e dar origem aos cementoblastos (Thomas e Kollar, 1988; Bosshardt e Schroeder, 1993; MacNeil e Tomas, 1993; Bosshardt e Schroeder, 1996; Bosshardt e Nanci, 1997).

A primeira evidência de que as MMPs estavam envolvidas na formação dos tecidos mineralizados do dente ocorreu em 1979 com a descoberta de que o EDTA, conhecido quelante de íons metálicos, inibia significantemente a atividade proteolítica das proteínas extraídas do esmalte (Moe e Birkedal-Hansen, 1979).

Em seguida, esta inibição pelo EDTA foi atribuída a uma classe de enzimas, as metaloproteinases (Overall e Limeback, 1988). Subsequentemente, estudos demonstraram que diversas enzimas inibidas por EDTA estavam presentes na matriz do esmalte (DenBesten e Heffernan, 1989). Com isso, o estudo da participação das MMPs e seus inibidores na odontogênese foi muito grande na década de 80 e continua em

ascensão, bem como o estudo dos seus inibidores (Quadros 1.4 e 1.5). Recentemente, RECK foi detectado em germes dentários e em ameloblastomas humanos (Kumamoto e Ooya, 2006), mas não foi ainda temporal e espacialmente estudado no desenvolvimento dos germes dentários em camundongos.

1.4.1.1 - Formação do Esmalte (Amelogênese)

O esmalte é uma estrutura mineralizada de origem epitelial que forma uma cobertura protetora ao nível da coroa dentária. A formação do esmalte resulta de uma complexa seqüência de eventos celulares e extracelulares que são executados em duas etapas intimamente ligadas: (a) a síntese de uma matriz orgânica (fase secretora) e, em seguida, (b) a sua remoção e deposição da matriz inorgânica (fase de maturação). Sua forma madura apresenta uma taxa de mineralização muito elevada (cerca de 95%), que a torna a estrutura mais dura do organismo, e é particularmente diferente dos outros tecidos

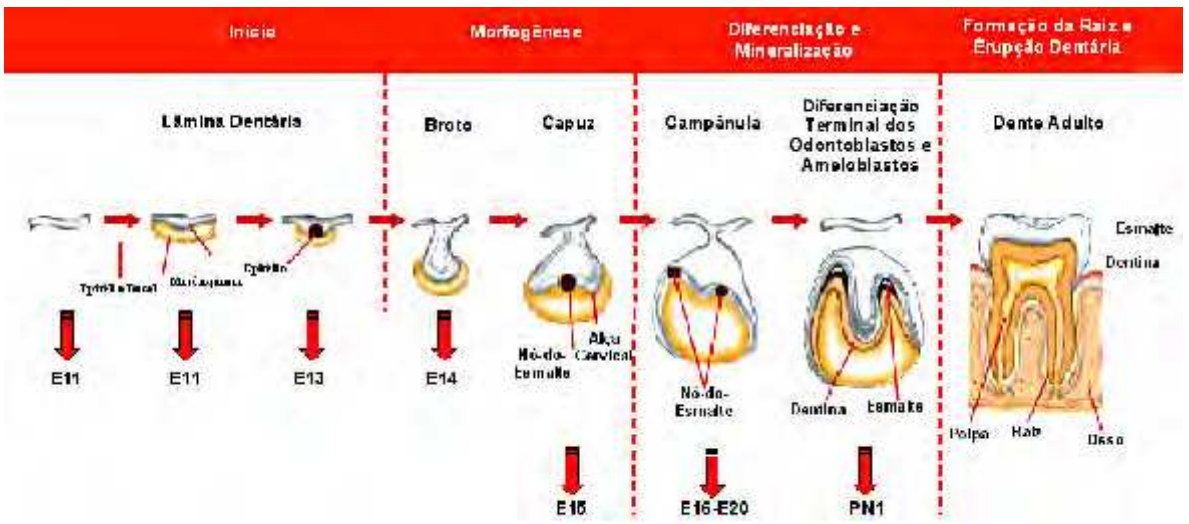


Figura 1.9: *Representação esquemática das etapas da odontogênese durante o desenvolvimento embrionário (Adaptado de Thesleff, 2003).*

Quadro 1.4: Fenótipos encontrados em animais normais, *knockout*, mutantes ou em modelos de doenças genéticas humanas para as MMPs durante a odontogênese.

MMP	Camundongo	Camundongo Knockout	Humanos	Outras Espécies
1	-	-	Altos níveis detectados em polpas inflamadas em relação a polpas sadias (Shin et al., 2002). mRNA detecatado em Od e nas células da polpa *in vitro* (Palosaari et al., 2003). mRNA detectado em polpas sadias e com cárie (Sulkala et al., 2004). mRNA expresso após stress mecânico em fibroblastos do ligamento periodontal *in vitro* (Bolcato-Bellemin et al., 2000; Redlich et al., 2004). Altas concentrações no FCG após movimentação ortodôntica (Cantarella et al., 2006).	Boi: mRNA localizado em od durante a reabsorção radicular (Okamura et al., 1993). Rato: mRNA detectado em F, Cb, Cc, oc e Ob durante a reabsorção radicular após movimentação ortodôntica (Domon et al., 1999). Cão: níveis de mRNA aumentados nas células do ligamento periodontal após movimentação ortodôntica (Redlich et al., 2001). Rato: Na fase de capuz, expressa no EO, LD, OE (EEOE e EIOE) e no mesênquima. Já no início da fase de campânula, moderadamente expressa no EIOE, MB e pOd em diferenciação e fraca na PD. No final desta fase, expressão na pD e Od e fraca no EIOE (Randall e Hall, 2002).
2	mRNA localizado no mesênquima dentário, FD, PD e na MB em molares. Transiente expressão observada no EIOE no final da fase de secreção e início da fase de campânula. Altos níveis foram detectados em Od secretores no início da deposição da matriz (Sahlberg et al., 1992). mRNA encontrado principalmente no mesênquima (Sahlberg et al., 1999). Imunolocalizada no EO e mesênquima nas fases de broto e capuz e no EE e EIOE e EO durante a fase inicial de campânula. No final desta fase, marcação próxima ao NES e A e AC (Yoshiba et al., 2003). Sua inibição por inibidores sintéticos (marimastat) aumenta a camada de pD e diminui a mineralização da D em GD (E18) *in vitro* (Fanchon et al., 2004) e também causa alterações na formação da D e E (Bourd-Boittin et al., 2005).	-	Imunolocalizada na PD, Od secretores e no EIOE durante o final da fase de capuz e início da fase de campânula. Pode estar participando da degradação da JAD (Heikinheimo e Salo, 1995). Expressa por Od *in vitro* (Tjarderhane et al., 1998a). Expresso em células do epitélio gengival do sulco em pacientes com periodontite adulta e juvenil (Tervahartiala et al., 2000). mRNA expresso após stress mecânico em F do ligamento periodontal *in vitro* (Bolcato-Bellemin et al., 2000) e enzima ativa detectada (Von den Hoff, 2003). Baixa detecção em polpas inflamadas (Gusman et al., 2002). Detectada mais em polpas inflamadas do que em polpas sadias (Shin et al., 2002). mRNA detectado cerca de 9x mais em Od do que nas células da polpa *in vitro* (Palosaari et al., 2003). mRNA detectado em polpas sadias e com cárie (Sulkala et al., 2004). Altas concentrações no FCG após movimentação ortodôntica (Cantarella et al., 2006).	Rato: Enzima ativa no EO e GD (E18) (Abiko et al., 1999). Porco: Expressa na membrana dos A e Od (Caron et al., 2001). Rato: Imunlocalizada na fase de broto, fracamente localizada no EO e na LD, enquanto que sua expressão aumenta durante a IE e no mesênquima subjacente em condensação. No início da fase de campânula, intensa marcação no EIOE e fraca nos pOd e na PD. Já no final desta fase, expressa nos pOd, mais intensa nos Od diferenciados e presente também na matriz da pD. O EIOE foi fracamente marcado enquanto que a marcação aumentou com o início do seu alongamento. O osso em desenvolvimento em torno dos GD também foi imunopositivo (Randall e Hall, 2002). Rato: Expressão das formas latente e ativa aumenta em GD animais recém-nascidos até 15D e localizada principalmente na PD (Cotrim et al., 2002). Rato: mRNA localizado em Ob e oc em torno da cúspide em erupção em animais com 1 semana de vida. Expressão nos F do ligamento periodontal, Od, Cb e Cc em animais com 3 semanas de vida (Maruya et al., 2003). Rato: níveis de mRNA aumentados nas células do ligamento periodontal após movimentação ortodôntica (Takahashi et al., 2006).
3	Sua inibição por inibidores sintéticos (marimastat) aumenta a camada de pD e diminui a mineralização da D em GD (E18) *in vitro* (Fanchon et al., 2004).	-	Identificado em CE, F gengivais, células tipo-macrófago e monócitos em tecidos periodontais adultos e em pacientes com periodontite juvenil (Tervahartiala et al., 2000). Baixa detecção em polpas inflamadas (Gusman et al., 2002).	Rato: Imunolocalização na fase de broto, fraca no EO, LD e no GD e mais intensa no mesênquima subjacente em condensação. Na fase de capuz, expressão fraca no EO, LD, RE, OE, NES e PD. No início da fase de campânula, moderada marcação no EIOE e pOd e fraca na PD. No final

			Altos níveis detectados em polpas inflamadas em relação a polpas sadias (Shin et al., 2002). mRNA detectado em polpas sadias e com cárie (Sulkala et al., 2004).	desta fase, moderada expressão nos Od recém diferenciados e na matriz da pD (Randall e Hall, 2002).
7	-	-	Expresso em células do epitélio gengival do sulco e em F em pacientes com periodontite adulta e juvenil (Tervahartiala et al., 2000). mRNA detecatado em Od *in vitro* (Palosaari et al., 2003).	-
8	-	-	Regulada negativamente por TGF-β em Od *in vitro* (Palosaari et al., 2000). Expresso em células do epitélio gengival do sulco e em neutrófilos em pacientes com periodontite adulta e juvenil (Tervahartiala et al., 2000). Imunolocalizada em polpas inflamadas e nos tecidos periapicais (Wahlgren et al., 2002). mRNA detecatado em Od *in vitro* (Palosaari et al., 2003). mRNA detectado em polpas sadias e com cárie (Sulkala et al., 2004). Altas concentrações no FCG após movimentação ortodôntica (Apajalahti et al., 2003; Ingman et al., 2005). Imunolocalizada na D (Sulkala et al., 2007).	Rato: Envolvida na remodelação do periodonto durante a erupção dentária (Tsubota et al., 2002). Rato: mRNA localizado em Ob, oc em torno da cúspide em erupção em animais com 1 semana de vida. Expressão nos F do ligamento periodontal, Od, Cb e Cc em animais com 3 semanas de vida (Maruya et al., 2003). Rato: níveis de mRNA aumentados nas células do ligamento periodontal após movimentação ortodôntica (Takahashi et al., 2003).
9	mRNA encontrado principalmente no mesênquima (Sahlberg et al., 1999). Imunolocalizada no EO e mesênquima nas fases de broto e capuz e no EE e EIOE e EO durante a fase inicial de campânula. No final desta fase, marcação próxima ao NOS e A e na AC (Yoshiba et al., 2003). Sua inibição por inibidores sintéticos (marimastat) aumenta a camada de pD e diminui a mineralização da D em GD (E18) *in vitro* (Fanchon et al., 2004) e também causa alterações na formação da D e E (Bourd-Boittin et al., 2005).	Aumento da expressão em Oc do OA durante a erupção dentária em animais catepsina K *knockout* (Okaji et al., 2003).	mRNA detectado no dente em desenvolvimento (Heikinheimo e Salo, 1995). Expressa por Od *in vitro* (Tjarderhane et al., 1998a). Regulada positivamente por TGF-β em Od *in vitro* (Tjarderhane et al., 1998b). Alta detecção em polpas inflamadas (Gusman et al., 2002). mRNA detectado em Od e nas células da polpa *in vitro*. Regulada positivamente por TGF-β1 sozinha ou combinada com BMP-2 nos Od (Palosaari et al., 2003). Enzima ativa detectada em cultura de fibroblastos derivados do ligamento periodontal após stress mecânico (Von den Hoff, 2003). mRNA detectado em polpas sadias e com cárie (Sulkala et al., 2004).	Rato: Imunlocalização na fase de broto, fraca marcação na PD e intensa no EO e do GD e no mesênquima subjacente em condensação. Na fase de capuz, moderada expressão no EIOE e EEOE, NEP, PD e intensa na LD. No início da fase de campânula, localizada no EIOE e pOd e fraca na PD. No final desta fase, fraca marcação no EIOE e moderada nos Od diferenciados e na matriz da pD (Randall e Hall, 2002). Boi: mRNA localizado em od presentes no OA durante a reabsorção radicular (Lisunwanont et al., 2002). Rato: níveis de mRNA aumentados nas células do ligamento periodontal após movimentação ortodôntica (Takahashi et al., 2006). Rato: menos expressa por Oc de animais tratados com anti-inflamatórios não-esteróides (tetraciclinas) e após movimentação ortodôntica (Bildt et al., 2006).
10	-	-	mRNA detectado cerca de 9x mais em Od do que nas células da polpa *in vitro* (Palosaari et al., 2003).	-
11	-	-	mRNA detectado cerca de 9x mais em Od do que nas células da polpa *in vitro* (Palosaari et al., 2003). mRNA detectado em polpas sadias e com cárie (Sulkala et al., 2004).	-
12	-	-	mRNA detectado em polpas sadias e com cárie (Sulkala et al., 2004).	-
13	-	-	Expresso em células do epitélio gengival do sulco	Rato: mRNA localizado em Ob e oc em torno da

			e em F em pacientes com periodontite adulta e juvenil (Tervahartiala et al., 2000). mRNA detectado mais nas células da polpa do que em Od *in vitro* (Palosaari et al., 2003). Altos níveis de mRNA em polpas sadias e com cárie e a proteína presente em ambos os casos (Sulkala et al., 2004).	cúspide em erupção em animais com 1 semana de vida (Maruya et al., 2003). Rato: níveis de mRNA aumentados nas células do ligamento periodontal após movimentação ortodôntica (Takahashi et al., 2003).
14	Imunolocalizada no EO e mesênquima nas fases de broto e capuz e no EE e EIOE e EO durante a fase inicial de campânula. No final desta fase, marcação próxima ao nó-do-esmalte-secundário e A e na alça cervical. O mRNA foi localizado no EO, mesênquima e na osteóide na fase de broto e capuz, no EE e EIOE, PD, alça cervical e OA na fase de campânula inicial e em A e Od no final desta fase (Yoshiba et al., 2003).	MMP-20$^{-/-}$ apresentam as raízes dentárias subdesenvolvidas e os molares não são erupcionados. A formação óssea próxima às raízes também foi retardada, mas alterações ao nível das cúpides não foram identificadas (Beertsen et al., 2002, 2003; Bartlett et al., 2003).	mRNA expresso por Od e células da polpa e regulado negativamente por BMP-2 e/ou TGF-β *in vitro* (Palosaari et al., 2002). mRNA detectado cerca de 9x mais em Od do que nas células da polpa *in vitro* (Palosaari et al., 2003). Imunolocalizada fortemente no EE e EIOE e fracamente no EI e RE de GD. Intensa em ameloblastomas foliculares e menos em ameloblastosmas de células granulomatosas (Kumamoto e Ooya, 2006).	Porco: Expressa na membrana dos A e Od (Caron et al., 1998).
15	-	-	mRNA detecatado em Od e nas células da polpa *in vitro* (Palosaari et al., 2003). mRNA detectado em polpas sadias e com cárie (Sulkala et al., 2004).	-
16	-	-	mRNA detecatado em Od e nas células da polpa *in vitro* (Palosaari et al., 2003). mRNA detectado em polpas sadias e com cárie (Sulkala et al., 2004).	-
17	-	-	mRNA detectado mais nas células da polpa do que em Od *in vitro* (Palosaari et al., 2003). mRNA detectado em polpas sadias e com cárie (Sulkala et al., 2004).	-
19	-	-	mRNA detecatado em Od e nas células da polpa *in vitro* (Palosaari et al., 2003).	-
20	mRNA localizado em Od no início da secreção da pD e após a mineralização (Bégue-Kirn et al., 1998). mRNA localizado em Od (Caterina et al., 2000b). mRNA foi localizado em Od, A e no EI no final da fase de campânula e durante a mineralização. No mesmo período, a enzima foi imunolocalizada em Od e A (Ac policlonas) e no E em desenvolvimento e na matriz dentinária (Ac monoclonal) (Väänänen et al., 2004). Sua inibição por inibidores sintéticos (marimastat) aumenta a camada de pD e diminui a mineralização da D em GD (E18) *in vitro* (Fanchon et al., 2004) e também causa alterações na formação da D e E (Bourd-Boittin et al., 2005).	Animais apresentam o fenótipo de amelogênese imperfeita (Caterina et al., 2002).	Regulada negativamente por TGF-β em Od *in vitro* (Tjarderhane et al., 2000). Não imunolocalizada na D, expressa por A e transiente em Od em tumores odontogênicos (Takata et al., 2000). Imuno-localizada em Od radiculares normais e nos túbulos dentinários em casos de cárie. Proteína presente em Od e nas células da polpa em dentes sadios ou com cárie (Sulkala et al., 2002). mRNA detectado cerca de 9x mais em Od do que nas células da polpa *in vitro*. TGF-β1 ou BMP-2 não afetam os níveis de mRNA (Palosaari et al., 2003). Mesmo perfil encontrado em camundongos (Väänänen et al., 2004).	Porco: enzima clonada e purificada da matriz do E (Bartlett et al., 1996). Porco: produzida por A os quais a transportam em vesículas secretoras (Fukae et al., 1998).
23	-	-	mRNA detecatado em Od e nas células da polpa	-

			in vitro (Palosaari et al., 2003).	
24	-	-	mRNA detecatado em Od *in vitro* (Palosaari et al., 2003).	-
25	-	-	mRNA detecatado em Od *in vitro* (Palosaari et al., 2003).	-

Quadro 1.5: Fenótipos encontrados em animais normais, *knockout*, mutantes ou em modelos de doenças genéticas humanas para as TIMPs durante a odontogênese.

TIMP	Camundongo	Humanos	Outras Espécies
1	mRNA encontrado principalmente no mesênquima (Sahlberg et al., 1999). Imunolocalizada na MB, no mesênquima e EO da fase de broto, no NOP, PD e EO na fase de capuz, EE e EIOE, PD e EO na fase inicial de campânula e na MB da alça cervical no final desta fase. O mRNA foi localizado na osteóide e no GD na fase de broto e capuz, no EO, AO e EI e EEOE no início da fase de campânula e no NES, Od e AO no final desta fase (Yoshiba et al., 2003).	mRNA detecatado em Od e nas células da polpa *in vitro* (Palosaari et al., 2003). mRNA detectado em polpas sadias e com cárie (Sulkala et al., 2004).	Rato: mRNA localizado em Ob, oc em torno da cúspide em erupção em animais com 1 semana de vida. Expressão nos F do ligamento periodontal, Od, Cb e Cc em animais com 3 semanas de vida (Maruya et al., 2003).
2	mRNA encontrado principalmente no mesênquima (Sahlberg et al., 1999). Imunolocalizado na MB do GD e mesênquima ósseo na fase de broto, NOP e EO na fase de capuz, no EE e EIOE EO e alça cervical na fase inicial de campânula e a matriz do E após o nascimento. O mRNA foi localizado no GD e PD na fase de broto e capuz, no EO, PD, EI e EEOE no início da fase de campânula e no EO, NES, Od e A no final desta fase (Yoshiba et al., 2003).	mRNA detecatado em Od e nas células da polpa *in vitro* (Palosaari et al., 2003). mRNA detectado em polpas sadias e com cárie (Sulkala et al., 2004).	Rato: mRNA localizado em Ob, oc em torno da cúspide em erupção em animais com 1 semana de vida. Expressão nos F do ligamento periodontal, Od, Cb e Cc em animais com 3 semanas de vida (Maruya et al., 2003).
3	mRNA encontrado no EO (Sahlberg et al., 1999). Imunolocalizado na MB do GD e CE na fase de broto, na MB do GD, CE, EI e EEOE na fase de capuz, na alça cervical, NOS, EI e EEOE, EO na fase inicial de campânula e nos pA no final desta fase. mRNA foi detectado no centro do GD, EO e CE na fase de broto, no EO e EEOE na fase de capuz, na PD, alça cervical, EEOE, EO, pOd na fase inicial de campânula e EIOE e EI no final desta fase (Yoshiba et al., 2003).	mRNA detecatado em Od e nas células da polpa *in vitro* (Palosaari et al., 2003). mRNA detectado em polpas sadias e com cárie (Sulkala et al., 2004).	Rato: mRNA localizado em Ob, oc em torno da cúspide em erupção em animais com 1 semana de vida. Expressão nos F do ligamento periodontal, Od, Cb e Cc em animais com 3 semanas de vida (Maruya et al., 2003).
4	-	mRNA detectado em polpas sadias e com cárie (Sulkala et al., 2004).	-

mineralizados (osso, dentina e cemento) por ser constituída de traços de matriz orgânica (cerca de 5%) e pouca água.

Os ameloblastos são responsáveis pela síntese e manutenção do meio extracelular propício para a formação do esmalte. Estes possuem um ciclo celular único e complexo, e muitas alterações morfológicas refletem sua evolução funcional de acordo com a fase da amelogênese (Boyde, 1989; Frank e Nalbandian, 1967; Nanci e Smith, 1992; Sasaki et al, 1990; Smith e Nanci, 1995).

Estas células podem ser arbitrariamente subdivididas em três estados: pré-secretoras, secretoras e pós-secretoras (Frank e Nalbandian, 1967; Warshawsky e Smith, 1974; Sasaki et al, 1990), e participam de cinco fases diferentes: (1) pré-secretora, onde os ameloblastos estão em diferenciação; (2) secretora, onde ameloblastos secretam proteínas da matriz do esmalte e proteinases; (3) fase de transição, onde os ameloblastos sofrem alterações morfológicas e funcionais e há a formação da camada papilar pela fusão de células remanescentes do estrato intermediário, retículo estrelado e epitélio externo do esmalte; (4) fase de maturação, onde ameloblastos removem as proteínas do esmalte e água e há deposição de fosfatos de cálcio, resultando assim no esmalte maduro; e (5) fase do epitélio reduzido, onde todas as células do órgão do esmalte formam o epitélio reduzido do esmalte (revisado por Gerlach e Line, 2005) (Figura 1.10).

Os ameloblastos produzem enzimas que são secretadas para a matriz extracelular do esmalte e estão envolvidas na modificação e degradação de proteínas do esmalte (Smith, 1998). Ao menos duas classes de proteinases estão em evidência neste processo: um grupo pertencente as MMPs incluindo a -2 e -9 (Goldberg et al., 2002, 2003), -3 (Hall et al., 1999; Septier et al., 2001) e -20 (Bourd-Boittin et al., 2004), agindo principalmente na fase de formação do esmalte, e outro grupo pertencente à família das serino-proteinasess, incluindo, a EMSP-1 (*enamel matrix serine protease-1*), agindo

particularmente na fase de maturação do esmalte (Simmer et al., 1998). As TIMPs -1 e -2 também estão presentes na amelogênese em ratos (Goldberg et al., 2003). RECK não foi ainda estudado no complexo sistema de formação do esmalte dentário em animais adultos.

O incisivo de rato adulto é freqüentemente utilizado como modelo para o estudo da amelogênese, pois apresenta todos os tipos de ameloblastos necessários nas etapas da formação do esmalte, processo semelhante ao que ocorre no desenvolvimento embrionário, apesar do dente já ter sido erupcionado na cavidade oral (Robinson et al, 1979) (Figura 1.11).

1.4.1.2 - Formação da Dentina (Dentinogênese)

MMPs já foram detectadas em odontoblastos de diversas espécies animais, mas em ratos, somente as MMPs -2, -9 (Goldberg et al., 2003) e -20 (Bourd-Boittin et al., 2004) e estas enzimas podem contribuir para as modificações da MEC ao nível da pré-dentina e dentina influenciando, assim, na mineralização.

1.4.2 - Osteogênese

O esqueleto é essencialmente formado por diferentes mecanismos: ossificação intramembranosa, endocondral e pericondral (revisado por Hall e Witten, 2005). As duas

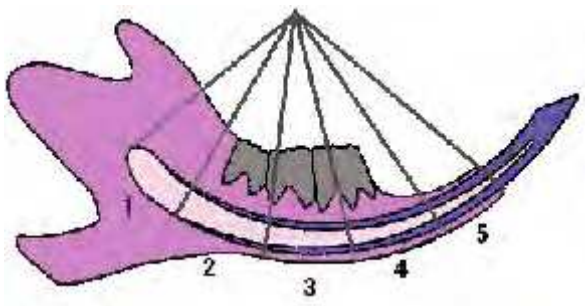


Figura 1.10: *Representação esquemática da anatomia do incisivo de rato de crescimento contínuo proposta. 1: Fase de Diferenciação; 2: Fase de Secreção; 3: Fase de Transição; 4: Fase de Maturação Initial e Terminal; 5: Fase de Epitélio Reduzido.*

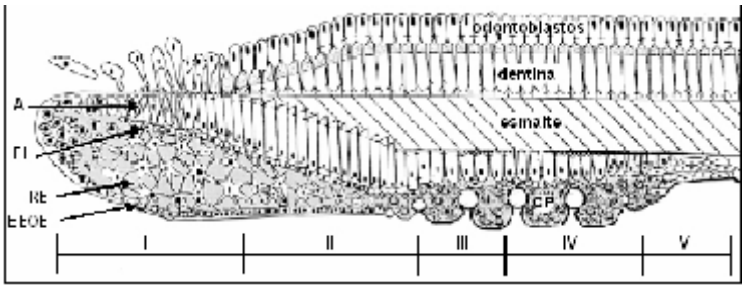


Figura 1.11: *Representação esquemática das fases da amelogênese em incisivos de rato adulto e as células presentes em cada fase. (I) Fase pré-secretora; (II) fase secretora; (III) fase de transição; (IV) fase de maturação; e (V) fase do epitélio reduzido. A: ameloblastos, CP: camada papilar, EEOE: epitélio externo do órgão do esmalte, EI: estrato intermediário e RE: retículo estrelado (Adaptado de Sorkin et al., 2000).*

primeiras são originárias da condensação e diferenciação do tecido mesenquimal que pode ser de origem mesodérmica ou ecto-mesenquimal (células da crista neural). Em ambos os casos é necessária a deposição de uma matriz osteóide, pelos osteoblastos, e sua futura mineralização pela deposição de cristais de hidroxiapatita. A ossificação pericondral ocorre durante a transformação do pericôndrio em periósteo (Scott-Scavage e Hall, 1980).

1.4.2.1 - Ossificação Intramembranosa

Os ossos formados por ossificação intramembranosa são de origem ecto-mesenquimal, isto é, tecido constituído por células originárias da crista neural, e são formados após a interação do tecido ecto-mesenquimal com o mesoderma. O processo é iniciado pela condensação de células mesenquimais que se diferenciam diretamente em osteoblastos. Com isso, a mineralização ocorre sobre membranas osteogênicas depositadas diretamente pelos osteoblastos que são responsáveis pela formação da mandíbula, clavícula e a maioria dos ossos crânio-faciais (Langille, 1994).

Mandíbula

A cartilagem de Meckel é o primeiro componente do esqueleto a ser formado no desenvolvimento da mandíbula. É derivado do arco branquial e origina o osso mandibular, o ligamento esfeno-mandibular e os ossículos do ouvido (malleus e incus) (Figura 1.12). Esta cartilagem difere em dois pontos dos outros tipos de tecidos cartilaginosos que atuam como molde cartilaginoso de ossos longos. Primeiro, ela é uma estrutura transitória no desenvolvimento mandibular e se desenvolve em áreas intermediárias da mandíbula após E10, mas entra tardiamente em processo degenerativo e desaparece em E20 (Zschuäbitz et al., 1995). O pericôndrio e a cartilagem subjacente à cartilagem de Meckel são degradados e substituídos por osso através de ossificação intramembranosa (Frommer e Margolies, 1971). Segundo, as células da cartilagem de Meckel são derivadas da crista neural, enquanto que o molde cartilaginoso de ossos longos é originário do mesoderma.

A osteogênese mandibular é conhecida por ser iniciada em torno de E12 pelas células mesenquimais osteogênicas localizadas próximas à cartilagem de Meckel. Durante o desenvolvimento embrionário ósseo, há uma grande variedade fatores peptídicos locais que são produzidos e funcionam na diferenciação de células osteogênicas via autócrina/parácrina. Em camundongos, por volta dos 15 dias de desenvolvimento embrionário (E15) é sabido que já há formação da cartilagem de Meckel, língua, ossos e brotos dos germes dentários e que fatores de crescimento são expressos neste período, tais como: EGF (Shum et al., 1993), FGF (Yamane et al., 1997, 1998), TGF-β (Chai et al., 1994) e HGF (*hepatocyte growth factor*) (Amano et al., 1999).

Muitas MMPs estão envolvidas na remodelação da MEC durante o desenvolvimento da mandíbula (Quadro 1.6), bem como seus inibidores teciduais (Quadro 1.7). Recentemente, nosso grupo de pesquisa verificou que RECK é secretado por células

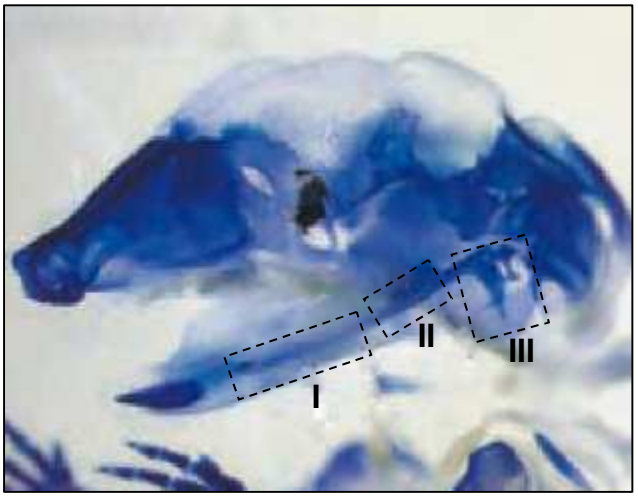


Figura 1.12: *Representação anatômica das regiões da cartilagem de Meckel que sofrerão diferentes formas de ossificação. (I) Porção anterior será substituída através de ossificação endocondral, originando, assim, a porção anterior da mandíbula. (II) A porção média será substituída através de ossificação intramembranosa. (III) A porção posterior será substituída por tecido fibroso (ligamento esfeno-mandibular) e (III) ósseo (mandíbula, malleus e incus) por um processo não muito claro (Adaptado de Holmbeck et al., 2003).*

mesenquimais que participam da formação do palato em camundongos e que está diferencialmente expressa em relação as MMP-2 e -9 (ACCO Demarchi – dados não publicados), mas esta proteína não foi ainda estudada no complexo sistema de formação óssea intramembranosa e da cartilagem de Meckel.

1.5 - Desenvolvimento dos Ossos Longos

O desenvolvimento embrionário dos processos facial e dos brotamentos que originarão os membros superiores e inferiores tem o mesmo mecanismo de formação óssea, mesmo se as células mesenquimais têm diferentes origens embrionárias. O mesênquima do esqueleto axial é originário do mesoderma axial e do esqueleto apendicular da placa lateral do mesoderma (Thorogood e Hinchliffe, 1975).

1.5.1 - Ossificação Endocondral

A ossificação endocondral é iniciada pela condensação de células mesenquimais, no local do futuro osso, que se diferenciam em condroblastos os quais serão

Quadro 1.6: Fenótipos ósseos encontrados em animais *knockout*, mutantes ou em modelos de doenças genéticas humanas de MMPs durante a ossificação intramembranosa e a formação da cartilagem de Meckel.

MMP	Camundongo	Camundongo Knockout	Humanos	Outras Espécies
1	Imunolocalizada em C da CM e a enzima ativa acumula-se nos espaços pericelulares em torno dos CH (E15) *in vitro* (Ishizeki e Nawa, 2000).	-	Durante a ossificação intramembranosa em OO, imunolocalizada fortemente em Ob (Bord et al., 1997).	Rato: mRNA diminui em Ob de calvária estimulados com IGF-I e -II (Canalis et al., 1995) e aumenta quando estimulados por bFGF (Varguese et al., 1995) e PDGF *in vitro* (Varguese et al., 1996). Coelho: expressão em cultura de células da sutura coronal após stress mecânico (Meikle et al., 1980). Utilizando o mesmo sistema, esta enzima foi expressa por células da sutura mesenquimal (Green et al., 1990). Coelho: expressão estimulada cerca de 7x mais por IL-1 do que EGF *in vitro* (van der Zee et al., 1998). Rato: mRNA presente na sutura frontal posterior em animais com 8 dias de vida e na sutura sagital em animais de 8 e 32 dias de vida (Collins et al., 2005).
2	Enzima ativa detectada em Ob de calvária *in vitro* e regulada positivamente por TPA e IL-1α (Lorenzo et al., 1992). Enzima ativa (Da Silviera et al., 1995), mRNA e proteína detectados em estágios iniciais do desenvolvimento (Da Silviera et al., 1996). Enzima ativa localizada por zimografia *in situ* (E10-E11) (Iamaroon et al., 1996). mRNA localizado em células do arco branquial (E11) e em células osteogênicas e condrogênicas da mandíbula, maxila, crânio, ossículos do ouvido e osso baso-occipital em animais de 13 a 16 dias de vida. Os transcritos aumentaram de E9 até 10 dias de vida (quantidade máxima) e decrescendo em seguida. Ob e o tecido ósseo da mandíbula e maxila foram imuno-marcados e esta enzima foi detectada ativa nestes tecidos (Kinoh et al., 1996). mRNA localizado no estroma subjacente ao epitélio (E9), difuso em toda a mandíbula (E12) e depois a expressão é mais concentrada no mesênquima em torno dos BD, cartilagem e osso, entre E13 e E14. Forte expressão no pC da CM, mesênquima em torno dos BD e mesênquima osteogênico (Chin e Werb, 1997). Detectado nas células mesenquimais ao redor do epitélio que participam da formação do palato (Blavier et al., 2001). Imunolocalizada nas células do pO e eD (após 48h) de calvária *in vitro* (Dew et al., 2000).	-	Altas concentrações da enzima ativa no LS na articulação temporomandibular em casos de OAr (Kubota et al., 1998).	Coelho: expressa nos tecidos osteogênicos, pO, na osteóide do osso neo-formado e CM (Breckon et al., 1995). Coelho: expressão estimulada cerca de 5x mais por IL-1 do que EGF *in vitro* (van der Zee et al., 1998). Rato: Enzima localizadas em torno das trabéculas ósseas, na CM e nos tecidos adjacentes (E18) (Abiko et al., 1999). Rato: mRNA presente na sutura frontal posterior em animais com 8 dias de vida e na sutura sagital em animais de 8 e 32 dias de vida. Após o tensionamento da maxila, a enzima foi detectada em animais com 32 dias de vida na sutura frontal posterior (Collins et al., 2005). Rato: mRNA localizado em CCC durante o crescimento e em Cm em adultos (Takahashi et al., 2005).
3	Produzido por Ob de calvária estimulados por vitamina D (Thomson et al., 1989). mRNA difuso na mandíbula entre E9-E15 (Chin e Werb, 1997). Imunolocalizada no mesênquima e cartilagem (após 48h) de calvária *in vitro* (Dew et al., 2000).	-	Durante a ossificação intramembranosa em OO, imunolocalizada fracamente em Ob e moderada em F, mas ambos ao nível da MEC (Bord et al., 1997). Presente no LS da articulação temporomandibular em casos de OAr (Kubota et al., 1997).	-
8	-	-	-	Rato: mRNA localizado nas células da condensação mesenquimal (E14), nos C da CM (E14-E16), células do pO (E15-E16), Ob (E16-

				E20), C (E18-E20) e oc (7D) (Sasano et al., 2002).
9	Enzima ativa detectada em Ob de calvária *in vitro* e regulada positivamente por TNF-α, PTH, TPA e IL-1α (Lorenzo et al., 1992). mRNA localizado fortemente no mesênquima em torno dos BD dos incisivos (E13). Em Oc no osso em desenvolvimento em torno da CM e mesênquima em torno dos BD dos molares (E14) (Chin e Werb, 1997). Imunolocalizadaem células da MO e na matriz em torno da cartilagem de calvária *in vitro* (Dew et al., 2000).	-	Durante a ossificação intramembranosa em OO, imunolocalizada fracamente nos Ob e moderada em F e ambos ao nível da MEC (Bord et al., 1997). Altas concentrações da enzima ativa no LS na articulação temporomandibular em casos de OAr (Kubota et al., 1998).	Coelho: expressa nos tecidos osteogênicos, pO, Oc, na osteóide do osso neo-formado e CM (Breckon et al., 1995). Coelho: expressão estimulada cerca de 2x mais por IL-1 e EGF *in vitro* (van der Zee et al., 1998). Rato: mRNA localizado em condrócitos da cartilagem condilar durante o crescimento e em condrócitos maduros em adultos (Takahashi et al., 2005).
10	mRNA difuso na mandíbula entre E9-E15 (Chin e Werb, 1997).	-	-	-
11	mRNA localizado no osso em desenvolvimento e mesênquima em torno dos BD (E14) (Chin e Werb, 1997).	-	-	-
13	mRNA localizado nos Ob ao longo da osteóide, no mesênquima em torno dos BD e no osso em desenvolvimento (E14) (Chin e Werb, 1997). Detectado no epitélio e no mesênquima subjacente que participam da formação do palato (Blavier et al., 2001). Imunolocalizada em na superfície óssea e no mesênquima adjacente (após 48h) de calvária *in vitro* (Dew et al., 2000).	-	-	Rato: mRNA localizado em ob (E16-E20), C da CM (E16) e oc (E18-7D) (Sasano et al., 2002).
14	mRNA localizado em células do arco branquial (E11) e em células osteogênicas e condrogênicas da mandíbula, maxila, crânio, ossículos do ouvido e osso baso-occipital em animais de 13 a 16 dias de vida. Os transcritos aumentaram de E9 até 10 dias de vida (quantidade máxima) e decrescendo em seguida. Osteoblastos e o tecido ósseo da mandíbula e maxila foram imuno-marcados (Kinoh et al., 1996). mRNA localizado nas células da superfície do osso neo-formado, bem como em células mesenquimais (Apte et al., 1997). Formação da porção posterior da mandíbula (ligamento esfeno-mandibular, osso mandibular e malleus) dependente desta enzima (Holmbeck et al., 2003).	Os animais apresentaram dismorfismo crânio-facial causado pelo retardamento da ossificação intramembranosa (Holmbeck et al., 1999; Zhou et al., 2000). Animais com 62D apresentam dramática reabsorção osteoclástica na calvária, com a persitência das cartilagens "fantasmas" *("ghost cartilages")* (Holmbeck et al., 2003).	-	-

Quadro 1.7: Fenótipos ósseos encontrados em animais *knockout*, mutantes ou em modelos de doenças genéticas humanas de TIMPs durante a ossificação intramembranosa e a formação da cartilagem de Meckel.

TIMP	Camundongos	Humanos	Outras Espécies
1	mRNA detectado na mandíbula de embriões E13,5 (Flenniken e Williams, 1990). Expressa por Ob de calvária *in vitro* (Meikle et al., 1991). mRNA localizado nas áreas em ossificação ao longo da região externa da CM e em alguns C imaturos na região anterior (E14) (Chin e Werb, 1997). Imunolocalizada em C da CM e acumula-se nos espaços pericelulares em torno dos CH (E15) *in vitro* (Ishizeki e Nawa, 2000).	Imunolocalizada durante a ossificação intramembranosa em OO fracamente om Ob e moderadamente m F (Bord et al., 1997).	Coelho: imunolocalizada em células tipo-Ob no pO e eD de calvária (Everts et al., 1993). Coelho: expresso na base do crânio e CM (Breckon et al., 1995). Coelho: expressão estimulada por IL-1 e EGF *in vitro* (van der Zee et al., 1998). Rato: mRNA localizado em CCC durante o crescimento e em Cm em adultos (Takahashi et al., 2005).
2	mRNA localizado em células do arco branquial (E11) e em células osteogênicas e condrogênicas da mandíbula, maxila, crânio, ossículos do ouvido e osso baso-occipital em animais de 13 a 16 dias de vida. Os níveis de transcritos permaneceram os mesmo durante a embriogênese e após o nascimento. Ob e o tecido ósseo da mandíbula e maxila foram imuno-marcados (Kinoh et al., 1996). mRNA localizado nas áreas em ossificação ao longo da região externa da CM, no pC e no mesênquima que circunda a cartilagem (E14).Também encontrado no incisivo e nas áreas de ossificação ao seu redor, PD (Chin e Werb, 1997). mRNA localizado nas células da superfície do osso neo-formado, bem como em células mesenquimais (Apte et al., 1997). mRNA localizado em tecidos mesenquimais em torno do osso em formação (Blavier e DeClerck, 1997). Imunolocalizado na matriz em torno da cartilagem, C, eD e em células da superfício óssea (após 48h) de calvária *in vitro* (Dew et al., 2000).	-	Rato: mRNA não é alterado em Ob de calvária tratados com IGF-I e –II (Canalis et al., 1995). Rato: mRNA localizado em CCC durante o crescimento e em Cm em adultos (Takahashi et al., 2005).
3	mRNA localizado intensamente no mesênquima na região pré-osteóide da mandíbula (E12). Em E13, osteóide, incisivo e mesênquima em volta da CM (Chin e Werb, 1997).	-	Rato: mRNA não é alterado em Ob de calvária tratados com IGF-I e –II (Canalis et al., 1995). Rato: mRNA localizado em CH da cartilagem condilar durante o crescimento (Takahashi et al., 2005).
4	-	-	-

responsáveis pela formação do molde cartilaginoso. O centro da peça cartilaginosa, então, sofrerá invasão vascular, por células endoteliais oriundas do periósteo, e invasão celular, por células trazidas pelos vasos sanguíneos, tais como células mesenquimais progenitoras, pré-osteoblastos, pré-osteoclastos e/ou condroclastos e hematopoiéticas. Subseqüentemente, esta região será calcificada e a matriz cartilaginosa será substituída pela matriz óssea Após a substituição completa dos condrócitos hipertróficos por osteoblastos e outras células, a cavidade medular está formada e o osso apresenta sua forma característica com as duas epífises localizadas nas extremidades e separadas da metáfise pelas placas de crescimento, que são responsáveis pelo crescimento ósseo longitudinal. A maioria dos ossos dos membros superiores e inferiores, da caixa torácica e da base do crânio são de origem endocondral. Este tipo de ossificação ocorre em dois locais distintos nos ossos longos: no centro primário (diáfise) e secundário de ossificação (epífises). O desenvolvimento ósseo inicia-se no centro primário, já o centro secundário é independente e ossifica-se depois (Figura 1.13) (revisado por Ortega et al., 2004).

Desde a descoberta da MMP-13 em ossos longos de ratos (Walter et al., 1963), mais da metade dos membros da família das MMPs têm sido demonstrados no tecido ósseo em diversas espécies, tais como as colagenases - MMPs -1 (Cawston e Rowan, 1998) - gelatinases - MMPs -2 (Lefebvre et al., 1991) e -9 (Reponen et al., 1994) - estromelisinas - MMPs -3 (Keyszer et al., 1998) e -10 (Bord et al, 1998) - e MT1-MMP (MMP-14) (Holmbeck et al., 1999), sendo que as MMPs -9, -13 e -14 são as mais expressas. Além disso, a análise de camundongos *knockout* e modelos de doenças genéticas humanas têm chamado a atenção para a importância das MMPs -2, -9, -13 e -14 para o desenvolvimento ósseo (Delaissé et al., 2003) (Quadro 1.8).

Com isso, tem-se enfatizado que as funções das MMPs deveriam ser consideradas em um espectro mais amplo do que a simples solubilização da matriz óssea

e deveria incluir outros processos, tais como o recrutamento osteoclástico (Blavier e Delaissé, 1995; Sato et al., 1998, Engsig et al., 2000; Karsdal et al., 2001), coordenação da reabsorção e formação óssea (Everts et al., 2002), sobrevivência osteoblástica (Karsdal et al., 2002) e angiogênese (Vu et al., 1998). A chave para o entendimento do mecanismo molecular envolvendo as MMPs no osso é a precisa informação onde estas são expressas e por qual tipo celular. Existem atualmente consideráveis confusões no que diz respeito à expressão das MMPs, principalmente em osteoclastos (Andersen et al., 2004).

Desde a descoberta de que células ósseas secretavam inibidores de colagenases (Cawston et al., 1981) e, posteriormente, identificadas como sendo as TIMPs, estas foram identificadas em diversas células osteogênicas e condrogênicas. A TIMP mais expressa durante o desenvolvimento ósseo é a TIMP-2 (Apte et al., 1997; Blavier e DeClerck, 1997). Entretanto, as outras TIMPs também são expressas em elementos do esqueleto durante o desenvolvimento em humanos e camundongos (Flenniken e Williams, 1990; Meikle et al., 1991; Apte et al., 1994; Rifas et al., 1994; Hammani et al., 1996; Blavier e DeClerck, 1997; Zeng et al., 1998; Bord et al., 1999; Su et al., 1999; Huang et al., 2002), principalmente por condrócitos e *bone-lining cells* (Joronen et al., 2000; Dew et al., 2000; Huang et al., 2002) (Quadro 1.9). É possível que a alta concentração destes inibidores contribua para as propriedades anti-angiogênicas da cartilagem, entretanto a análise de camundongos deficientes para todas as TIMPs não apresentou fenótipo ósseo anormal. Recentemente, mRNA de RECK foi detectado em osteosarcoma (Kang et al., 2007), entretanto ele não foi ainda estudado no desenvolvimento ósseo endocondral em camundongos.

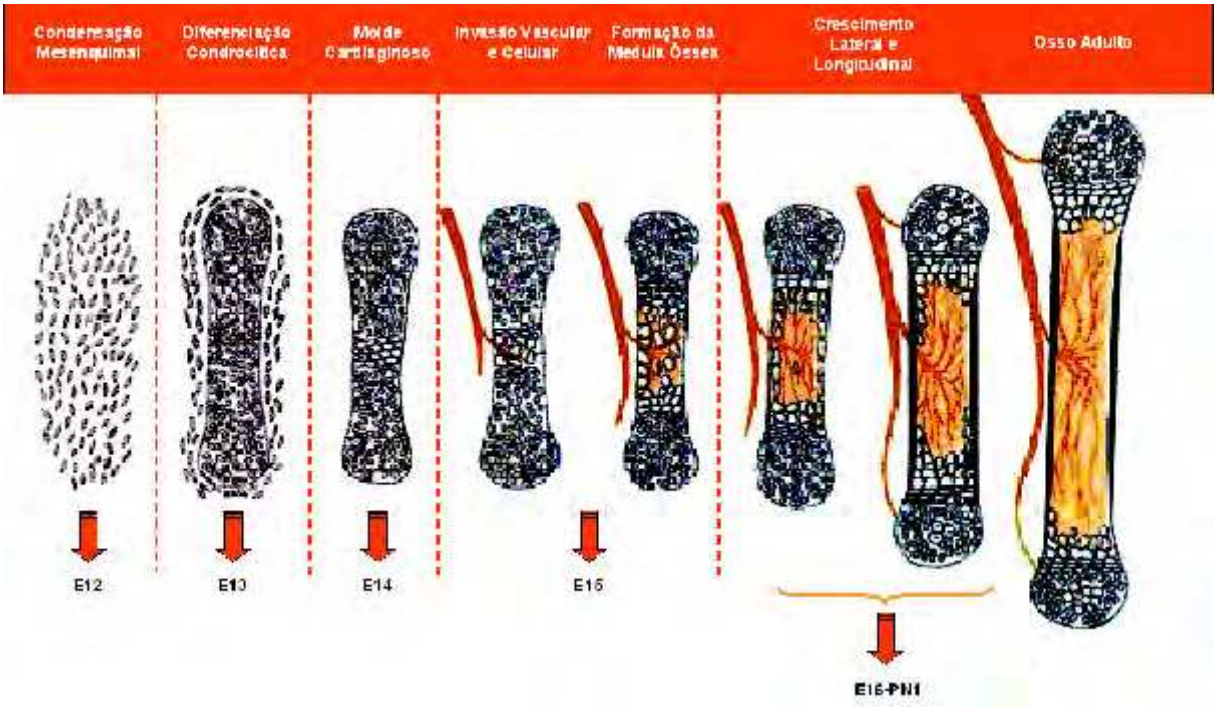


Figura 1.13: *Representação esquemática da formação óssea endocondral durante o desenvolvimento embrionário.*

Quadro 1.8: Fenótipos ósseos encontrados em animais normais, *knockout*, mutantes ou em modelos de doenças genéticas humanas para as MMP durante a ossificação endocondral.

MMP	Camundongo	Camundongo Knockout	Animais Trangênicos	Humanos	Outras Espécies
1	Sintetizada por Ob após serem estimulados por fatores de reabsorção óssea (Heath et al., 1984a) e por um fator derivado de F de pO (Heath et al., 1984b). Imunolocalizada na zona de reabsorção sub-osteoclástica e em Oc (Delaissé et al., 1993). mRNA detectado em CH das PC de ossos longos e da costela de embriões, bem como em Ob e/ou CE que migram do CO para o centro do MC (Mattot et al., 1995). Estimula a reabsorção óssea por Oc (Holliday et al., 1997).	-	-	mRNA regulado positivamente por IL-1 em C *in vitro* (Martel-Pelletier et al., 1991). mRNA expresso em casos de OAr e regulada negativamente em C normais estimulados *in vitro* por IL-1α (Mohtai et al., 1993). Cultura de Ob: MG-63 estimulada com PMA e IL-1β aumentam sua biossíntese; U2OS secreta constitutivamente, porém fraca, e induzida moderadamente por PMA; TE-85 secreta constitutivamente, porém fraca, e fortemente estimulada por PMA e, em menor escala, por TNFα e IL-1β; SAOS não expressa; hOB tem pouquíssima expressão (Rifas et al., 1994). TNF-α estimula a expressão do mRNA em Ob (HOS TE85) *in vitro* (Panagakos e Kumar, 1994). Secretada e ativa em cultura primária de Ob de osso normal e com artrite (Meikle et al., 1995). Encontrada no LS em casos de AR (Maeda et al., 1995). Expressa por C da cartilagem de OAr estimulados por IL-1α *in vitro* (Mitchell et al., 1996). Expressão por Ob e Oc *in vivo* (Bord et al., 1996). (Borden et al., 1996). Altos níveis de mRNA nos C mais superficiais do que nas zonas mais profundas em casos de OAr bem estabelecidos (Freemont et al., 1997). Imunolocalizada fracamente em Cm e osso mineralizado, moderadamente em CP e células vasculares e fortemente em Ob na PC de OO. No processo de remodelação Oc e oc foram fracamente imunolocalizados, linning cells moderadamente e fortemente em Ob e células mononucleares (Bord et al., 1997). mRNA localizado em torno dos C em casos de AR e mais expresso do que na cartilagem normal. Expressão estimulada por TNF-α *in vitro* (Shlopov et al., 1997). Presente na cartilagem articular em casos de OAr (Walter et al., 1998). Imunolocalizada em C, Ob e Oc no OO e ectópico de articulações e em costelas de recém-nascidos (Bord et al., 1999). Imunolocalizada na cartilagem normal e em casos de OAr e altas concentrações da proteína em OAr (Kanyama et al., 2000). Níveis de mRNA aumentados em casos de OAr (Bluteau et al., 2001). Imunolocalizada em C em casos de OAr e quando estimulada por citocinas (Tetlow et al., 2001) e por	Coelho: Sintetizada por Ob após serem estimulados por um fator derivado de F de pO (Heath et al., 1984b). Rato: ativa nos CH na PC de ossos com desenvolvimento da síndrome do raquitismo antes do tratamento com bifosfanatos (Dean et al., 1989). Coelho: imunolocalizada em CH, CP e CR da PC de ossos longos de recém-nascidos (Brown et al., 1989). Rato: imunolocalizada em CH da PC (Blair et al., 1989). Rato e Coelho: pró-enzima imunolocalizada na zona de reabsorção sub-osteoclástica e em Oc (Delaissé et al., 1993). Coelho: secretada por Oc quando estimulada por IL-1α *in vitro* (Hill et al., 1994). Coelho: mRNA estimulado positivamente em casos de OAr induzido (Mehraban et al., 1994). Coelho: mRNA localizado nas células da superfície óssea, oc e C adjacentes a Oc nos locais de reabsorção óssea ativa (Fuller e Chambers, 1995). Coelho: síntese estimulada por peptídeos RGD em C *in vitro* (Arner e Torotrela, 1995). Rato: expressa por Oc estimulados por PTH *in vivo* (Witty et al., 1996). Coelho: expressão da pró-enzima é estimulada por IL-1α e a enzima é ativada pela adição de plasminogênio a cultura de CA, promovendo a degradação de colágeno tipo I (Saito et al., 1997). Cão: imunlocalizado na superfície da cartilagem em casos de OA (Fernandes et al., 1998). Porquinho-da-Índia: mRNA dependente da idade e do compartimento da PC em casos de OAr (Huebner et al., 1998).

				vitamina D *in vitro* (Tetlow e Woolley, 2001). O LS apresenta mais enzima ativa do que no soro em casos de AR (Itoh et al., 2002). Imunomarcação fraca em articulações normais e forte em casos de OAr e localizada nas regiões pericelulares e profundas da cartilagem (Wu et al., 2002). mRNA diminuído em casos de OAr (Kevorkian et al., 2004). Imunolocalizada em CH e Ob em ossos longos de crianças e adolescentes (Haeusler et al., 2005).	
2	mRNA encontrado em pOc em organocultura de metatarso (E17) (Blavier e Delaissé, 1995). mRNA localizado em células osteogênicas e condrogênicas da costela em animais de 13 a 16 dias de vida. Os transcritos aumentaram de E9 até 10 dias de vida (quantidade máxima) e decrescendo em seguida. C e células mesenquimais do pC da costela foram imuno-marcados e esta enzima foi detectada ativa nestes tecidos (Kinoh et al., 1996). mRNA presente em Ob *in vitro* (Uchida et al., 2000) e altos níveis quando estimulados por IL-1 e IL-6 *in vitro*, além de apresentar a enzima ativa (Kusano et al., 1998). Diferentes níveis de mRNA e proteína durante o crescimento (recém-nascido a 2 meses de idade), maturação (4 meses de idade) e velhice (18 meses de idade) das cartilagens articulares temporomandibular e do joelho (Gepstein et al., 2002) e com atividade enzimática (Gepstein et al., 2003).	Animais de pequena estatura, mas não desenvolvem aparentemente anormalidades ósseas, entretanto a angiogênese é diminuída (Itoh et al., 1997).	-	Produzida constitutivamente por Ob e induz a síntese das MMPs -1, -3 e -9 *in vitro* (Meikle et al., 1992). Expressão basal em C de cartilagem normal (Mohtai et al., 1993). Cultura de Ob: MG-63, TE-85 e U2OS expressão constitutivamente e SAOS, MG-63 e hOB não são estimulados (Rifas et al., 1994). TNF-α estimula a expressão do mRNA em cultura de ob (HOS TE85) (Panagakos e Kumar, 1994). Expressa por Oc em TCG (Rao et al., 1995). Ativa em cultura primária de Ob de osso normal e com artrite (Meikle et al., 1995). Imunolocalizada somente em F do tecido fibroso em OO (Bord et al., 1997). Enzima expressa por células de TCG e pode ser ativada por osteopontina, sialoproteína óssea e um peptídeo análogo a sequência RGD solúveis *in vitro* (Teti et al., 1998). Presente na cartilagem articular em casos de OAr (Walter et al., 1998). Altas concentrações da proteína em casos de OAr (Kanyama et al., 2000) e mais mRNA em casos de Oar do que no tecido normal (Su et al., 1999). A ausência da enzima ativa está ligada com a forma recessiva autossômica da osteólise multicêntrica, uma rara doença genética que causa destruição e reabsorção dos ossos afetados (Martignetti et al., 2001). Imunolocalizada em condrócitos em casos de OAr e quando estimulada por citocinas *in vitro* (Tetlow et al., 2001). Imunolocalizada em CR e Oc em ossos longos de crianças e adolescentes (Haeusler et al., 2005).	Coelho: secretada constitutivamente por Oc *in vitro* (Hill et al., 1994). Coelho: síntese estimulada por peptídeos RGD em C *in vitro* (Arner e Torotrela, 1995). Coelho: Altos níveis de mRNA, proteína e enzima ativa em C da PC *in vitro* do que *in vivo,* quando estimulados com PTH/PTH-rp (Kawashima-Ohya et al., 1998). Galinha: mRNA estimulado por ácido retinóico em C da PC *in vitro* (Nie et al., 1998). Galinha: enzima ativa nos CP e CH *in vitro* (D'Angelo et al., 2001a). Galinha: vesículas de matriz produzidas por CH da PC exibem esta enzima ativa (D'Angelo et al., 2001b). Rato: enzima ativa nos centros de ossificação secundários (Davoli et al., 2001). Rato: Imuno-localização em locais de neo-formação óssea em defeito ósseo em fêmur após 2 semanas de tratamento com TGF-β e em nódulos de cartilagem e finas trabéculas ósseas em defeitos tratados com IGF-1 ou IGF-1+ TGF-β (Blumenfeld et al., 2002). Rato: mRNA localizado em Ob e oc durante a formação óssea aposicional *in vitro* (Hatori et al., 2004).
3	Altos níveis de mRNA em Ob estimulados por IL-1 (Kusano et al., 1998) e IL-1β e TNF-α *in vitro* (Uchida et al., 2000).	Animais desenvolvem artrite induzida pela degradação de colágeno (Mudgett et al., 1998). Em modelo experimental de	Em modelo experimental de reabsorção de hérnia de disco, esta enzima é secretada por C e parece ser requerida	Altos níveis de mRNA no tecido sinovial em casos de AR do que em OAr *in vitro* (Case et al., 1989a). mRNA localizado nas lining cells em casos de OAr e AR (Gravallese et al., 1991). mRNA regulado positivamente por IL-1 (Martel-	Rato: localizada em Oc em reabsorção (Case et al., 1989b). Coelho: secretada por Oc quando estimulada por IL-1α *in vitro* (Hill et al., 1994).

	Diferentes níveis de mRNA e proteína durante o crescimento (recém-nascido a 2 meses de idade), maturação (4 meses de idade) e velhice (18 meses de idade) das cartilagens articulares temporomandibular e do joelho (Gepstein et al., 2002).	artrite, os animais apresentaram resistência à erosão da cartilagem (van Meurs et al., 1999).	para a reabsorção e invasão macrofágica (Haro et al., 2000).	Pelletier et al., 1991) e IL-1β em C *in vitro* (Nguyen et al., 1992; Shingu et al., 1995; Chubinskaya et al., 1996). Expressa em C e sinovial lining cells em casos de OAr (Okada et al., 1992b). Secretada cerca de 20x mais do que a MMP-1 em casos AR e 8x mais em casos de injúria pós-traumática do joelho (Walakovits et al., 1992). mRNA expresso em casos de OAr e regulada negativamente em C normais estimulados *in vitro* por IL-1α (Mohtai et al., 1993). Expressa cerca de 40x mais em casos de injúria nas articulações (Lohmander et al., 1993). Enzima ativa em C de cartilagem articular e F sinuviais (Wilhelm et al., 1993). Cultura de Ob: MG-63 estímulo com PMA e IL-1β não alteram a sua expressão; U2OS secreta constitutivamente e sua expressão não é estimulada por PMA, IL-1β e TNFα; TE-85, SAOS e hOB não expressam (Rifas et al., 1994). Imunolocalizada fracamente em Ob, osso mineralizado, CH e Cm (principalmente na MEC) e moderadamente em CP (principalmente na MEC) na PC de OO. Na remodelação, somente Ob e oc foram fracamente marcados (Bord et al., 1997). mRNA encontrado nos das zonas mais profundas em casos de OAr em estágios iniciais e finais da doença (Freemont et al., 1997). Imunolocalizada fortemente na MEC do tecido fibroso em torno das áreas de ossificação endocondral em OO e adjacente ao periósteo das costelas. Enzima ativa localizada nos oc e na matriz em torno da lacuna osteocítica (Bord et al., 1998). Presente na cartilagem articular em casos de OAr (Walter et al., 1998). Imunolocalizada na matriz óssea e fibrosa no OO e ectópico de articulações e em costelas de recém-nascidos (Bord et al., 1999). Imunolocalizada na cartilagem normal e em casos de OAr e em altas concentrações (Kanyama et al., 2000). Imunolocalizada em C em casos de OA (Tetlow e Woolley, 2001) e quando estimulada por citocinas *in vitro* (Tetlow et al., 2001). Altos níveis de mRNA em células de TCG e detectadas em células tipo Oc (Kumta et al., 2003).	Coelho: mRNA estimulado positivamente em casos de OAr induzido (Mehraban et al., 1994). Coelho: síntese estimulada por peptídeos RGD em C *in vitro* (Arner e Torotrela, 1995). Boi: Expressão em C estimulada pelo fragmento de 29 kDa gerado pela clivagem da fibronectina (Fn-f 29) *in vitro* (Bewsey et al., 1996). Coelho: expressão da pró-enzima é estimulada por IL-1α e a enzima é ativada pela adição de plasminogênio a cultura de CA, promovendo a degradação de colágeno tipo I (Saito et al., 1997). Coelho: Aumento da expressão em C da PC *in vitro* do que *in vivo,* quando estimulados com PTH/PTH-rp e IL-1 (Kawashima-Ohya et al., 1998). Rato: Imuno-localização em locais com nódulos de cartilagem e finas trabéculas ósseas em defeitos tratados com IGF-1 ou IGF-1+ TGF-β após 2 semanas (Blumenfeld et al., 2002). Porco: Expressão em C estimulada pelo fragmento de 45 kDa gerado pela clivagem da fibronectina (Fn-f 45) *in vitro* (Stanton et al., 2002).
7	-	Animais não apresentaram anormalidades ósseas (Johnson et al., 2005).	-	-	-
8	-	-	-	mRNA e proteína localizados em C articulares e existe atividade enzimática (Cole et al, 1996). mRNA expresso por C normais e estimulada positivamente por IL-1β *in vitro* (Chubinskaya et al., 1996).	Rato: mRNA localizado em Ob e oc durante a formação óssea aposicional *in vitro* (Hatori et al., 2004).

				mRNA e proteína em F sinuviais e CE *in vitro* e regulado positivamente pot TNF-α e forbol e negativamente por doxicilina (Hanemaaijer et al., 1997). mRNA localizado em torno dos C da cartilagem em casos de AR e ausente na cartilagem normal. Expressão estimulada por ácido retinóico *in vitro* (Shlopov et al., 1997). Imunolocalizada em C em casos de OAr e quando estimulada por citocinas *in vitro* (Tetlow et al., 2001).	
9	mRNA detectado em Oc (Reponen et al., 1994). mRNA encontrado em pOc em organocultura de metatarso (E17) (Blavier e Delaissé, 1995). Enzima ativa e altos níveis de mRNA em Ob estimulados por IL-1 (Kusano et al., 1998) e por IL-1β e TNF-α em ob *in vitro* (Uchida et al., 2000). mRNA presente na formação do calo ósseo durante a primeira e segunda semanas deste processo (Uusitalo et al., 2000). mRNA localizado no pC do MC (E14), pC e CH próximos aos locais de invasão celular e vascular inicial (E15) e nas células que migram para formar a MO (Colnot e Helms, 2001). Diferentes níveis de mRNA e proteína durante o crescimento (recém-nascido a 2 meses de idade), maturação (4 meses de idade) e velhice (18 meses de idade) das cartilagens articulares temporomandibular e do joelho (Gepstein et al., 2002). mRNA localizado nos espaços inter-trabeculares no colar ósseo e em células migrando para o MC (Takahara et al., 2004).	Exibem anormal vascularização da PC e ossificação, devido a alterações na taxa de apoptose dos CH, o que acarreta o acúmulo destas células na PC (Vu et al., 1998). Reduz drasticamente o recrutamento de Oc e CE (Engsig et al., 2000). mRNA aumentado em animais catepsina K *knockout* (Kiviranta et al., 2005).	-	mRNA e proteína expressos por C em casos de OAr e regulada positivamente em C normais estimulados *in vitro* por IL-1α (Mohtai et al., 1993). Cultura de Ob: U2OS secreta constitutivamente e sua expressão é pouca estimulada por PMA e fortemente por IL-1β e TNFα; TE-85 secreta somente após o estímulo (Rifas et al., 1994). Expressa por Oc (Wucherpfennig et al., 1994). TNF-α estimula a expressão do mRNA em cultura de Ob (HOS TE85) (Panagakos e Kumar, 1994). Imunolocalizada em CH e células mesenquimais durante a invasão celular e vascular do MC (Sakiyama et al., 1994). Expressa por Oc em TCG (Rao et al., 1995). Ativa em cultura primária de Ob de osso normal e com artrite (Meikle et al., 1995). Imunolocalizada fortemente na matriz óssea mineralizada (MEC) na PC em OO. Na remodelação, fracamente marcada em Ob e oc (Bord et al., 1997). Presente na cartilagem articular em casos de OAr (Walter et al., 1998) e em C *in vitro* (Tetlow e Woolley, 2001), mRNA encontrado nos das zonas mais profundas nos estágios iniciais da doença (Freemont et al., 1997) e apresenta altas concentrações da proteína (Kanyama et al., 2000). Imunolocalizada em C quando estimulada por citocinas *in vitro* (Tetlow et al., 2001). Imunolocalizada em Oc e células mononucleares no OO e ectópico de articulações e em costelas de recém-nascidos (Bord et al., 1999). O LS apresenta mais enzima do que no soro em casos de AR (Itoh et al., 2002). mRNA aumentado em casos de OAr (Kevorkian et al., 2004). Co-localizada com uPAR em C estimulados por IL-β1 em casos de OAr (Schwab et al., 2004). Imunolocalizada em CH, Oc e Ob em ossos longos de crianças e adolescentes (Haeusler et al., 2005).	Coelho: secretada por Oc *in vitro* (Tezuka et al., 1994) e constitutivamente (Hill et al., 1994). Coelho: síntese estimulada por peptídeos RGD em C *in vitro* (Arner e Torotrela, 1995). Coelho: forma ativa regulada positivamente por Il-1 e a pró-forma é regulada positivamente por inibidores de cicloxigenase e regulada negativamente por prostaglandinas em C articulares (Ito et al., 1995). Rato: expressa por Oc estimulados por PTH *in vivo* (Witty et al., 1996). Coelho: expressão da pró-enzima é estimulada por IL-1α e a enzima é ativada pela adição de plasminogênio a cultura de CA, promovendo a degradação de colágeno tipo I (Saito et al., 1997). Rato: mRNA é regulado pelo estímulo do PTH na diáfise de ossos longos e imunolocalizada em Ob, oc, megacariócitos e outras células da MO (McClelland et al., 1998). Coelho: Aumento da expressão em C da PC *in vitro* do que *in vivo,* quando estimulados com PTH/PTH-rp e IL-1 (Kawashima-Ohya et al., 1998). Galinha: enzima ativa nos CP e CH *in vitro* (D'Angelo et al., 2001a). Galinha: vesículas de matriz produzidas por CH da PC exibem esta enzima ativa (D'Angelo et al., 2001b). Rato: enzima ativa nos centros de ossificação secundários (Davoli et al., 2001). Rato: fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) estimula a produção de mRNA em Ob *in vitro* (Onodera et al., 2002).

					Cachorro: mRNA induzido em casos de OAr, regulado por SAF-1 (fator ativador de soro amilóide A) e AP-1 (Ray et al., 2005).
10				Imunolocalizada nas áreas de reabsorção da ossificação endocondral e nas células de reabsorção da JOC e a enzima ativa também localizada nos mesmos locais em OO. Nas costelas, a enzima ativa foi localizada em C da PC e em Oc e células mononucleares da MO (Bord et al., 1998). Imunolocalizada em C, Ob e Oc no OO e ectópico de articulações e em costelas de recém-nascidos (Bord et al., 1999). mRNA diminuído em casos de OAr (Kevorkian et al., 2004). Imunolocalizada em CH e Ob em ossos longos de crianças e adolescentes (Haeusler et al., 2005).	
11	mRNA presente em Ob *in vitro* (Uchida et al., 2000).	-	-	Imunolocalizada em CH e Ob em ossos longos de crianças e adolescentes (Haeusler et al., 2005).	-
12	-	Expressa por Oc, mas não afeta o recrutamento osteoclástico para o centro do MC (Hou et al., 2004).	-	mRNA detectado em células de condrosarcoma *in vivo* (Kerkela et al., 2001). mRNA detectado em CH nas vértebras, costelas em embriões de 8 semanas de vida. Células do pO também a expressão na 11 semana de vida (Kerkela et al., 2001).	-
13	Drante o desenvolvimento, expressão restrita ao osso e cartilagem (Gack et al., 1995). mRNA encontrado em CH em organocultura de metatarso (E17) (Blavier e Delaissé, 1995). mRNA presente em Ob (Uchida et al., 2000) e altos níveis quando estimulados por IL-1 e IL-6 *in vitro* (Kusano et al., 1998). Expressão induzida durante o reparo ósseo (Yamagiwa et al., 1999). Altos níveis de mRNA em CH (E14,5) (Tuckermann et al., 2000). mRNA localizado nos CH do MC (E15) e nas células que migram para formar a MO e na PC (Colnot e Helms, 2001). Diferentes níveis de mRNA e proteína durante o crescimento (recém-nascido a 2 meses de	Altos níveis de mRNA em osteosarcomas (Gack et al., 1994). Expressão bastante reduzida em animais *c-fos knockout* (Porte et al., 1999). mRNA expresso em células de osteosarcomas e condrosarcomas de animais *c-fos* e *c-fos/c-jun* transgênicos (Tuckermann et al., 2001). O início da ossificação endocondral é normal (invasão vascular e celular e formação do fronte de ossificação primário – até E17), mas a zona de CH aumenta com a idade do animal. Após 5 semanas de vida o fenótipo normal começa a ser reestabelecido. Animais duplo *knockout* (*MMP-13*$^{-/-}$ *e MMP-9*$^{-/-}$) apresentaram os fenótipos já observados para cada um separadamente, mas com maior severidade (Stickens et al., 2004). Severos defeitos na ossificação endocondral pelo	A CA de camundongos resultou em alterações patológicas semelhantes aquelas observadas em casos de OAr humana, com o aumento da clivagem do colágeno tipo II (Neuhold et al., 2001).	Expressa por C da cartilagem dem casos de OAr estimulados por IL-1α *in vitro* (Mitchell et al., 1996) e mRNA expresso por C transformados e de cartilagem articular quando estimulados por IL-1β+TNF-α *in vitro* (Borden et al., 1996). mRNA em casos de AR e OAr e ausente na cartilagem normal (Wernicke et al., 1996). Expressa por C, mas não por sinoviócitos, derivados de cartilagem normal e com OAr estimulados por IL-1β e TNF-α (Reboul et al., 1996). Tem sido detectada na CA em casos de AR (Stahle-Backdahl et al., 1997). Fraca expressão em cartilagem normal e forte em casos de OAr e AR e, em todos os casos, a síntese é estimulada por TGF-β e IL-1β (Moldovan et al., 1997). Mais expresso em F, macrófagos, sinovial lining cells, CE e do estroma em casos de AR do que OAr (Lindy et al., 1997). mRNA localizado em torno dos C da cartilagem em casos de AR e mais expresso do que na cartilagem normal. Expressão estimulada por TNF-α *in vitro* (Shlopov et al., 1997). mRNA detectado em células de condrosarcoma *in vivo* (Kerkela et al., 2001). Níveis de mRNA aumentados em casos de OAr (Bluteau et al., 2001). Imunolocalizada em C em casos de OAr e quando estimulada por citocinas *in vitro* (Tetlow et al., 2001). O LS apresenta mais enzima do que no soro em	Cão: imunolocalizado na superfície da cartilagem em casos de OAr (Fernandes et al., 1998). Porquinho-da-Índia: mRNA dependente da idade e do compartimento da PC em casos de OAr (Huebner et al., 1998). Rato: mRNA localizado em Ob e regulada positivamente por PTH (Winchester et al., 1999; Selvamurugan et al., 2000) e por TGF-β *in vitro* (Selvamurugan et al., 2004). Rato: mRNA localizado em Ob de animais com 4 semanas de vida (Hayami et al., 2000). Galinha: enzima ativa nos CH *in vitro* (D'Angelo et al., 2001a). Galinha: vesículas de matriz produzidas por CH da PC exibem esta enzima ativa (D'Angelo et al., 2001b). Rato: enzima ativa nos centros de ossificação secundários (Davoli et al., 2001). Rato: Diminuição da expressão em CH e inibição da angiogênese na PC após tratamento com FGF-2 (Nagai e Aoki, 2002).

	idade), maturação (4 meses de idade) e velhice (18 meses de idade) das cartilagens articulares temporomandibular e do joelho (Gepstein et al., 2002).	aumento da zona de condrócitos hipertróficos, retardo na formação óssea e vascularização. Anormalidades da PC persistem nos animais adultos e este fenótipo é o mesmo observado em condrodisplasias hereditárias humanas (Inada et al., 2004). mRNA aumentado em animais catepsina K *knockout* (Kiviranta et al., 2005). O reparo ósse de fraturas foi bastante comprometido devido à diminuição da reabsorção da cartilagem, recrutamento de condroclastos e angiogênese (Kosaki et al., 2007).		casos de AR e localizada (mRNA e proteína) em células sinoviais, endoteliais, Ob e C (Itoh et al., 2002). Imunomarcação fraca em articulações normais e forte em casos de OAr e localizada nas regiões pericelulares e profundas da cartilagem (Wu et al., 2002). Sua mutação causa a variante da displasia espondiloepimetafiseal de Missouri (SEMD), síndrome que apresenta anormalidades no desenvolvimento do esqueleto (Kennedy et al., 2003). mRNA aumentado em casos de OAr (Kevorkian et al., 2004). Recentemente, uma mutação foi encontrada no gene da MMP-13 que resulta na autodegradação da enzima e isso causa uma desordem dominante autossômica (displasia espôndilo-epimetafiseal) caracterizada pela forma e crescimento defeituoso de ossos em vertebrados (Kennedy et al., 2005). Imunolocalizada em CH e Ob em ossos longos de crianças e adolescentes (Haeusler et al., 2005).	Rato: fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) estimula a produção de mRNA em Ob *in vitro* (Onodera et al., 2002). Porco: Expressão em C estimulada pelo fragmento de 45 kDa gerado pela clivagem da fibronectina (Fn-f 45) *in vitro* (Stanton et al., 2002).
14	mRNA localizado em células osteogênicas e condrogênicas da costela em animais de 13 a 16 dias de vida. Os transcritos aumentaram de E9 até 10 dias de vida (quantidade máxima) e decrescendo em seguida. Condrócitose células mesenquimais do pC da costela foram imuno-marcados e esta enzima foi detectada ativa nestes tecidos (Kinoh et al., 1996). mRNA localizado nos locais de reabsorção da cartilagem na metáfise (Apte et al., 1997). mRNA presente em Ob *in vitro* (Uchida et al., 2000). mRNA localizado no pC do MC (E14), pC e CH próximos aos locais de invasão celular e vascular inicial (E15) e nas células que migram para formar a MO (Colnot e Helms, 2001).	Os animais recém-nascidos são indistinguíveis dos animais heterozigotos e normais, mas aos 5 dias de vida o crescimento foi prejudicado e tornou-se muito aparente. Estes animais desenvolveram fibrose nos tecidos moles em volta do esqueleto e a ossificação foi mais demorada, levando a osteopenia, artrite, ananismo, artropatia e alterações na angiogênese. Entre 7 e 15 semanas de vida estes animais morreram (Holmbeck et al., 1999; Zhou et al., 2000). Animais apresentam 10 vezes mais oc apoptóticos do que em animais normais (Karsdal et al., 2004). A análise detalhada sugere que o fenótipo ósseo encontrada pode ser em parte resultado da perda da degradação celular de colágeno por oc (Holmbeck et al, 2005). mRNA aumentado em animais catepsina K *knockout* (Kiviranta et al., 2005).	-	Expressa por C da cartilagem OAr e ativa a pró-MMP-2 (Imai et al., 1997). Expressa por Ob (SaSO-2) e induz apoptose nestas células (Luo et al., 2003). Imunolocalizada em C de todas as zonas PC em ossos longos de crianças e adolescentes (Haeusler et al., 2005).	Coelho: expresso por Oc *in vitro* (Sato et al., 1997). Rato: imuno-localização em Oc *in vivo* (Irie et al., 2001).
16	-	-	-	mRNA aumentado em casos de OAr (Kevorkian et al., 2004).	-

				Imunolocalizado em CH em ossos longos de crianças e adolescentes (Haeusler et al., 2005).	
28	-	-	-	mRNA aumentado em casos de OAr (Kevorkian et al., 2004).	-

Quadro 1.9: Fenótipos ósseos encontrados em animais *knockout*, mutantes ou em modelos de doenças genéticas humanas de TIMPs durante a ossificação endocondral.

TIMP	Camundongo	Animais Transgênicos	Humanos	Outras Espécies
1	mRNA detectado na clavícula e ao redor da costela e fêmur de embriões E13,5 (Flenniken e Williams, 1990). mRNA por IL-1β e TNF-α em Ob *in vitro* (Uchida et al., 2000).	Superexpressão não protege a degradação do colágeno em casos de artrite (Apparailly et al., 2001).	Altos níveis de mRNA em células sinuviais em casos de AR do que em OAr (Firestein et al., 1991; Gravalese et al., 1991; Spence McCahren, 1991). Regulada positivamente por IL-6 em C (Lotz e Guerne, 1991). Produzida constitutivamente por Ob e induz a síntese das MMPs -1, -3 e -9 *in vitro* (Meikle et al., 1992). Regulada positivamente em F sinoviais em casos AR (Ito et al., 1992) e também por IL-1β e TGF-β em F sinuviais (DiBattista et al., 1995; Gatsios et al., 1996). mRNA localizado na membrana sinuvial em casos de OAr (Zafarullah et al., 1993). Cultura de Ob: MG-63, TE-85 e SAOS têm alta expressão e hOB expressa menos com o estímulo de PMA e IL-1β (Rifas et al., 1994). TNF-α estimula a expressão do mRNA em cultura de Ob (HOS TE85) (Panagakos e Kumar, 1994). Detectada em cultura primária de Ob de osso normal e com artrite (Meikle et al., 1995). Estimulada por IL-4 e IL-6 em C *in vitro* (Shingu et al., 1995). Protege a degradação da cartilagem em cultura primária, mas, em associação com o IL-1, promove a degradação da MEC (Oleksyszyn e Augustine, 1996). Indução por oncostatina M em C (Nemoto et al., 1996). Imulocalizada em algumas células vasculares, fracamente em células mesenquimais e maderadamente em F do tecido fibroso do OO. Na PC, Ob, células vasculares, CH e maduros foram fracamente marcados e CP e a matriz óssea mineralizada moderadamente. Durante a remodelação, células mononucleres foram fracamente marcadas e Ob moderadamente (Bord et al., 1997). Imunolocalizada em C, Ob e em células mononucleares no OO, mas menos em C e Ob no osso ectópico de articulações. C, Ob, bone-linning cells, Oc e oc foram fortemente marcados em costelas de recém-nascidos (Bord et al., 1999). Altos níveis de mRNA em casos de OAr do que no tecido normal (Su et al., 1999). Imunolocalizada na cartilagem normal e em casos de OAr e o complexo MMP-1/TIMP-1 em baixas concentrações no LS na OAr (Kanyama et al., 2000). mRNA diminuído em casos de OAr (Kevorkian et al., 2004). Imunolocalizada em C de todas as zonas na PC, Ob e Oc em ossos longos de crianças e adolescentes (Haeusler et al., 2005).	Coelho: mRNA detectado em condrócitos da PC (Brown et al., 1989). Coelho: secretada por Oc quando estimulada por IL-1α *in vitro* (Hill et al., 1994). Rato: mRNA não é alterado em Ob de calvária tratados com IGF-I e –II (Canalis et al., 1995). Boi: não protege a degradação da cartilagem em cultura primária quando estimulada com IL-1 (Oleksyszyn e Agustine, 1996). Coelho: estimula a reabsorção óssea por Oc *in vitro* (Shibutani et al., 1999). Rato: fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) estimula a produção de mRNA em Ob *in vitro* (Onodera et al., 2002). Rato: mRNA localizado em OB e oc durante a formação óssea aposicional *in vitro* (Hatori et al., 2004).
2	mRNA detectado em áreas de formação óssea da periferia das costelas em embriões E13 (Mattot et al., 1995). mRNA localizado em células osteogênicas e condrogênicas da costela em animais de 13 a 16 dias de vida. Os níveis de transcritos permanerecam os mesmos durante e embriogênese e após o nascimento. C e células mesenquimais do pC da costela foram imuno-marcados (Kinoh et al., 1996). mRNA presente em ob *in vitro* (Uchida et al., 2000).	-	Complexo MMP-2/TIMP-2 secretado por células sinuviais (Kolkenbrock et al., 1991) para o LS em casos de AR (Osthues et al., 1992; Cawston et al., 1993). Cultura de Ob: todas as linhagens expressam constitutivamente e a sua expressão não é estimulada (Rifas et al., 1994). Detectada em cultura primária de Ob de osso normal e com artrite (Meikle et al., 1995). C OAr e LS expressam mRNA constitutivamente (Zafarullah et al., 1996). Tratamento de bifosfonato e esta proteína inhibem a osteólise em cancer ósseo provocado pelo câncer de mama (Yoneda et al., 1997). Mesmos níveis de mRNA em casos de OAr do que na cartilagem normal (Su et al., 1999). Imunolocalizada na cartilagem normal e em casos de OAr (Kanyama et al., 2000). Imunolocalizada em CH e Ob em ossos longos de crianças e adolescentes (Haeusler et al., 2005).	Boi: C normais e do LS expressam mRNA constitutivamente (Zafarullah et al., 1996). Coelho: estimula a reabsorção óssea por Oc *in vitro* (Shibutani et al., 1999). Rato: mRNA localizado em Ob e oc durante a formação óssea aposicional *in vitro* (Hatori et al., 2004).

	mRNA localizado no pC do MC (E14), pC próximo aos locais de invasão celular e vascular inicial e final (E15) (Colnot e Helms, 2001). Inibe a transdiferenciação de Ob em oc *in vitro* (Karsdal et al., 2004).			
3	Expressa no osso e na cartilagem embrionária (Apte et al., 1994). mRNA estimulado por IL-1β e TNF-α em Ob *in vitro* (Uchida et al., 2000). mRNA localizado pC próximo aos locais de invasão celular e vascular inicial (E15) e nas células que migram para formar a MO e PC (Colnot e Helms, 2001).	-	Regulada positivamente por IL-1β e TGF-β em fibroblastos sinuviais (DiBattista et al., 1995; Gatsios et al., 1996). mRNA expresso em condrócitos em casos de OA e regulada positivamente por TGF-β *in vitro* (Su et al., 1996). Altos níveis de mRNA em casos de OAr do que no tecido normal e mRNA e proteína induzidos por TGF-β (Su et al., 1999). mRNA aumentado em casos de OAr (Kevorkian et al., 2004).	Boi: mRNA expresso por C e regulada positivamente por TGF-β *in vitro* (Su et al., 1996). Boi: Indução por oncostatina M em C (Li e Zafarullah, 1998). Boi: mRNA e proteína induzidos por TGF-β em C *in vitro* (Su et al., 1999). Rato: mRNA localizado em Ob e oc durante a formação óssea aposicional *in vitro* (Hatori et al., 2004).
4	-	-	Imunolocalizada mais em casos de OAr do que em AR, entretanto mais transcritos foram encontrados nos casos de artrite (Huang et al., 2002). mRNA diminuído em casos de OAr (Kevorkian et al., 2004).	

Objetivos

2 – Objetivos

Este trabalho pode fornecer informações relevantes sobre o mecanismo molecular e celular envolvidos na degradação da MEC e, portanto, no desenvolvimento adequado do reparo tecidual ou remodelação óssea, bem como da odontogênse. Nossos estudos podem, eventualmente, resultar em informações que indiquem novas direções que auxiliem no tratamento de perdas ósseas extensas ou, pelo menos, na melhor compreensão desses fenômenos.

Este projeto representa ainda a consolidação de uma abordagem integrada de problemas relevantes na área de Biologia Celular e Molecular, através da colaboração entre o Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Profa. Dra. Mari Sogayar do IQ-USP, Laboratório do Dr. Makoto Noda da Faculdade de Medicina da Universidade de Kyoto, Japão (que primeiro isolou e vem caracterizando a proteína RECK) e os Laboratórios de Bioquímica e Histologia da FOB-USP, colaboração esta iniciada em 1999 através de um projeto conjunto apoiado pela Fapesp (99/10655-5). Caso se comprove a participação do produto do gene RECK nos processos de calcificação biológica a serem estudados neste projeto, uma importante interação poderá ser formada com o Hospital de Pesquisa e Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC), da USP, referência internacional no tratamento dessas anomalias.

A colaboração com o Prof. Magloire, da Faculdade de Odontologia de Lyon, foi muito importante para o grupo uma vez que o referido pesquisador atua especificamente na compreensão dos fenômenos envolvidos na odontogênese e mineralização biológica. Desta forma, nós tivemos os seguintes objetivos específicos neste trabalho:

1. Avaliação temporal e espacial da expressão protéica das MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e RECK durante a formação do incisivo de ratos adultos por imunohistoquímica.
2. Avaliação temporal e espacial da expressão protéica e gênica das MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e RECK durante o desenvolvimento crânio-facial em embriões de camundongo por imunohistoquímica e hibridização *in situ*.
3. Avaliação temporal e espacial da expressão protéica e gênica das MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e RECK durante a ossificação endocondral em embriões de camundongo por imunohistoquímica e hibridização *in situ*.

Materiais e Métodos

3 - Materiais e Métodos

3.1 - Animais e Coleta dos Tecidos

3.1.1 - Tecidos Embrionários

Camundongos Suíços fêmeas e machos adultos foram utilizados para o acasalamento. As fêmeas gestantes foram mortas de 13 a 20 dias (E13 – E20) após o cruzamento (dia zero estabelecido após a formação do *plug* vaginal) bem como os recém-nascidos de 1 dia de vida (PN1) (Figura 3.1). Os tecidos embrionários foram dissecados e processados de acordo com os protocolos para análise histológica, imunohistoquímica, *Real Time PCR* e zimografia em gel.

Camundongos fêmeas gestantes OF1 (E13 - E20) e recém-nascidos PN1 foram mortos e os tecidos embrionários dissecados e processados de acordo com o protocolo para hibridização *in situ*.

3.1.2 - Tecidos Adultos

Ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar de 50 dias de idade tiveram a mandíbula retirada e hemi-seccionada através de uma incisão na sínfise da linha média. As hemi-mandíbulas foram processadas de acordo com os protocolos para análise histológica e imunohistoquímica.

Ratos machos da linhagem OFA de 2 dias de idade (PN2) foram mortos e a mandíbula foi processada conforme descrito acima, dissecados e as hemi-mandíbulas foram processadas de acordo com o protocolo para hibridização *in situ*.

Todos os animais foram mortos por dose excessiva de éter. Camundongos Suíços e ratos Wistar foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, FOB-USP. Já os animais das linhagens OF1 e OFA foram adquiridos do

Laboratório Charles River (Lyon, França). Todos os animais receberam ração e água *ad libitum*.

3.2 - Processamento dos Tecidos

3.2.1 - Tecidos Parafinados

Os tecidos embrionários foram fixados em formaldeido a 10% em tampão fosfato em pH neutro, por 24h, desidratados em soluções de concentrações crescentes de álcool etílico (70% e 100%), diafanizados em xilol e incluídos em parafina sintética Histosec® (Merck, Darmstedt, Alemanha).

Os tecidos adultos foram processados como descrito acima, porém fixados por 48h e desmineralizados em solução de EDTA (solução contendo 4,13% de Tritriplex III® e 0,44% de Hidróxido de Sódio – Merck, Darmstedt, Alemanha), por 4 semanas, após a fixação.

Todos os blocos parafinados foram seccionados (5µm) em Micrótomo Leica (Laboratório de Histologia, FOB/USP), os cortes colocados sobre lâminas de vidro ou silanizadas Super-Frost Plus® (Erviegas, São Paulo, Brasil) e utilizados para a análise histológica e imunohistoquímica, respectivamente.

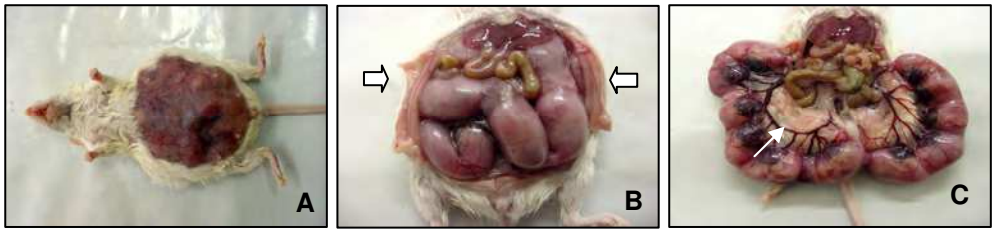


Figura 3.1: *Coleta dos embriões de camundongo. (A) Tricotomia da região ventral da fêmea gestante para a coleta dos embriões; (B) Incisão ventral e rebatimento da pele (setas) para exposição dos cornos uterinos; (C) Remoção dos cornos uterinos para a remoção dos embriões (seta).*

3.2.2 - Tecidos Congelados

Após a dissecção dos tecidos, eles foram embebidos imediatamente em Tissue-Tek® O.C.T. - Coumpound (4583 - Sakura), congelados em isopentano (Merck, Darmstedt, Alemanha) resfriado em nitrogênio líquido, e armazenados em biofreezer à –80°C. Todas os blocos congelados foram seccionados (10 µm) em Criostato Leica (CeCIL - Centre Commun d'Immagerie, Faculté de Médicine Läennec, Université Claude Bernard – Lyon 1), colocados sobre lâminas silanizadas RNAse *free* e armazenadas em biofreezer à –80°C.

3.3 - Histoquímica

Secções semi-seriadas de todos os tecidos analisados foram coradas em Tricômico de Masson (Martoja e Martoja-Pierson, 1970).

3.4 - Imunohistoquímica

3.4.1 - Padronização dos Anticorpos

Os anticorpos primários foram testados em diferentes concentrações e as imunomarcações foram classificadas de ausente a muito forte (escores de 0 a 4, análise subjetiva), resumida no Quadro 3.1.

Quadro 3.1: Padronização da concentração dos anticorpos primários.

Anticorpo	***Concentração***					
	1:25	***1:50***	***1:100***	***1:200***	***1:500***	***1:1000***
MMP-2	-	4	4	**3**	2	2
MMP-9	-	4	**3**	2	2	1
RECK	-	4	**3**	2	2	1
TIMP-1	**3**	2	2	-	-	-
TIMP-2	-	-	5	4	**3**	2

Escore: 1: ausente; 2: fraco; 3: moderado; 4: forte; 5: muito forte e indistinguível do background.

MMPs

Biópsias de câncer de mama humana (fornecidas pelo Serviço de Patologia do Hospital de Base – Bauru, SP, Brasil) foram utilizadas como controle positivo para as MMPs -2 e -9. As enzimas foram localizadas nas células do epitélio neoplásico e fibroblastos do tecido conjuntivo (Figura 3.2), conforme descrito por Monteagudo e colaboradores (1990).

RECK

Embriões de camundongo (E16) foram usados como controle positivo para RECK. Algumas imunomarcações encontradas correspondem as descritas na literatura, como em células musculares (Echizenya et al., 2005), células endoteliais e tecidos mesenquimais em geral durante o desenvolvimento (Oh et al., 2001). Identificamos outros tipos celulares imunopositivos para RECK, principalmente aqueles envolvidos na condrogênese e epitélio pavimentoso estratificado (Figura 3.3).

TIMPs

Órgãos de camundongos adultos foram utilizados como controle positivo para a TIMP-1 (rim) e TIMP-2 (fígado). Como relatado na literatura, a TIMP-1 foi localizada nos glomérulos renais e a TIMP-2 nos hepatócitos (Figura 3.4), segundo Uchio-Yamada e colaboradores (2005) e Roeb e colaboradores (1995), respectivamente.

Nós testamos dois tipos diferentes de controle negativo: (I) substituição do anticorpo primário pela solução de PBS/BSA a 0,1%; e (II) substituição do anticorpo primário pelo soro normal não-imunizado do animal no qual o anticorpo foi produzido (Quadro 3.2). Em ambos os casos, nenhuma marcação inespecífica foi detectada.

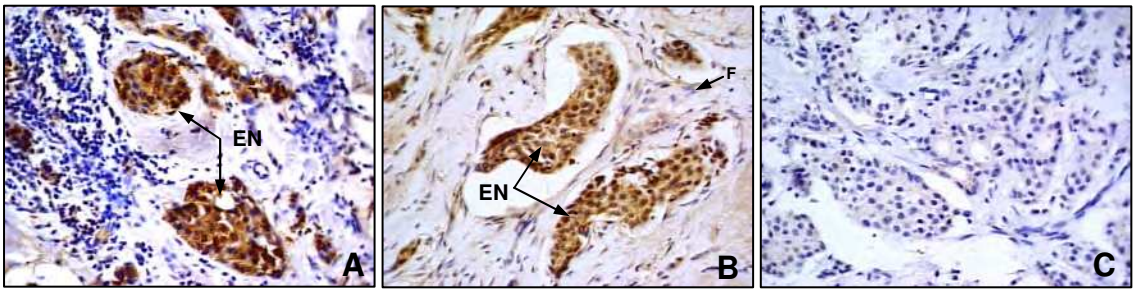


***Figura 3.2**: Câncer de mama humano. Imunolocalização da MMP-2 (A) e MMP-9 (B) nas células do tecido epitelial glandular, bem como em alguns fibroblastos. (C) Controle negativo. Aumento de 40x. EN: epitélio neoplásico, F: fibroblastos.*

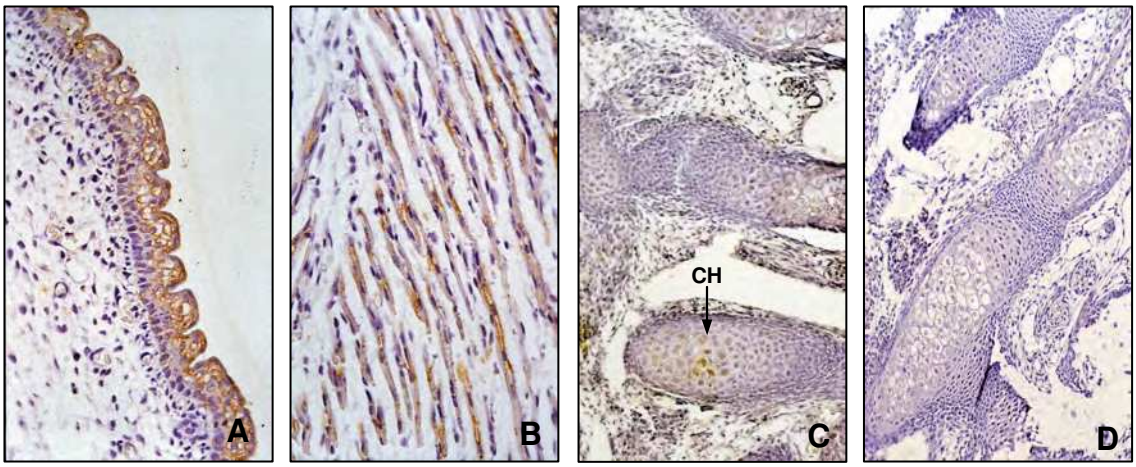


***Figura 3.3:** Embriões de camundongo (E16). (A) Imunolocalização de RECK no epitélio pavimentoso estratificado, (B) no tecido muscular e (C) nos condrócitos das vértebras. (D) Controle negativo da coluna vertebral. Aumento 10x (A, C-D) e 40x (B). CH: condrócitos hipertróficos.*

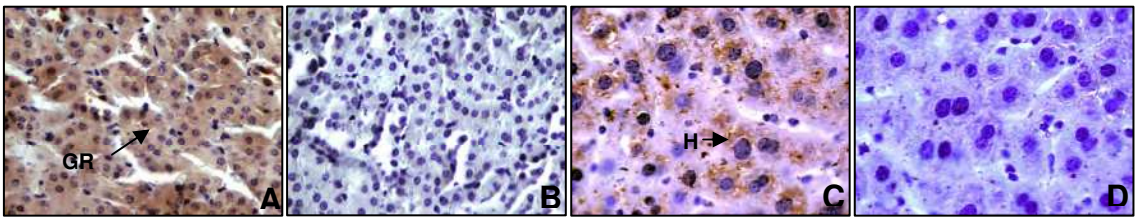


***Figura 3.4:** Órgãos de camundongo adulto. (A) Imunolocalização de TIMP-1 nos glomérulos renais e (C) TIMP-2 nos hepatócitos. (B e D) Controles negativos. Aumento 40x (A-B) e 100x (C - D). GR: glomérulos renais e H: hepatócitos.*

Todos os anticorpos primários utilizados foram fabricados a partir do peptídeo que codifica a região C-terminal da proteína (exceto as TIMPs) e purificados por imuno-afinidade. Anti-RECK reconhece o domínio GPI originário da seqüência de camundongo e as anti-MMPs utilizadas reconhecem o domínio hemopexina da MMP-2 (originária da seqüência humana que é idêntica à de camundongo) e da MMP-9 (seqüência de camundongo). A anti-TIMP-1 foi produzida a partir da proteína recombinante de camundongo (rmTIMP-1) e a anti-TIMP-2 da proteína humana, mas reconhece a TIMP-2 em diversas espécies (humano, rato, camundongo, coelho, porquinho-da-Índia e vaca).

Quadro 3.2: Soros normais não-imunizados utilizados como controle negativo.

Anticorpo Primário	*Animal Hospedeiro*	*Soro Normal*	*Empresa*	*Código*	*Concentração*
MMP-2 ***(Policlonal Goat anti-human)***	*Goat*	*Goat*	Santa Cruz Biot. Inc.	Sc-2028	1:100 (1,0 µg/mL)
MMP-9 ***(Policlonal Goat anti-mouse)***	*Goat*	*Goat*	Santa Cruz Biot. Inc.	Sc-2028	1:50 (2,0 µg/mL)
RECK ***(Policlonal Goat anti-mouse)***	*Goat*	*Goat*	Santa Cruz Biot. Inc.	Sc-2028	1:50 (2,0 µg/mL)
TIMP-1 ***(Policlonal Goat anti-mouse)***	*Goat*	*Goat*	Santa Cruz Biot. Inc.	Sc-2028	1:50 (2,0 µg/mL)
TIMP-2 ***(Policlonal Rabbit anti-human)***	*Rabbit*	*Rabbit*	Santa Cruz Biot. Inc.	Sc-2027	1:50 (2,0 µg/mL)

3.4.2 - Imuno-Marcações para as MMPs e RECK (Tecidos Embrionários)

As secções foram desparafinadas em xilol, reidratadas em soluções de concentrações decrescentes de álcool etílico (100, 95 e 70%) e o bloqueio de cargas com solução aquosa de Bórax a 1% por 15 min. A peroxidase endógena foi bloqueada por incubação em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em PBS (Merck, Darmstedt, Alemanha), por 45 min, recuperação antigênica por calor em tampão citrato-fosfato, pH 6,0 a 93-96°C (P4809, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e bloqueio das ligações inespecíficas com solução de leite desnatado a 4% por 20 min. Incubação em anticorpo primário *overnight* a 4°C e em anticorpo secundário (Quadro 3.3) por 1h em temperatura

ambiente, Complexo Streptoavidina-Biotina/HRP *duet, mouse/rabbit* (K0492, DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca), por 45 min, revelação com cromógeno 3,3´-diaminobenzidina (DAB) (K3466, DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) e contra-coloração com Hematoxilina de Harris.

3.4.3 - Imuno-Marcações para as MMPs e RECK (Tecidos Adultos)

Utilizou-se o mesmo protocolo descrito no item 3.4.2, porém a recuperação antigênica foi realizada por digestão enzimática com tripsina a 0,25% por 10 min em temperatura ambiente e o bloqueio de ligações inespecíficas com solução de PBS/BSA a 1% por 1h.

3.4.4 - Imuno-Marcações para TIMPs (Tecidos Embrionários)

As secções foram desparafinadas em tolueno, reidratadas em soluções de concentrações decrescentes de álcool etílico (100% e 70%) e o bloqueio de cargas com solução aquosa de Bórax a 1% por 15 min. A peroxidase endógena foi bloqueada por incubação em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em PBS (Merck, Darmstedt, Alemanha), por 45 min, recuperação antigênica por calor em tampão citrato-fosfato, pH 6,0 a 93-96°C (P4809, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e bloqueio das ligações inespecíficas com solução de soro normal bloqueador (Vectastain® Elite ABC Kit, CA, EUA - Quadro 3.4) em PBS/BSA a 0,1%, por 20 min. Incubação em anticorpo primário *overnight* a 4°C e em anticorpo secundário (Vectastain® Elite ABC Kit) por 30 min em temperatura ambiente, Complexo Streptoavidina-Biotina (Vectastain® Elite ABC Kit, CA, EUA), por 30 min, revelação com cromógeno DAB (D5905, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e contra-coloração com Hematoxilina de Harris.

3.4.5 - Imuno-Marcações para TIMPs (Tecidos Adultos)

Utilizou-se o mesmo protocolo descrito no item 3.4.4, porém a recuperação antigênica foi realizada por digestão enzimática com tripsina a 0,25% por 10 min em temperatura ambiente e o bloqueio de ligações inespecíficas com solução de PBS/BSA a 1% por 1h.

Todas as lavagens foram efetuadas em solução de PBS/Triton X-100 à 0,1% (3 vezes por 5 min) e os anticorpos diluídos em PBS/BSA à 0,1%.

Quadro 3.3: Lista dos anticorpos utilizados em imunohistoquímica.

Anticorpo	*Especificações*	*Código*	*Empresa*	*Especificidade*	*Diluição*
MMP-2	*Policlonal Goat anti-human*	C-19, sc 6838	Santa Cruz Biot. Inc.	C, R e H	1:200 (1,0 µg/mL)
MMP-9	*Policlonal Goat anti-mouse*	M-17, sc 6841	Santa Cruz Biot. Inc.	C, R e H	1:100 (2,0 µg/mL)
RECK	*Policlonal Goat anti-mouse*	S-18, sc 9689	Santa Cruz Biot. Inc.	C e R	1:100 (2,0 µg/mL)
TIMP-1	*Policlonal Goat anti-mouse*	AF980	R&D Systems Inc.	C	1:25 (2,0 µg/mL)
TIMP-2	*Policlonal Rabbit anti-human*	RB-1489	LabVision Corp.	C, R, H, Co, V, PI	1:500 (2,0 µg/mL)
Secundário	*Policlonal Rabbit anti-goat*	31732	Pierce Biotechnology	*Goat*	1:20 (6,0 µg/mL)
Secundário	*Policlonal Rabbit anti-goat*	PK-6105	Vector Laboratories	*Goat*	1:10 (15,0 µg/mL)
Secundário	*Policlonal Goat anti-rabbit*	PK-6101	Vector Laboratories	*Rabbit*	1:10 (15,0 µg/mL)

C= camundongo; **R=** rato; **H=** humano; **Co**= coelho; **V=** vaca; **PI=** porquinho-da-india.

Quadro 3.4: Vectastain® Elite ABC Kit utilizados.

Kit	*Código*	*Soro Normal Bloquedor*	*Anticorpo Secundário*	*Anticorpo Primário*
***Goat* IgG**	PK-6105	*Rabbit*	*Policlonal Rabbit Anti-Goat*	TIMP-1
***Rabbit* IgG**	PK-6101	*Goat*	*Policlonal Goat Anti-Rabbit*	TIMP-2

3.5 - Hibridização *in situ*

3.5.1 – Desenho das Sondas

Os *primers* foram desenhados utilizando o *software* Oligo 4, a partir da seqüência Fasta (mRNA) de camundongo (*Mus musculus*) (Pubmed) para RECK (NM 016678). As sondas utilizadas como controle positivo já haviam sido desenhadas: colágeno tipo I (α1)

(Andujar et al., 1991) e osteocalcina (Bleicher et al., 1999). Todos os *primers* tiveram suas especificidades verificadas através do alinhamento com os mRNAs de diversas espécies depositados no GenBank (Blast – Pubmed) e foram fabricados pela Invitrogen™ (França) (Quadro 3.5).

Quadro 3.5: Seqüência dos *primers* utilizados na geração das sondas para hibridização *in situ*.

cDNA Alvo		*Primers (5' → 3')*	*Tamanho do Primer (pb)*	*Posição*	*Especificidade*	*Temperatura de Hibridização (°C)*	*Tamanho do Fragmento Amplificado (pb)*
RECK	F	TCT GCA GGG GAA GTT GGT TG	20	1648 (5')	C, R e H	55,8	323
	R	ATG CAG GCA CTG GGG TAA GT	20	1951 (3')			

C = camundongo; **R =** rato e **H =** humano.

3.5.2 - Geração dos *Templates*

RNA total de cabeças de embriões de camundongos de 14,5 dias de vida intra-uterina foi extraído, utilizando o *Kit NucleoSpin® RNA II* (740955, Macherey-Nagel GmbH, Düren, Alemanha), para a geração dos DNAs complementares para RECK, colágeno tipo I (α1) e osteocalcina. Os cDNAs foram amplificados a partir de 4,0 µL de RNA total, contidos em 100 µL de solução final de 1,0 µL de dXTP (10 mM), 2,5 µL de DTT, 1,5 µL de cada *primer* (15 µM) (Quadro 3.4), 10 µL de Tampão (5X) com $MgCl_2$, 1,0 µL de enzima, presentes no *Kit Titan One Tube RT-PCR System* (11855476001, Roche Diagnostics GmbH, Alemanha), e água q.s.p.. A amplificação foi realizada em 30 ciclos e a migração dos produtos da PCR em gel de agarose a 2% com brometo de etídio (E1385, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) em tampão TBE a 1%.

Os cDNAs foram purificados por purificação em gel (Figura 3.2). Inicialmente, 100 µL de produto da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídio, em seguida, as bandas fluorescentes correspondentes aos

oligonucleotídeos estudados foram recortadas e purificados do gel em tampão TBE a 0,5% por 1h30min à 200V através de membranas permeáveis (BT2 *Elutrap Membrane*, 10404091, Schleicher & Schuell, Alemanha) e impermeáveis (BT1 *Elutrap Glycerinized Membrane*, 10404090, Schleicher & Schuell, Alemanha).

O material purificado foi precipitado em tampão acetato 3 mM (volume correspondente a 1/10 do volume recuperado) e álcool etílico absoluto à –20°C (volume correspondente à 2x o volume do recuperado + o tampão acetato), *overnight* à –20°C. Após a precipitação, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm a 4°C por 25 min, o sobrenadante, então, foi desprezado e 500 µL de álcool etílico 70% à –20°C foram adicionados e uma nova centrifugação foi efetuada por 20 min (Centrífuga 2K15 e rotor n.12145, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* obtido foi recuperado em 15 µL de água, após a evaporação total do álcool, e armazenado à –80°C.

3.5.3 - Teste das Sondas

Cada cDNA amplificado foi visualizado após a migração em gel de agarose a 2% em tampão TBE a 1%. O fragmento de RECK foi digerido por enzima de restrição específica (45 min a 37°C, Quadro 3.6) e os fragmentos obtidos foram comparados ao marcador de pares de bases Standard pUC Mix Marker 8 (SM0301, MBI Fermentas) (Figura 3.6).

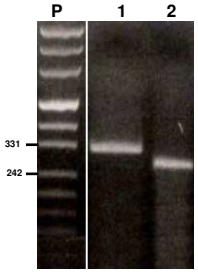


Figura 3.6: *Gel de agarose a 2% com o fragmento de cDNA amplificado de (1) RECK (323 pb) por RT-PCR e (2) o fragmento digerido enzimaticamente (265 pb). P: marcador de pares de base pUC mix marker 8.*

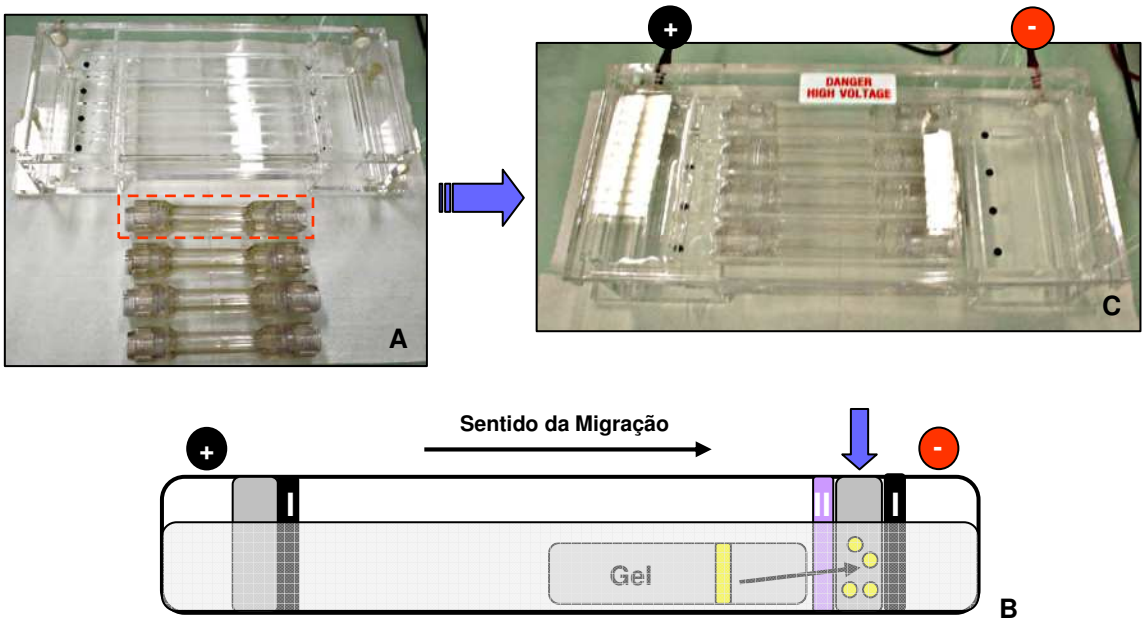


Figura 3.5: *Representação esquemática da técnica de purificação em gel (eletro-eluição) dos oligonucleotídeos. (A) Cuba de acrílico com quatro canaletas para a colocação dos suportes contendo os géis. (B) Detalhe do suporte onde duas membranas impermeáveis são colocadas nas extremidades do suporte (I) e uma membrana permeável e colocada na local de contato com o pedaço do gel de agarose contendo a sonda (II). Após a migração, a sonda estará concentrada entre as duas membranas e poderá ser recolhida para a precipitação. (C) Representação da cuba fechada e conectada a fonte de energia.*

Quadro 3.6: Enzima de restrição utilizada para a verificação da especificidade da sonda de RECK para hibridização *in situ*.

Primer	*Produto PCR (pb)*	*Enzima*	*Empresa*	*Tipo de Corte*	*Posição*	*Fragmentos (pb)*
RECK	323	Hin6I	ER0481 - MBI Fermentas	GC (5' → 3') CG (3' → 5')	265 323	265 58

3.5.4 - Quantificação das Sondas

A quantificação das sondas foi realizada pela comparação da intensidade da banda purificada por eletro-eluição ao padrão de pares de base Mass Ruler™ - DNA Ladder, Low Ranger (SM0383 – MBI Fermentas). A primeira coluna indica o tamanho (pb) e a segunda a concentração do fragmento (ng/µL). Neste caso, obtive-se a banda similar

as bandas 7 ou 8 do marcador (3 ou 4 ng/µL), porém, uma vez que o volume de sonda utilizado foi 5x maior que o do padrão (5,0 µL), a concentração foi estimada entre 15 e 20 ng/µL (Figura 3.7).

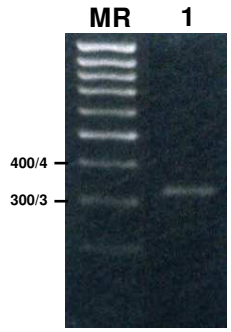


Figura 3.7: *Gel de agarose a 2% com (1) a sonda purificada de RECK quantificada (323 pb). MR: padrão de pares de base Mass Ruller.*

3.5.5 - Marcação das Sondas com Isótopo Radioativo

Cada sonda, *sense* (5') e *anti-sense* (3'), foi incorporada pelo isótopo radioativo ^{33}P (*Redivue ^{32}P-, ^{33}P- nucleotides*, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Alemanha) através de PCR assimétrica (*Kit Taq DNA Polymerase*, 1647679, Boehringer Mannheim,). Em cada tubo preparado, nós utilizamos um volume final de 50 µL com 5,0 µL Tampão (10X) do kit, 1,5 µL *primer* (15 µM), 1,0 µL dATP (1 mM), 1,0 µL dGTP (1 mM), 1,0 µL dTTP (1 mM), 8,5 µL dCTP (10 µM), 5,0 µL dCT^{33}P (10 µCi/µL), 1,0 µL enzima do kit (5 U/µL), água q.s.p. e a sonda correspondente (25 ng/µL). A amplificação foi realizada em 10 ciclos: (I) 94°C (1 min); (II) 50°C (1 min); (III) 72°C (1 min); (IV) 72°C (10 min); (V) 4°C (15 min). A reação de PCR foi interrompida pela adição de 5,0 µL de EDTA a 0,2 M.

3.5.6 – Verificação da Incorporação do Isótopo Radioativo

A quantificação da atividade específica das sondas incorporadas com o isótopo radioativo foi realizada no Cintilador Beckman LS6500 (*Multi-purpose scintillation counter*).

Nós preparamos 2 tubos diferentes para cada sonda, um para verificar a radioatividade total e outro para a radioatividade incorporada.

Para a radioatividade total, diluiu-se 1,0 µL da sonda marcada 100X em água (1), em seguida, pegou-se 1,0 µL desta diluição (2) e adicionou-se 5,0 mL de *Ready Safe* e foi quantificada no Cintilador (Figura 3.8).

Para a radioatividade incorporada (atividade específica - AE), precipitou-se 1,0 µL da solução diluída (1) em 4,0 µL DNA dupla hélice (*Deoxyribonucleic acid from herring sperm* – D7290, Sigma-Aldrich,USA), 200 µL água e 400 µL de TCA a 10% (3) por 15 min em gelo. Em seguida, esta solução foi filtrada (4) (sistema de filtragem Millipore – *Glass Microanalysis Filter Holders*, 10.025.00 - e membranas de 0,45 µM e 25 mm - *MF™ Membrane Filters - mixed cellulose and esters* - HAWP02500) e a membrana lavada com 1,0 mL de TCA a 5% (3 vezes). O filtrado foi descartado apropriadamente e a membrana foi seca a temperatura ambiente (5). Finalmente, (6) a membrana foi imersa em 5,0 mL de *Ready Safe* e quantificada em Cintilador (Figura 3.8). Após a contagem, a AE foi calculada pela seguinte equação: AE = X cpm x 54 x 100, onde *X* é a quantidade de radioatividade detectada pelo equipamento. Os valores de AE aceitáveis devem estar entre 20 e 40 x 10^6 cpm.

As sondas utilizadas apresentaram atividade específica (cpm) em torno de 10 x 10^6 (col I), 12 x 10^6 (osteocalcina) e 14 x 10^6 (RECK).

3.5.7 – Precipitação das Sondas Radioativas

O volume restante da sonda radioativa (54 µL de cada) foi adicionado de (1) 25 µL (250 µg) de tRNA (10 mg/mL) (R5636, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e 160 µL de álcool absoluto (-20°C) para a precipitação durante 2h a -20°C. Após a precipitação, (2) as sondas foram centrifugadas a 13.000 rpm a 4°C por 20 min. Em seguida, (3) o

sobrenadante foi descartado delicadamente, adicionou-se 200 µL de álcool etílico a 70% (-20°C) e uma nova centrifugação foi realizada por 20 min. Finalmente, (4) o sobrenadante final foi descartado e a sonda precipitada (*pellet*) foi seca a temperatura ambiente (Figura 3.9).

3.5.8 - Teste das Sondas Controles – Colágeno tipo I (α1) e Osteocalcina

As sondas para o colágeno tipo I (α1) e da osteocalcina foram utilizadas como controle positivo da reação em germes dentários de camundongo e rato. O resultado encontrado para cada uma delas já foi reportado na literatura (Andujar et al., 1991; Bleicher et al., 1999). As sondas sense (5') apresentaram nenhum ou baixo *background* e são o controle negativo da reação (Figura 3.10 e 3.11).

3.5.9 – Preparação das Lâminas RNAse *Free*

As lâminas de vidro limpas foram embaladas em papel alumínio, esterilizadas a seco em estufa a 180°C por 8h, resfriadas e finalmente silanizadas em solução de silano (A3648, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) a 2% em acetona (2 min) e lavadas (3vezes) em água ultrapura (2 min cada). Após a secagem, as lâminas foram mantidas em laminários RNAse *free*.

3.5.10 - Pré-Tratamento das Lâminas

As criosecções foram descongeladas a temperatura ambiente (2h aproximadamente), reidratadas em PBS (2 vezes e 2 min cada) e fixadas em paraformaldeído a 4% em PBS por 15 min. Em seguida, as lâminas foram

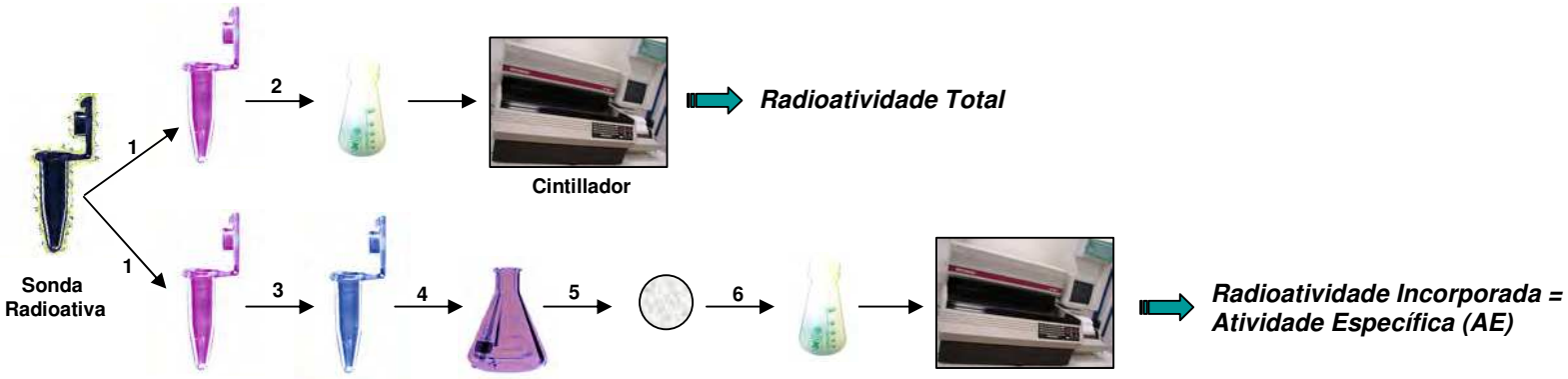


Figura 3.8: *Representação esquemática da verificação da radioatividade total e incorporada pelas sondas para HIS. (1) Diluição da sonda radioativa 100x em água; (2) 1µL da sonda diluída + Ready Safe; (3) 1µL da sonda diluída + TCA a 10% + DNA dupla hélice; (4) Filtração da sonda precipitada e lavagem em TCA a 5%; (5) Secagem da membrana com a sonda radioativa; (6) Imersão da membrana em Ready Safe.*

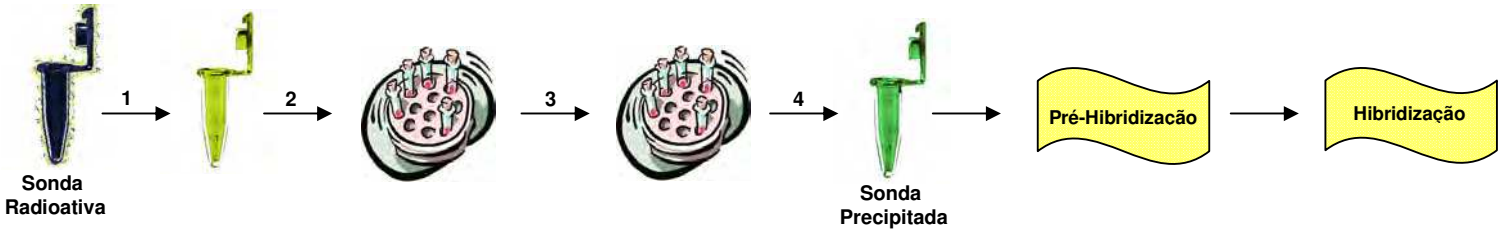


Figura 3.9: *Representação esquemática da precipitação das sondas radioativas para HIS. (1) Diluição da sonda radioativa em tRNA + álcool 100% e precipitação a -20°C; (2) Centrifugação, eliminação do sobrenadante e adição de álcool 70%; (3) Centrifugação, eliminação do sobrenadante; (4) Evaporação completa do álcool e a sonda radioativa precipitada (concentrada).*

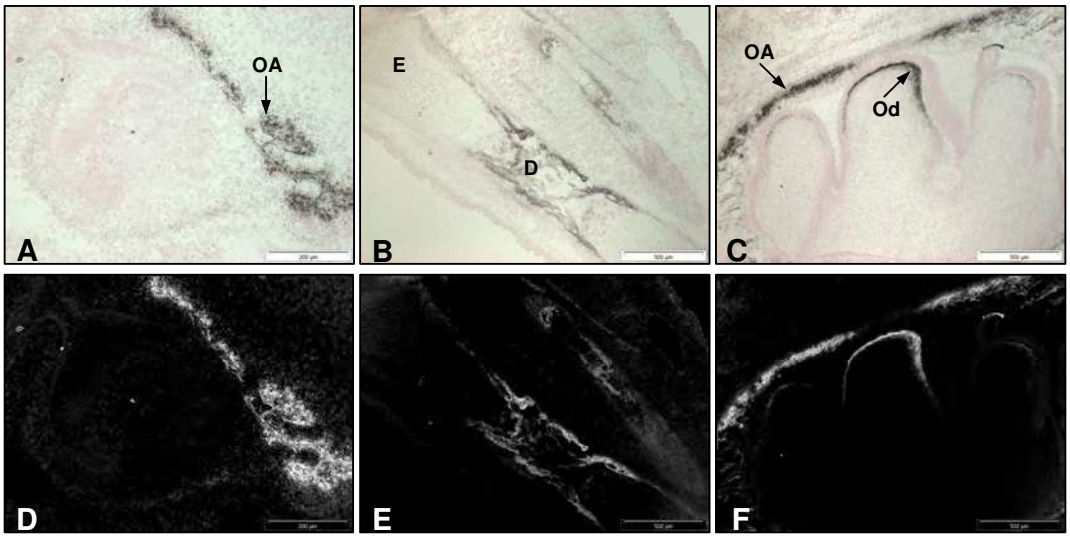


Figura 3.10: *Hibridização in situ para o colágeno tipo I (α1). (A) Localização do mRNA no osso alveolar ao redor do germe dentário (molar). (B) Altos níveis de mRNA localizado na diáfise do fêmur, periósteo e ligamentos do joelho. Ambas as fotos são de embriões de camundongo (E16). (C) Em ratos com 1 dia de vida (PN1), mRNA localizado no osso alveolar em torno do germe dentário (molar) e em odontoblastos secretores. (D-F) Fotomicrografias em preto e branco. D: diáfise, E: epífise, OA: osso alveolar e Od: odontoblastos.*

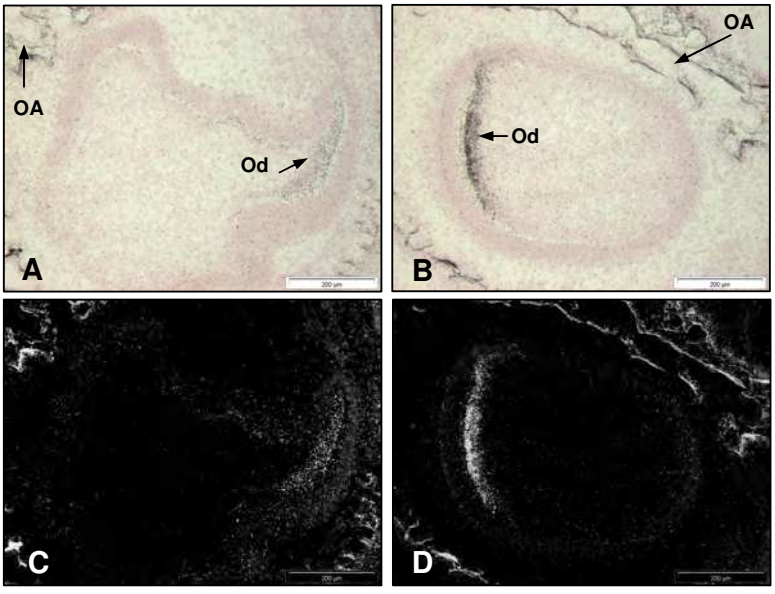


Figura 3.11: *Hibridização in situ para a osteocalcina. (A) Localização do mRNA da osteocalcina em odontoblastos secretores e no osso alveolar ao redor do germe dentário (molar). (B) Mesmo padrão de distribuição do mRNA em incisivos. Ambas as fotos são em embriões de camundongo (E18). (C-D) Fotomicrografias em preto e branco. OA: osso alveolar e Od: odontoblastos.*

desidratadas em soluções de concentrações crescentes de álcool etílico (50, 70, 95 e 100%) e secas a temperatura ambiente.

3.5.11 - Pré-Hibridização

As lâminas foram pré-hibridizadas em câmara húmida a 37ºC durante 2h em forno de hibridização. O tampão de pré-hibridização continha 1 mL de formamida desionizada (50%) (F7508, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 20 µL $NaPO_4$ (pH 7,4 a 2M), 200 µL de tampão SSC (2X) (S8015, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 50 µL de EDTA (0,2M), 100 µL de solução de Denhart (50X) (D9905, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 40 µL de DNA desnaturado (Sigma-Aldrich), 20 µL de DNA dupla hélice (*DNA from herring sperm*, D7290, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 100 µL de tRNA (R5636, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e água q.s.p. para 2mL de solução final. Foram colocados cerca de 30 µL de tampão de pré-hibridização sobre cada lâmina e estas foram recobertas por lamínulas especiais pada hibridização *in situ* (*Hybri-Slips*, Z36590-4, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA).

Após a pré-hibridização, as lâminas foram lavadas rapidamente em tampão 2X SSC, desidratadas em soluções crescentes de álcool etílico (50, 70, 95 e 100%) e secas a temperatura ambiente.

A formamida foi desionizada momentos antes da preparação do tampão de pré-hibridização pela *Mixed Bed Resin* (M8032, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), no qual é composta por pequenas esferas azuis que mudam de cor (amarelo) quando o composto foi desionizado, após agitação.

3.5.12 – Hibridização

As lâminas foram hidridizadas em câmara húmida a 37ºC, *overnight* em forno de hibridização. O tampão de hibridização continha 1 mL de formamida desionizada (50%), 20 µL $NaPO_4$ (pH 7,4 a 2M), 200 µL de tampão SSC (2X), 50 µL de EDTA (0,2M), 100 µL de solução de Denhart (50X), 40 µL de DNA desnaturado, 500 µL de

solução de dextran sulfato a 10% (D7037, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), substituindo o tRNA, e água q.s.p. para 2mL de solução final. Para 500 µL de tampão de hibridização adicionou a sonda precipitada e 2,5 µL de DNA dupla hélice (desnaturado por 10 min em banho-maria). Foram colocados cerca de 30 µL de tampão de hibridização sobre cada lâmina e estas cobertas por lamínulas, como descrito no item 3.5.10. A desionização da formamida também está descrito no item 3.5.10.

3.5.13 – Lavagens e Desibridização

Após a hibridização, as lâminas foram lavadas com soluções de concentrações decrecentes de sais (salting-out) para a remoção das sondas que não se hibridizaram. Inicialmente, as lamínulas foram retiradas pela adição da solução de formamida (50%) e 2X SSC sobre cada lâmina para que as lamínulas flutuassem e não fragmentassem o tecido. Em seguida, elas foram lavadas 1 vez em solução de formamida (50%) e 2X SSC, 1 vez em solução de formamida (50%) e 1X SSC, 1 vez em 1X SSC e, finalmente, 2 vezes em 0,5X SSC. Cada lavagem foi realizada a 37ºC e sob agitação em banho termostatizado. As lâminas foram desidratadas em soluções crescentes de álcool etílico (50, 70, 95 e 100%) e secas a temperatura ambiente.

Todas as soluções utilizadas nas lavagens foram descartadas em recipientes apropriados para resíduos radioativos.

4.5.14 – Auto-radiografia

A emulsão (Hypercoat ™ LM-1, RPN40, Amersham Biosciences, Suécia) foi trazida à temperatura ambiente por 15 min e aquecida em banho termostatizado a 43°C por 15 min. Em seguida, a emulsão líquida foi homogeneizada e transferida para o recipiente de dipping localizado dentro do banho termostatizado já pré-aquecido (43ºC). Cada lâmina foi imersa por 5 seg na emulsão, em seguida, as bordas foram secas com o auxílio de lenços de papel (*Kim Wipe*) e, finalmente, as lâminas foram colocadas 45° em relação ao suporte e permaneceram por 1h. Cada conjunto de

lâminas (distribuídos conforme o tempo de exposição) foi distribuído dentro de laminários contendo sílica gel, vedados com fita adesiva e colocados dentro de caixas escuras que permaneceram em câmara fria a 4°C até a revelação.

Todo o dipping foi realizado em câmara escura e com o auxílio de luz vermelha (Kodak Wratten, n. 2).

3.5.15 – Revelação

Após a auto-radiografia, as lâminas sense e anti-sense foram expostas por 4 dias (col I e osteocalcina) e 10 dias (RECK). Após estes períodos, a coloração de fundo inespecífica (*background)* aumentava significativamente.

Após a exposição, os laminários foram trazidos à temperatura ambiente por 15 min antes da sua abertura. Em seguida, as lâminas foram imersas na solução de revelação (Revelador Kodak D19) por 4 min, mergulhadas rapidamente em solução de ácido acético (0,5 mL ácido/200 mL água), fixadas (Fixador Hypam, Ilford – 1:4) por 4 min, lavadas com água deionizada (3 vezes, 1min e 30seg cada), e, finalmente, as lâminas foram secas a temperatura ambiente.

Toda a revelação foi realizada em câmara escura e com o auxílio de luz vermelha (Kodak Wratten, n. 2).

3.5.16 – Contra-Coloração

As lâminas foram contra-coradas com Hemalun de Masson por 1 min, lavadas rapidamente em água, secas a temperatura ambiente e fechadas com lamínulas de vidro e resina.

Toda a vidraria utilizada durante toda a hibridização foram lavadas cuidadosamente, enxaguadas com água ultrapura, embaladas em papel alumínio e esterilizadas a seco em estufa a 180°C por 8h. Todos os reagentes utilizados também foram preparados com água ultrapura ou já eram RNAse *free*. Todas as reações foram

realizadas em laboratório autorizado e equipado para a utilização e armazenamento de compostos radioativos (Laboratório Prof. Magloire).

Resultados e Discussão

4 – Resultados e Discussão

4.1 – Formação do Incisivo do Rato Adulto

O estudo das proteinases envolvidas na formação do esmalte dentário sugere que as MMPs (MMP-20) podem ser mais importantes nos estágios iniciais da amelogênese, enquanto que as serino proteases seriam mais importantes nas fases finais deste processo (calicreína 4) (Overall e Limeback, 1988; Fukae et al., 1996; Tanabe et al., 1996; Robinson et al., 1998). Muitas MMPs têm sido observadas nos tecidos formadores do germe dentário em diversas espécies, mas, recentemente, a MMP-3 (Hall et al., 1999), MMP-2, MMP-9 (Goldberg et al., 2002, 2003), e MMP-20 (Bourd-Boittin et al., 2004) foram imuno-localizadas em incisivos de ratos. A detecção destas enzimas pode ser afetada dependendo do método de processamento do tecido (isto é, matriz do esmalte mineralizada ou desmineralizada), o tipo de dente estudado (molar ou incisivo), o tipo de anticorpo empregado e a espécie do modelo animal utilizado. As proteinases do esmalte estão presentes em pequenas quantidades e é muito difícil obter preparações puras do esmalte mineralizado. Esta é a primeira razão pela qual a pesquisa destas proteinases é difícil. Neste trabalho, nós utilizamos incisivos de ratos desmineralizados por EDTA para termos acesso a estas proteinases por imunohistoquímica. O EDTA é um conhecido quelante de cátions divalentes e pode inibir a atividade catalítica das MMPs, principalmente, em ensaios de zimografia *in situ* (revisado por Bartlett e Simmer, 1999). Entretanto, não há indícios de que esse processo possa alterar a conformação tridimensional das proteínas estudadas, principalmente, porque o tecido foi fixado antes deste processo.

Os resultados encontrados por imunohistoquímica durante a formação do incisivo de rato estão resumidos no Quadro 4.1. Os controles negativos dos anticorpos utilizados

estão representados na Figura 4.4B, na qual não foram detectadas reações inespecíficas dos anticorpos com o tecido em estudo.

Ameloblastos

A Fase Pré-secretora antecede a deposição da matriz do esmalte e onde encontramos pré-ameloblastos e pré-odontoblastos em diferenciação (Figura 4.4A). Os odontoblastos se diferenciam antes dos ameloblastos e começam a secretam a matriz dentinária e a lâmina basal começa a ser degradada. Durante este estágio nós não localizamos células imunopositivas para as MMPs, RECK ou TIMPs (Figura 4.4A). em oposição ao relato de que as MMP-3 (Hall et al., 1999), MMP-2, MMP-9 (Sahlberg et al., 1992; Heikinheimo e Salo, 1995) e MMP-20 (Bourd-Boittin et al., 2004) são expressas por estas células. As gelatinases têm sido relatadas como sendo importantes na degradação da junção amelo-dentinária (JAD) durante a odontogênese em camundongos (Sahlberg et al., 1992) e em incisivos de ratos adultos (Goldberg et al., 2002). As TIMPs foram localizadas, por microscopia eletrônica de transmissão, próximas a JAD em incisivos de ratos (Goldberg et al., 2003), mas nenhuma imuno-marcação por imunoperoxidase foi reportada.

Na Fase de Secreção, as MMPs foram imuno-localizadas na região infranuclear dos ameloblastos secretores, sendo que a MMP-2 foi menos intensa que a MMP-9 (Figura 4.1 A e B). As formas inativa e ativa das MMP-2 e MMP-9 já haviam sido detectadas neste mesmo local por Goldberg e colaboradores (2003) e estes sugerem que estas enzimas podem não estar distribuídas exclusivamente ao longo da via de secreção usual. A forte associação destas MMPs com proteínas do citoesqueleto, observadas por microscopia eletrônica de transmissão (Goldberg et al., 2003), pode indicar um possível mecanismo de secreção para a superfície celular onde estas enzimas podem ser ativadas

(Nagase, 1997; Nagase e Woessner, 1999), já que os receptores para estas proteases (Maquoi et al., 2000; Hernandez-Barrantes et al., 2000), bem como o receptor de membrana que medeia a sua internalização, a proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL-RP - *low density lipoprotein receptor-related protein*) já foram detectados na membrana plasmática (Maquoi et al., 2000; Jiang et al., 2001; Hahn-Dantona et al., 2001; Yang et al., 2001). É possível que as gelatinases encontradas no citoplasma representem as suas formas ativas ou internalizadas para a degradação de organelas citoplasmáticas, já que os ameloblastos sofrem mudanças celulares para se diferenciarem em ameloblastos pós-secretores (Reith, 1970). Ainda, a MMP-2 ativa foi detectada no núcleo e no citoplasma de miócitos cardíacos (Kwan et al., 2004).

Curiosamente, RECK foi também imuno-localizado na região infranuclear dos ameloblastos de secreção e difuso no citoplasma destas células (Figura 4.1C), entretanto não existem explicações para isto até o momento. RECK é uma glicoproteína extracelular ancorada a superfície celular através do domínio GPI. Como RECK pode se ligar as MMP-2 e MMP-9 (Takahashi et al., 1998; Oh et al., 2001; Rhee e Coussens, 2002), nós supomos que um complexo MMP/RECK pode ter sido estabelecido e internalizado na região infranuclear dos ameloblastos. RECK inibe a secreção da pró-MMP-9 e a atividade catalítica da sua forma ativa. RECK inibe também a atividade enzimática das MMPs -2 e -14 (MT1-MMP) e atua na inibição da pró-forma da MMP-2 antes da sua primeira etapa de ativação (conversão da pró-MMP-2 em MMP-2 intermediária). Embora o exato mecanismo molecular envolvendo a regulação da secreção e/ou da atividade enzimática por RECK não tenha sido totalmente explicado, interações diretas proteína-proteína são necessárias, mas a estequiometria destas interações é desconhecida (revisado por Rhee e Coussens, 2002).

Nós não detectamos as TIMPs nesta fase, entretanto há relatos de imuno-localização nos ameloblastos em incisivos de rato, por microscopia eletrônica de transmissão (Goldberg et al., 2003), e da formação do complexo MMP-20/TIMP-2 detectada por *western blot* (Bourd-Boittin et al., 2004).

Durante a Fase de Transição e Maturação, as MMPs foram menos imunolocalizadas em menor quantidade e se restringiram a uma fraca marcação próxima a membrana plasmática e, em alguns casos, ainda presente na região infranuclear (Figura 4.1 D e E e 4.1 G e H). Entretanto a imuno-marcação para RECK foi aumentando tanto ao nível da membrana quanto do citoplasma, sendo máxima, na fase final de maturação (Figura 4.10 F e I). Curiosamente, as TIMPs começaram a ser imuno-localizadas na fase de maturação inicial e com sua intensidade máxima no final deste processo (Figura 4.2 A e B). Desta forma, parece que RECK e as TIMPs estão mais presentes nos estágios finais da amelogênese para regular a possível atuação das MMPs.

No presente trabalho, a MMP-2 e nem a MMP-9 foram detectadas na matriz do esmalte, em contradição ao recente estudo por zimografia *in situ* reportado por Sakuraba e colaboradores (2006). Porém estes pesquisadores utilizaram incisivos de rato mineralizados, enquanto que nós utilizamos amostras de incisivo desmineralizado e, portanto, promoveu a remoção completa do esmalte dentário.

Células Imunocompetentes Não-Epiteliais

Nossos resultados demonstraram, pela primeira vez, que as MMP-2, MMP-9 e RECK são diferencialmente expressas no órgão do esmalte pelas células imunocompetentes não-epiteliais. É bem conhecido que durante a amelogênese existem macrófagos e/ou células semelhantes a macrófagos (Jessen e Moe, 1972; Josephesen e Fejerskov, 1977; Kallenbach, 1970, 1978; Nishikawa e Josephsen, 1987; Nishikawa e

Sasaki, 1996), e/ou células dendríticas as quais estão presentes em todas as fases da formação do esmalte (Takano et al., 1996; Nishikawa e Sasaki, 1999, 2000; Nishikawa, 2005).

Sabemos que muitas MMPs são expressas por macrófagos, tais como colagenases, gelatinases, estromelisinas, matrilisinas, MMPs tipo de membrana e outras (revisado por Webster e Crowe, 2006). Camundongos *knockout* para MMP-9 apresentaram retardamento da infiltração macrofágica (Luttun et al., 2004) e muitos estudos recentes têm mostrado que as gelatinases são expressas por células dendríticas derivadas de monócitos sanguíneos maduros e imaturos (Kouwenhoven et al., 2002), participam na migração trans-epitelial (Ichiyasu et al., 2004), e por células dendríticas dermais e de Langerhans (Noirey et al., 2002; Ratzinger et al., 2002). Além disso, Staquet e co-autores (2004) demonstraram que inibidores de MMPs inibem a migração de células dendríticas epidermais ativadas *in vitro.* A remodelação da MEC não somente remove os componentes da MEC, mas também prove um microambiente pró-migratório (Koshikawa et al., 2000; Galvez et al., 2002) e as MMPs participam em tal processo bem como na migração celular (Shapiro, 1998).

Interessantemente, em nosso trabalho, a intensidade de células tipo-macrófagos e/ou tipo-dendríticas imuno-positivas para as MMP-2 e MMP-9 foi mais alta durante a fase de transição (Figura 4.1 D e E) e foi decrescendo gradualmente através da fase de maturação (Figura 4.1 G e H e Figura 4.1 J e K). Desta forma, estas células podem estar engajadas na digestão de várias partículas devido a sua intrínseca atividade fagocitária e sua localização (Nishikawa e Josephsen, 1987; Nishikawa e Sasaki,1996, 1999). Estas partículas incluem ameloblastos degenerados e debris celulares na fase de transição ou de proteínas do esmalte – fragmentos de amelogeninas, emeloblastinas (amelina/sheatilina), enamelinas e tuftelinas (Nishikawa e Josephsen, 1987), já que a

degradação destas proteínas e a apoptose dos ameloblastos é iniciada ao mesmo tempo (Smith e Warshawsky, 1977). Compostos derivados das proteínas do esmalte foram também observados nos espaços intercelulares dos ameloblastos e na camada papilar (Yamamoto et al., 1994; Nanci et al., 1987, 1992). Isto ocorre devido a característica de células de reabsorção adquirida pelos ameloblastos, ou seja, eles podem transportar moléculas do esmalte para a camada papilar (Reith e Cotty, 1967). Além disso, células dendríticas fagocitam corpos apoptóticos e endocitam compostos positivos para amelogenina (Nishikawa e Sasaki, 1996, 1999). Serino proteases e MMPs atuam no processamento e degradação de proteínas do esmalte (Bartlett et al., 1996; Robinson et al., 1998; Tanabe et al., 1992; Simmer et al., 1998) e a MMP-2 recombinante degrada a amelogenina recombinante (Caron et al., 2001). Anteriormente, esta propriedade de clivar a amelogenina e outras proteínas do esmalte era somente atribuída a MMP-20 (revisado por Zeichner-David, 2001).

Então, nossos resultados sugerem que as células não-epiteliais imunocompetentes do órgão do esmalte podem expressar as MMP-2 e MMP-9 para invadir a camada papilar, clivar as proteínas do esmalte e “limpar” os debris celulares originários de ameloblastos apoptóticos durante a fase de transição. A expressão dessas MMPs é menos evidente durante a fase de maturação onde a reabsorção destas proteínas já foi finalizada e corpos apoptóticos não são mais observados.

Ao mesmo tempo, RECK foi menos expresso na fase de transição do que na fase de maturação pelas células imunocompetentes não-epiteliais, contrastando com a distribuição das MMPs. Como RECK atua como um regulador das MMPs *in vivo* e é requerido para o desenvolvimento embrionário (Oh et al., 2001), a inversa distribuição temporal das MMP-2, MMP-9 e RECK pode ser atribuída à remodelação da MEC no órgão do esmalte.

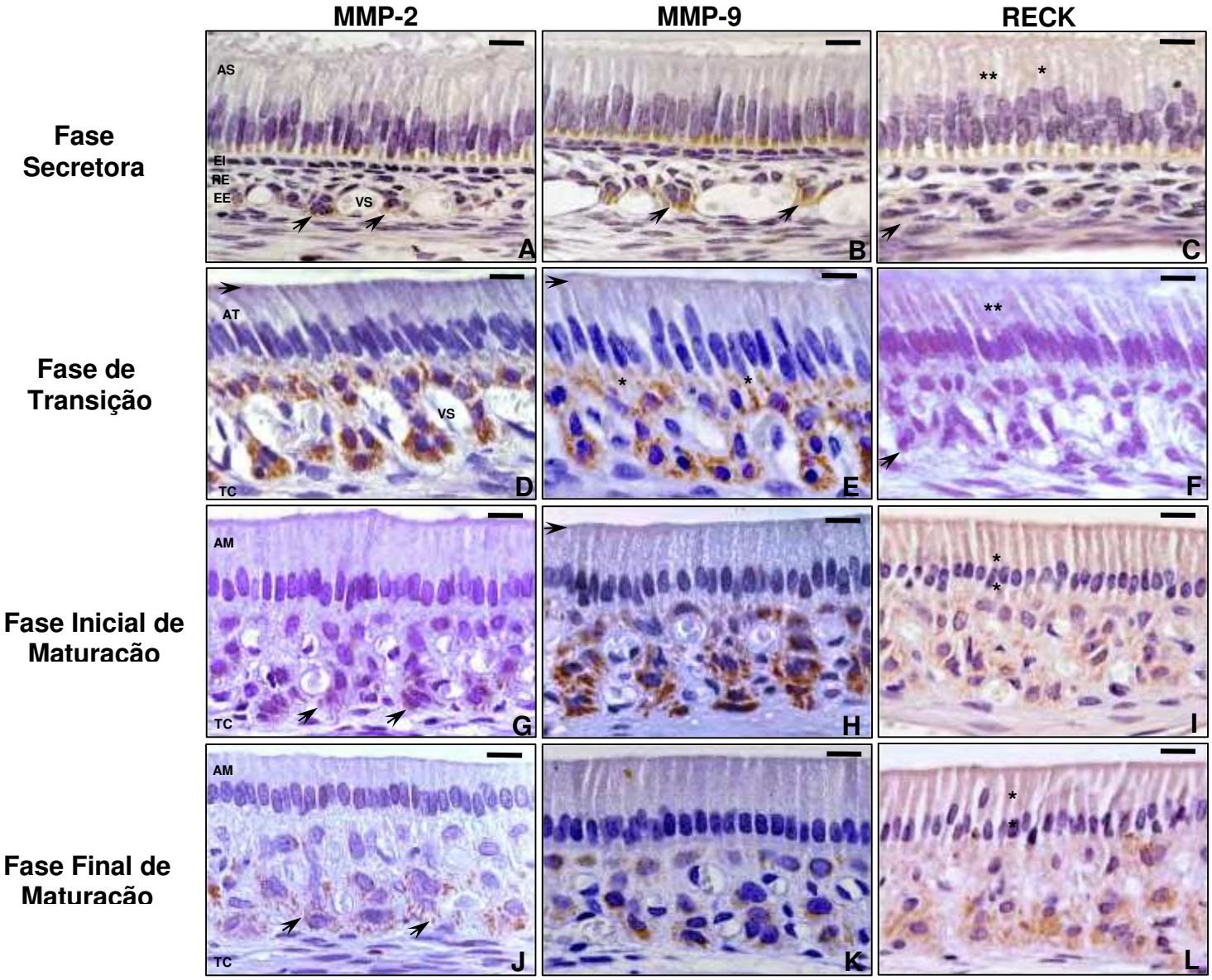
Odontoblastos

Secções mineralizadas foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão para a MMP-9 e alguns complexos anticorpo-ouro coloidal foram encontrados associados ao retículo endoplasmático rugoso e ao complexo de Golgi em odontoblastos de ratos e estas células foram também fracamente observadas por imunoperoxidase (Goldberg et al., 2003). Nossos achados referentes a MMP-9 estão de acordo com os dados reportados pelos autores acima, mas, curiosamente, RECK foi encontrado também nos mesmos compartimentos celulares (Figura 4.4 A e B). Similarmente, as MMPs -3 (Hall et al., 1999) e -20 (Bourd-Boittin et al., 2004) foram localizadas em regiões intracelulares não ligadas a via clássica de secreção em odontoblastos de ratos. Estas moléculas podem estar sendo exportadas para a MEC ou dela internalizadas porque elas foram encontradas após o início da mineralização da dentina. O papel desempenhado pela MMP-9 e Reck, principalmente, em odontoblastos precisa ser ainda esclarecido.

Recentemente, atividades colagenolítica e gelatinolítica têm sido detectadas em incisivos de ratos por zimografia *in situ* (Sakuraba et al., 2006). Muitos trabalhos já descreveram a expressão da MMP-2 em odontoblastos em várias espécies, tais como em porco (Caron et al., 2001), boi (Satoyoshi et al., 2001), camundongo (Sahlberg et al., 1992, 1999), rato (Goldberg et al., 2003) e humano (Heikinheimo e Salo, 1995) e em frações mineralizadas de dentina humana (Martin-De Las Heras et al., 2000). Entretanto, nós não a detectamos nestas células e nem na dentina.

Nós não detectamos as TIMPs nos odontoblastos e nem na pré-dentina ou dentina. Por microscopia eletrônica de transmissão, elas foram localizadas nos odontoblastos e dentina (Goldberg et al., 2003).

Figura 4.1: *Imunolocalização das MMPs e RECK durante a amelogênese em incisivos de rato. Os ameloblastos secretores foram imuno-marcados pela (A) MMP-2, (B) MMP-9 e (C) RECK, na região infranuclear (setas). Células do epitélio externo foram imuno-coradas pelas MMPs (setas) e RECK foi imuno-corado nas células do retículo estrelado (setas). Os ameloblastos pós-secretores (ameloblastos de transição) foram imuno-marcados pela (D) MMP-2, (E) MMP-9 e (F) RECK na região distal (membrana) (setas) e a MMP-9 na região infranuclear (asteriscos). Na fase inicial de maturação, as MMPs foram observadas na região distal dos ameloblastos pós-secretores (ameloblastos de maturação) (G-H) (setas), mas está ausente no final desta fase. Ao mesmo tempo, as células da camada papilar imuno-positivas foram mais coradas no início do que no final da fase de maturação (J-K). Ainda nesta fase, a expressão de RECK foi aumentando do início para o final em todas as camadas celulares (I-L). RECK foi detectado difuso no citoplasma de todos os ameloblastos pós-secretores (asteriscos). AM: ameloblasto de maturação, AS: ameloblasto secretor, AT: ameloblasto de transição, EE: epitélio externo, EI: estrato intermediário, RE: retículo estrelado, TC: tecido conjuntivo, VS: vaso sanguíneo. Barra:16µm.*


MMP-2
MMP-9
RECK
Fase Secretora
Fase de Transição
Fase Inicial de Maturação
Fase Final de Maturação
AS
EI
RE
EE
VS
AT
TC
AM
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L

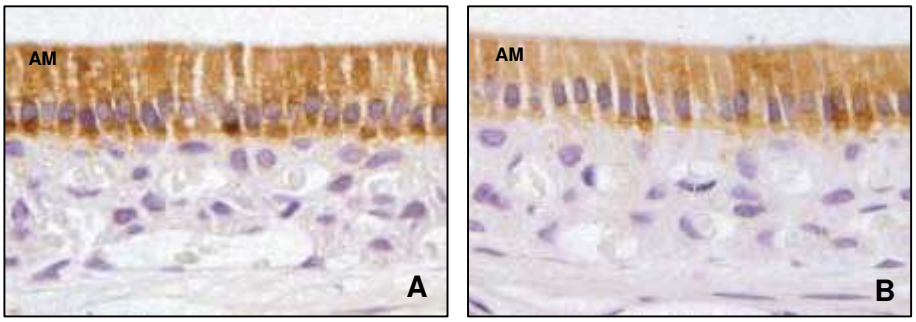


Figura 4.2: *Imunolocalização das TIMPs -1 e -2 durante a amelogênese em incisivos de rato. Ambas foram localizadas no mesmo tipo celular e na mesma fase de formação do esmalte: nos ameloblastos pós-secretores (ameloblastos de maturação) na fase de maturação inicial (1) e final (2). (A) TIMP-1 e (B) TIMP-2. AM: ameloblasto de maturação. Aumento: 40x.*

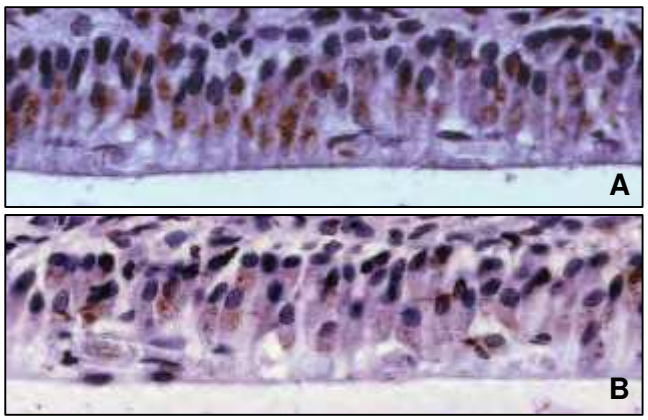


Figura 4.3: *Imunolocalização da MMP-9 e RECK em odontoblastos durante a amelogênese em incisivos de rato. Ambas foram localizadas, provavelmente, no mesmo compartimento celular, Complexo de Golgi e/ou a rede do retículo endoplasmático rugoso. (A) MMP-9 e (B) RECK. Aumento: 40x.*

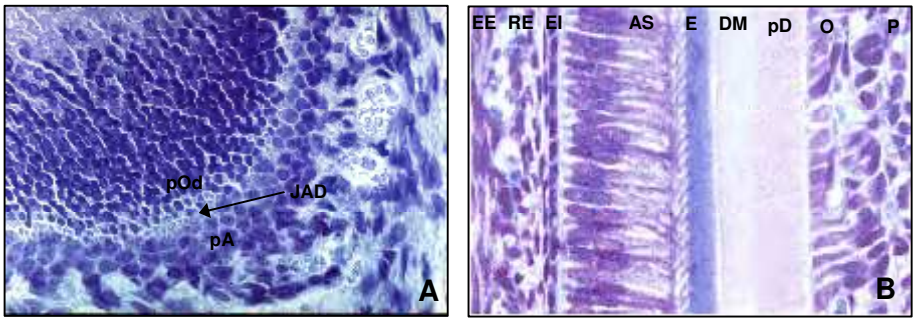


Figura 4.4: *Fotomicrografias da fase pré-secretora e secretora da amelogênese em incisivos de rato. (A) Não houve imuno-marcação para as MMPs, TIMPs ou RECK durante a primeira fase. (B) Controle negativo dos anticorpos utilizados. AS: ameloblasto secretor, DM: dentina do manto, E: matriz do esmalte, EE: epitélio externo, EI: estrato intermediário, JAD: junção amelo-dentinária, O: odontoblasto, P: polpa, pA: pré-ameloblasto, pD: pré-dentina, pOd: pré-odontoblasto e RE: retículo estrelado. Aumento: 20x (A) e 10x (B).*

Quadro 4.1: Resumo dos resultados encontrados em imunohistoquímica durante a formação do incisivo de rato.

Fases					*MMP-2*	*MMP-9*	*RECK*	*TIMP-1*	*TIMP-2*
Pré-Secretora	Junção Amelo-Dentinária (DEJ)				-	-	-	-	-
	Pré-ameloblasto				-	-	-	-	-
	Estrato Intermediário				-	-	-	-	-
	Retículo Estrelado				-	-	-	-	-
	Epitélio Externo				-	-	-	-	-
Secretora	Matriz do Esmalte				-	-	-	-	-
	Ameloblasto Secretor		Processo de Tomes		-	-	-	-	-
			Citoplasma	Supranuclear	-	-	+	-	-
				Infranuclear	++	+++	++	-	-
	Estrato Intermediário				-	-	-	-	-
	Retículo Estrelado				-	-	+	-	-
	Epitélio Externo				+	+	-	-	-
Transição	Ameloblasto pós-secretor		Membrana		+	+	+	-	-
			Citoplasma	Supranuclear	-	-	+	-	-
				Infranuclear	-	+	-	-	-
	Camada Papilar				+++	+++	+	-	-
Maturação	Inicial	Ameloblasto pós-secretor	Membrana		-	-	+	-	-
			Citoplasma	Supranuclear	-	-	-	+++	+++
				Infranuclear	-	-	-	+++	+++
		Camada Papilar			+++		++	-	-
	Final	Ameloblasto pós-secretor	Membrana		-	-	+	-	-
			Citoplasma	Supranuclear	-	-	+	+++	+++
				Infranuclear	-	-	-	+++	+++
	Camada Papilar				++	+	+++	-	-

Legenda: Ausente (-), fraco (+), moderado (++) e intenso (+++).

4.2 – Desenvolvimento Crânio-Facial

4.2.1 – Odontogênese

O estudo das MMPs no desenvolvimento dos tecidos dentários nos revelou importantes informações nesta última década, em particular o fato destas enzimas estarem presentes e distribuídas de maneira específica, de forma similar ao que ocorre a seus inibidores (TIMPs) (revisado por Hannas et al., 2007). Este trabalho apresenta, pela primeira vez, a distribuição temporal e espacial de RECK durante a odontogênese. Esta proteína é diferencialmente expressa neste processo e presente nas células epiteliais e mesenquimais odontogênicas. O resumo dos resultados encontrados por imunohistoquímica está apresentado no Quadro 4.2.

Fase de Broto (E13-14)

A região onde os dentes se formarão é composta pelo epitélio oral, que reveste a cavidade bucal primitiva, e por um tecido subjacente, o ectomesênquima (originário das células da crista neural). O epitélio oral origina todas as células epiteliais do germe dentário e o ecto-mesênquima origina as demais células dos tecidos dentais e periodontais. A formação do germe dentário inicia-se pela proliferação localizada de células do epitélio oral que penetram no ecto-mesênquima. Essa estrutura é o botão epitelial ou lâmina dentária. A presença desses brotos epiteliais caracteriza o estágio de broto, onde as células envolvidas apresentam pouca alteração na morfologia ou função e estão espacialmente muito próximas.

A remodelação da MEC não somente remove os componentes da MEC, mas também prove um microambiente pró-migratório (Koshikawa et al., 2000; Galvez et al., 2002) com a ajuda das MMPs que também colaboram na migração celular (Shapiro, 1998). Nesta fase, os transcritos e seus produtos para MMP-2 (Sahlberg et al., 1999;

Yoshiba et al., 2003), MMP-9 (Sahlberg et al., 1999; Yoshiba et al., 2003) e MT1-MMP (Yoshiba et al., 2003) estão presentes e atuam na clivagem de componentes da MEC importantes para a migração das células epiteliais, tais como laminina-5 (Giannelli et al., 1997; Koshikawa et al., 2000) e CD44 (Yu e Stemenkovic, 1999). As TIMPs -1, -2 e -3 também estão presentes e participam na regulação da atividade das MMPs neste processo (Yoshiba et al., 2003). O mRNA de RECK parece estar localizado (Figura 4.6) e sua proteína (Figura 4.5B) nos mesmos tipos celulares onde as MMP-2, MMP-9, MT1-MMP, TIMP-1 e TIMP-2 foram localizadas e, potencialmente, esta proteína também participe do controle da proliferação e invasão do epitélio oral, já que é conhecida por inibir a atividade enzimática das gelatinases e a MT1-MMP (Takahashi et al., 1998; Oh et al., 2001).

Fase de Capuz (E15)

O controle da morfologia das cúspides dentárias, envolvendo não somente a sua forma, mas também o seu correto local e é um processo importante no desenvolvimento dentário. Existem muitas evidências de que este processo é controlado pelo nó-do-esmalte (Pispa et al., 1999; Tucker et al., 2000, 2004), já que nessa região ocorre a expressão de muitas moléculas sinalizadoras, tais como Shh, Fgfs, MMPs, Wnts e genes que controlam o ciclo celular, incluindo p21 e fatores de transcrição, tais como o Msx2 (Jernvall et al., 1994, 1998; Vaahtokari et al., 1996; Aberg et al., 1997; Kettunen e Thesleff, 1998; Sarkar e Sharpe, 1999). O nó-do-esmalte foi inicialmente detectado em germes dentários de camundongos na fase de capuz (Arhens, 1931) e representa um centro transitório de células localizadas na região central do órgão do esmalte em desenvolvimento. A formação do nó-do-esmalte primário parece ser necessária para a

transição da fase de broto para a de capuz. Já o nó-do-esmalte secundário forma-se no final da fase de capuz e início da fase de campânula.

O mRNA de RECK parece estar localizado (Figura 4.7) e sua proteína (Figura 4.5D) nas áreas onde se encontram ambos os nós-do-esmalte. Talvez esta proteína possa ser importante para a morfogênese dentária pela regulação destes centros de controle, já que as gelatinases e outras MMPs estão presentes e participam da clivagem de diversos fatores expressos neste local (Yoshiba et al., 1998; Randall e Hall, 2002).

Fase de Campânula ou Sino (E16 – E20)

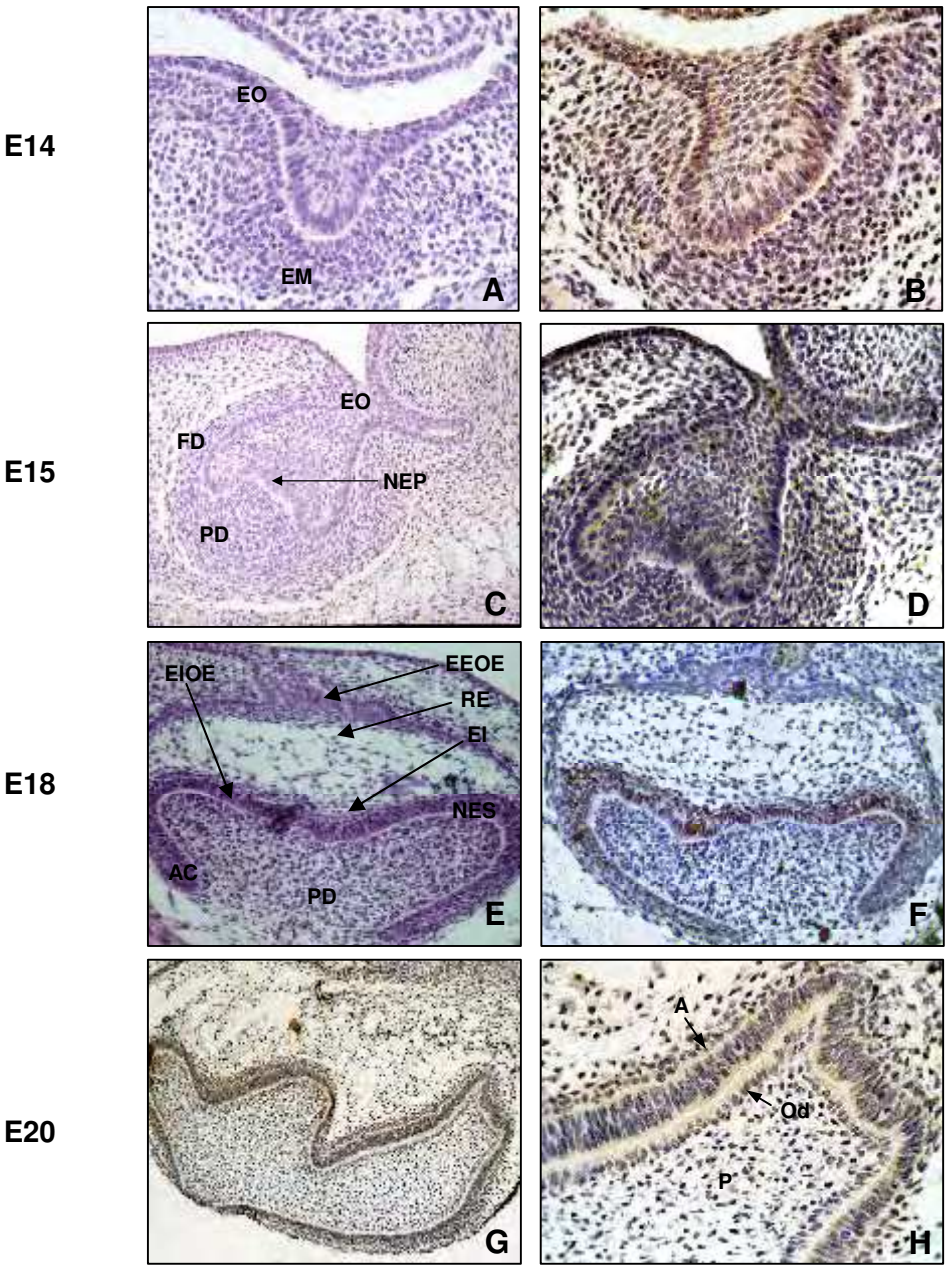
A junção amelo-dentinária foi considerada no passado como uma simples interface anatômica e biologicamente inerte entre o esmalte e a dentina (Whittaker, 1978; Arsenault e Robinson, 1989). Entretanto, ela tornou-se claramente um complexo juncional entre duas adjacentes e finas camadas: o esmalte aprismático interno e a dentina do manto. Todas estas camadas juntas formam uma complexa estrutura que desempenha atividades biológicas, pelo menos, durante a odontogênese (Goldberg et al., 2002). Em estágios iniciais da odontogênese, do início ao final da fase de campânula onde as células entram em estágios finais de diferenciação, a membrana basal está envolvida nas interações epitélio-mesenquimais. Após o início da secreção da pré-dentina, a membrana basal desaparece provavelmente degradada por MMPs e a taxa de degradação controlada pelas TIMPs (Sahlberg et al., 1992; 1999).

Recentemente Kumamoto e Ooya (2006) relataram que RECK é expresso por células do germe dentário normal e em ameloblastomas humanos e que pode estar envolvido no controle da remodelação da MEC nos dois casos. Nós demonstramos, por imunohistoquímica, que RECK está presente nas células do epitélio interno do órgão do esmalte (Figuras 4.5F) e nos ameloblastos e odontoblastos (Figura 4.5 G-H), no início e

final da fase de campânula, respectivamente. O mRNA foi fracamente localizado nestes mesmos tipos celulares (Figuras 4.7 e 4.8). O fino controle entre a degradação e secreção das matrizes orgânicas que formarão os tecidos mineralizados do dente é importante para a diferenciação final de odontoblastos e ameloblastos (histo-diferenciação). Desta forma, acreditamos que RECK possa auxiliar também, juntamente com as TIMPs, nesta fina regulação.

O mRNA de RECK pode estar presente, ainda, na região da alça cervical, onde as células estão migrando (Figura 4.7) e no osso alveolar em todas as fases da odontogênese (Figuras 4.6, 4.7 e 4.8).

Figura 4.5: *Imunolocalização de RECK durante a odontogênese. Na fase de broto (E14), (B) o epitélio oral, as células epiteliais que estão invadindo o ecto-mesênquima e as células mesenquimais foram imunopositivas. Na fase de capuz (E15), (D) células do nó-do-esmalte primário, epitélio oral, folículo e papila dentária foram imunocorados. Na fase inicial de campânula (E18), (F) células do epitélio interno e externo do esmalte foram imunomarcadas. Já na fase final de campânula (E20), (H) ameloblastos e odontoblastos foram imunomarcados. (A, C e E). Controles negativos. A: ameloblasto, AC: alça cervical, EEOE: epitélio externo do órgão do esmalte, EI: estrato intermediário, EIOE: epitélio interno do órgão do esmalte, EM: ecto-mesênquima, EO: epitélio oral, FD: folículo dentário, NEP: nó-do-esmalte primário, NOS: nó-do-esmalte secundário, Od: odontoblasto, P: polpa, PD: papila dentária, RE: retículo estrelado, Aumento: 10x (C, F-G) e 20x (A-B, D-E e H).*


E14
E15
E18
E20
EO
EM
A
B
EO
FD
NEP
PD
C
D
EIOE
EEOE
RE
EI
NES
AC
PD
E
F
G
A
Od
P
H

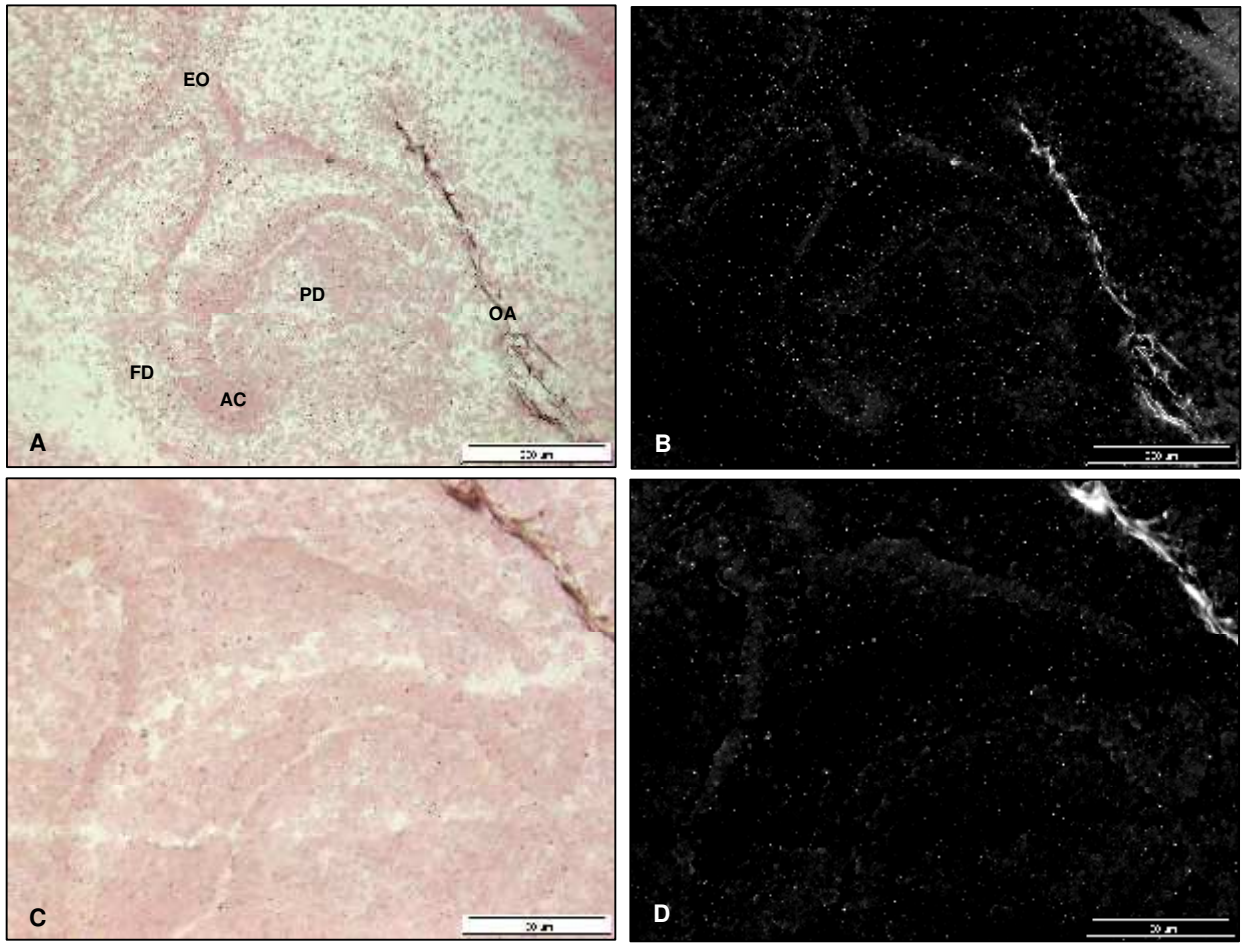


Figura 4.6: *Hibridização in situ para RECK nos germes dentários na fase de capuz nos molares (E15). (A) mRNA localizado nas células do epitélio oral, folículo dentário, papila dentária e osso alveolar (sonda 3') (grânulos pretos). (B) Mesmo corte em preto e branco e o mRNA hibridizado são os grânulos brancos. (C e D) Controles negativos (sonda 5') com pouco background (grânulos pretos). AC: alça cervical, OA: osso alveolar EO: epitélio oral, FD: folículo dentário e PD: papila dentária.*

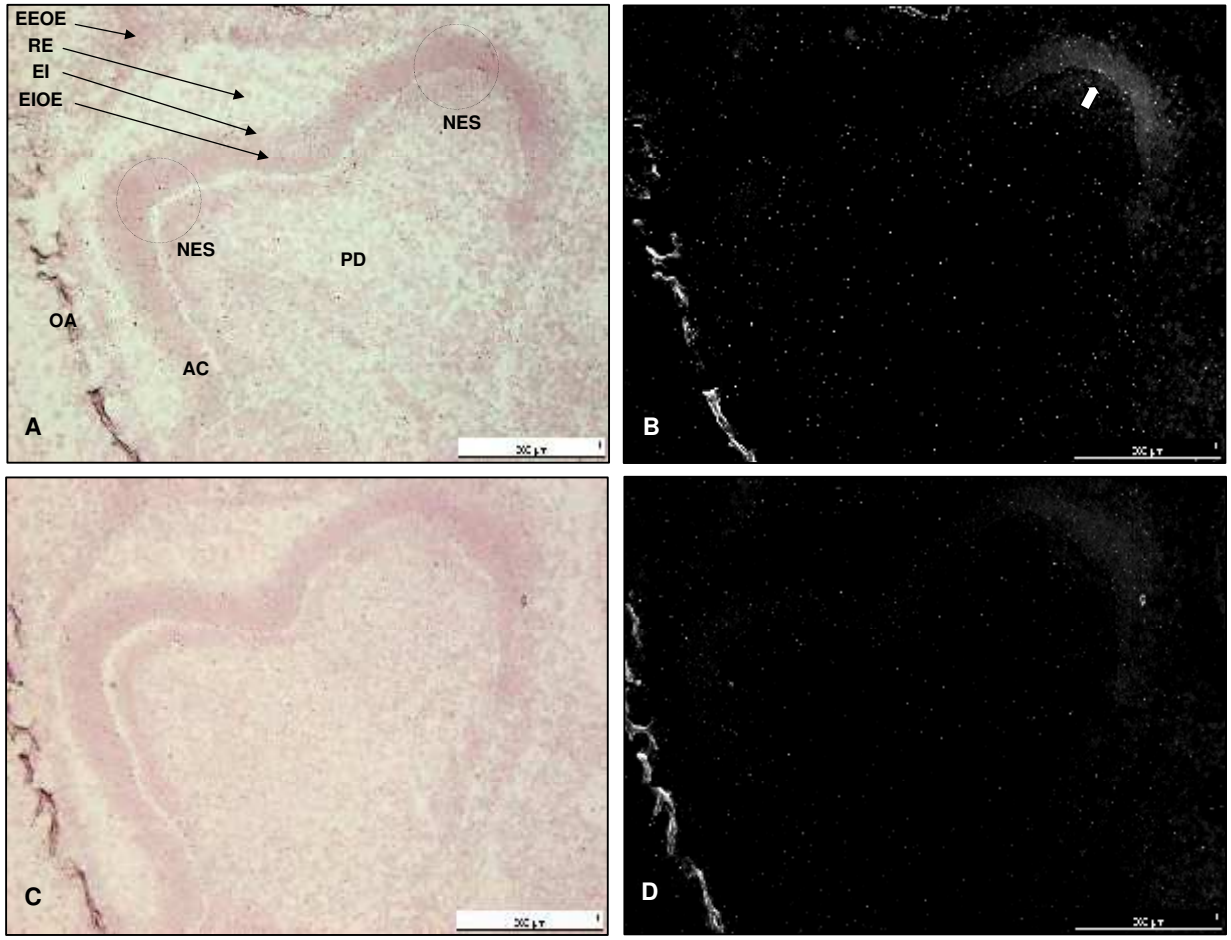


Figura 4.7: *Hibridização in situ para RECK nos germes dentários na fase de campânula inicial nos molares (E18). (A) mRNA localizado nas células da alça cervical, epitélio interno e externo do órgão do esmalte, retículo intermediário e nó-do-esmalte secundário (sonda 3'). (B) Mesmo corte em preto e branco e o mRNA hibridizado são os grânulos brancos. (C e D) Controles negativos (sonda 5') com pouco background (grânulos pretos). AC: alça cervical, EEOE: epitélio externo do órgão do esmalte, EI: estrato intermediário, EIOE: epitélio interno do órgão do esmalte, NES: nó-do-esmalte secundário, OA: osso alveolar, PD: papila dentária e RE: retículo estrelado.*

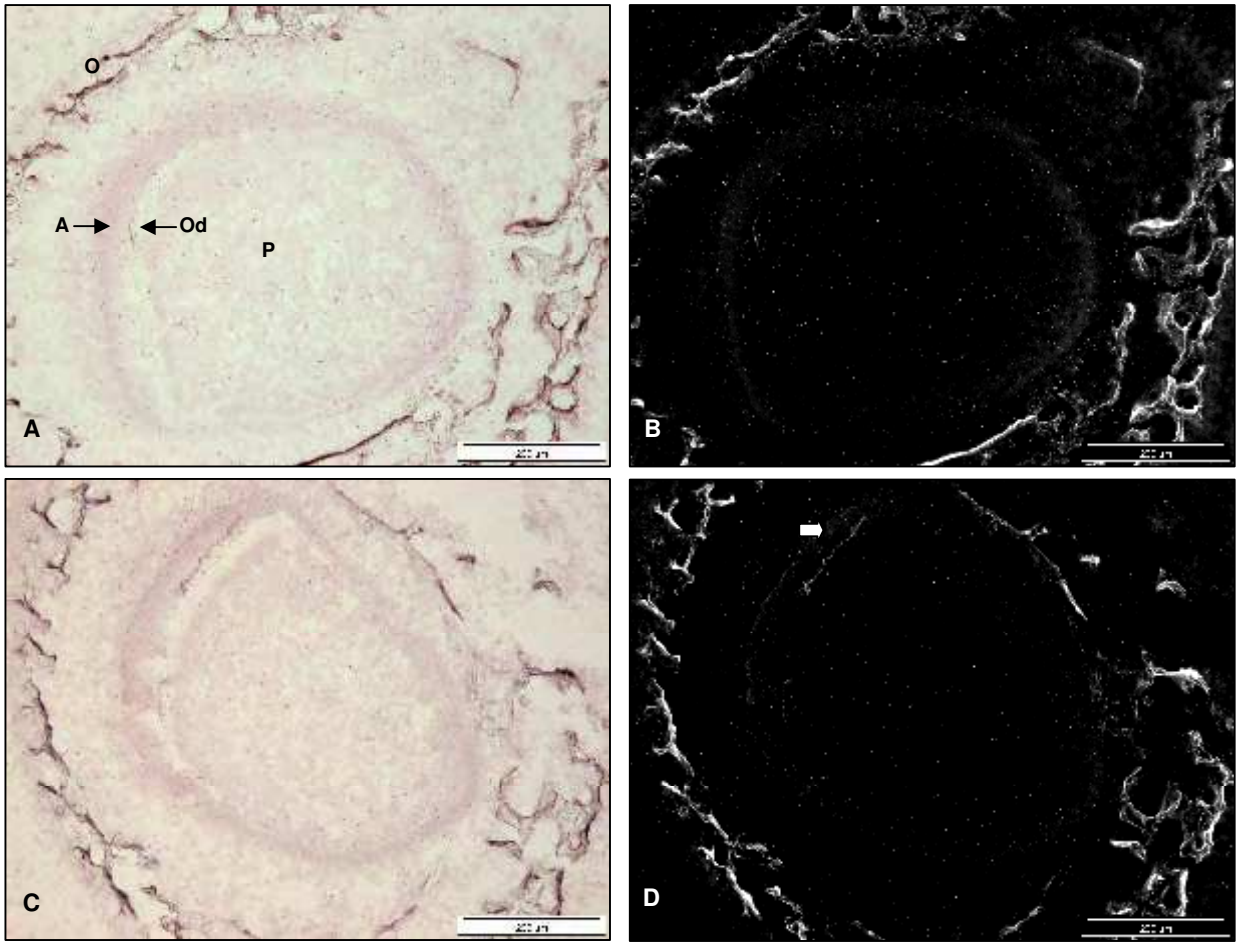


Figura 4.8: *Hibridização in situ para RECK nos germes dentários na fase de campânula final (E20). (A) mRNA localizado principalmente no órgão do esmalte e em odontoblastos (sonda 3'). (B) Mesmo corte em preto e branco e o mRNA hibridizado são os grânulos brancos. (C e D) Controles negativos (sonda 5') com pouco background (grânulos pretos), exceto nas áreas de mineralização da dentina ou esmalte (seta branca). A: ameloblasto, Od: odontoblasto, OA: osso alveolar e P: polpa.*

Quadro 4.2: Resumo dos resultados encontrados em imunohistoquímica durante a odontogênese em camundongos.

Fases			*RECK*
Broto Dentário (E12-E14)	Germe Dentário - Broto (E14)	Epitélio Oral	**++**
		Ecto-mesênquima	**+**
Capuz (E15)	Epitélio Oral		**+**
	Papila Dentária		**+**
	Nó-do-Esmalte Primário		**+**
	Folículo Dentário		**+**
Campânula Inicial (E16)	Órgão Dentário	Epitélio Interno do Órgão do esmalte	**++**
		Estrato Intermediário	**-**
		Retículo Estrelado	**-**
		Epitélio Externo do Órgão do Esmalte	**++**
	Nó-do-Esmalte Secundário		**+**
	Papila Dentária		**-**
	Folículo Dentário		**-**
CamPânula Final (E20)	Polpa		**-**
	Ameloblasto		**+**
	Odontoblasto		**+**

Legenda: Ausente (-), fraco (+), moderado (++) e intenso (+++).

4.2.2 – Ossificação Intramembranosa

Nós observamos, pela primeira vez, que RECK é expresso pelas células da cartilagem de Meckel e por osteoblastos que participam da ossificação intramembranosa da mandíbula e maxila. Verificamos também que as MMPS, TIMPs e RECK estão diferencialmente expressos na formação óssea do complexo crânio-facial.

Mandíbula

O osso sofre uma extensa e rápida remodelação na mandíbula embrionária. Durante o desenvolvimento da cartilagem de Meckel observa-se duas regiões distintas, uma calcificada e outra não-calcificada. A primeira é derivada das porções mais anterior e posterior (na qual participa da formação dos ossículos maleus e incus) e ambos contribuem para a ossificação da mandíbula e do osso auricular por ossificação endocondral (Richman e Diewert 1988). Estudos recentes têm demonstrado que a região intramandibular da porção posterior é substituída por osso mandibular de forma similar a da porção anterior (Ishizeki et al., 1999). A região não-calcificada é localizada nos tecidos moles e eventualmente se torna o ligamento esfenomandibular na ausência de calcificação. Esta estrutura em roedores é formada por células fibroblásticas que são originadas, pela transformação celular, a partir de condrócitos da cartilagem de Meckel (Harada e Ishizeki 1998). Além disso, quando a cartilagem de Meckel é colocada em condições ectópicas, por exemplo, em cultura de células ou organocultura, estes condrócitos apresentam a capacidade de se transformarem em células que são comprometidas com a expressão de proteínas características de osso (Ishizeki et al., 1992, 1994, 1996a, 1996b, 1996c, 1997, 1998a, 1998b). Nós analisamos a porção da cartilagem de Meckel que sofre ossificação intramembranosa.

A cartilagem de Meckel é uma estrutura vestigial que é degradada ao longo do desenvolvimento mandibular.

Estudos anteriores têm sugerido que a MMP-2 está envolvida na involução da cartilagem de Meckel (Reponen et al., 1992; Breckon et al., 1995; Chin e Werb, 1997) e intensa atividade gelatinolítica foi encontrada nesta estrutura (Abiko et al., 1999). Transcritos da MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 foram localizados ao longo da região osteóide (Chin e Werb, 1997) e a MMP-2 é mais concentrada em osteoclastos e em torno dos germes dentários dos molares e incisivos ente E13-E14 (Reponen et al., 1994; Chin e Werb, 1997). Nós detectamos a MMP-2 intensamente imunomarcada nos condrócitos, em E14 e E15 (Figura 4.9 A e E) e nas células do pericôndrio, em E15 (Figura 4.9E). O mRNA para MMP-2 já foi também observado nestes tipos celulares. A MMP-9 foi também imunomarcada nestas células em ambos os períodos (Figura 4.9 B e F) e, é possível, que estas enzimas estejam participando na degradação da matriz cartilaginosa e da matriz ao redor da cartilagem de Meckel, necessária para o crescimento da peça cartilaginosa (Chin e Werb, 1997). As TIMPs (Figura 4.9D) e RECK (Figura 4.9C e G) foram observadas nos condrócitos, porém menos intensas que as MMPs. mRNA de RECK foi detectado nas células do pericôndrio, alguns condrócitos e no osso mandibular em torno da cartilagem da Meckel, em E16 (Figura 4.10). RECK pode ser importante para o controle da degradação da MEC durante a expansão e degradação da cartilagem de Meckel.

Maxila

O osso maxilar é formado pelas células da crista neural que migram para o futuro local onde estará a peça óssea (revisado por Trainor, 2005). As MMPs são secretadas por estas células, atuando na remodelação da MEC para que a migração celular seja

realizada (Chin e Werb, 1997). Nós verificamos que as MMP-2, MMP-9 e RECK foram secretados por estas células, em E13 e E14 (Figura 4.11).

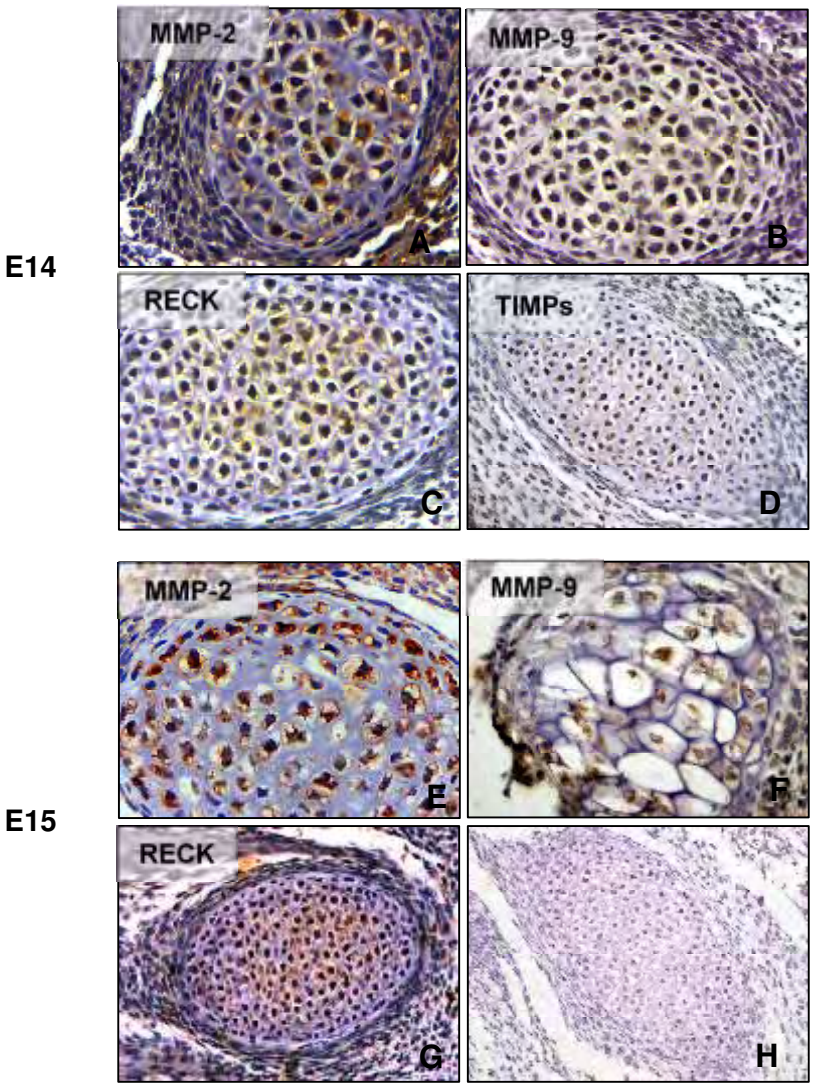


Figura 4.9: Imunolocalização das MMPs, TIMPs e RECK na cartilagem de Meckel. Em E14, as (A e B) MMPs, (C) RECK e (D) TIMPs foram imunomarcadas nos condrócitos. A MMP-2 também foi detectada nas células do pericôndrio. Em E15, o mesmo perfil foi encontrado para as (E e F) MMPs e (G) RECK. (H) Controle negativo. Aumento: 10 x (H), 20x (D, G) e 40x (A-B, E-F).

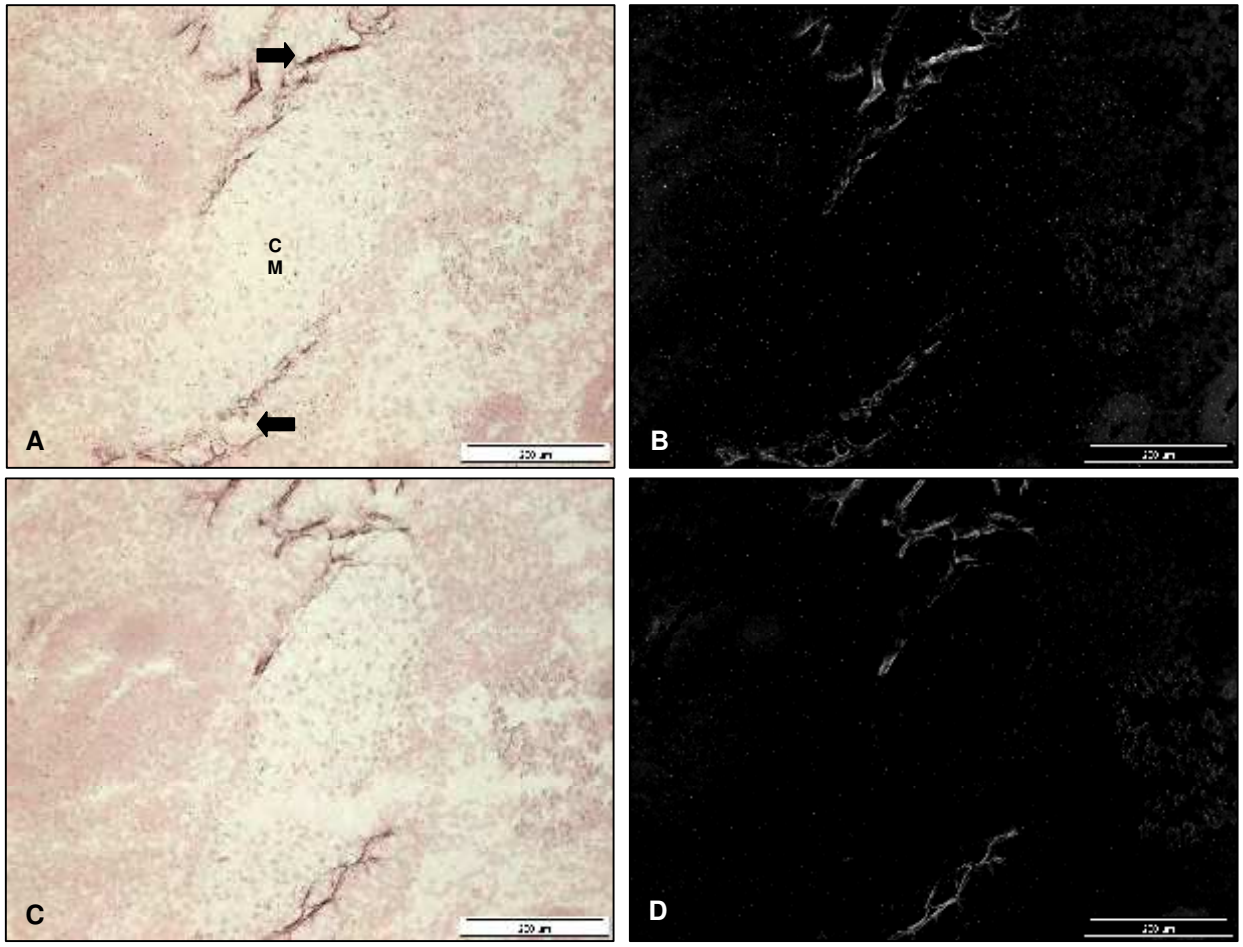


Figura 4.10: *Hibridização in situ para RECK na cartilagem de Meckel (E16). (A) mRNA localizado no pericôndrio da cartilagem de Meckel e no tecido ósseo (seta) (sonda 3'). (B) Mesmo corte em preto e branco e o mRNA hibridizado são os grânulos brancos. (C e D) Controles negativos (sonda 5') com pouco background (grânulos pretos). CM: cartilagem de Meckel, pC: pericôndrio.*

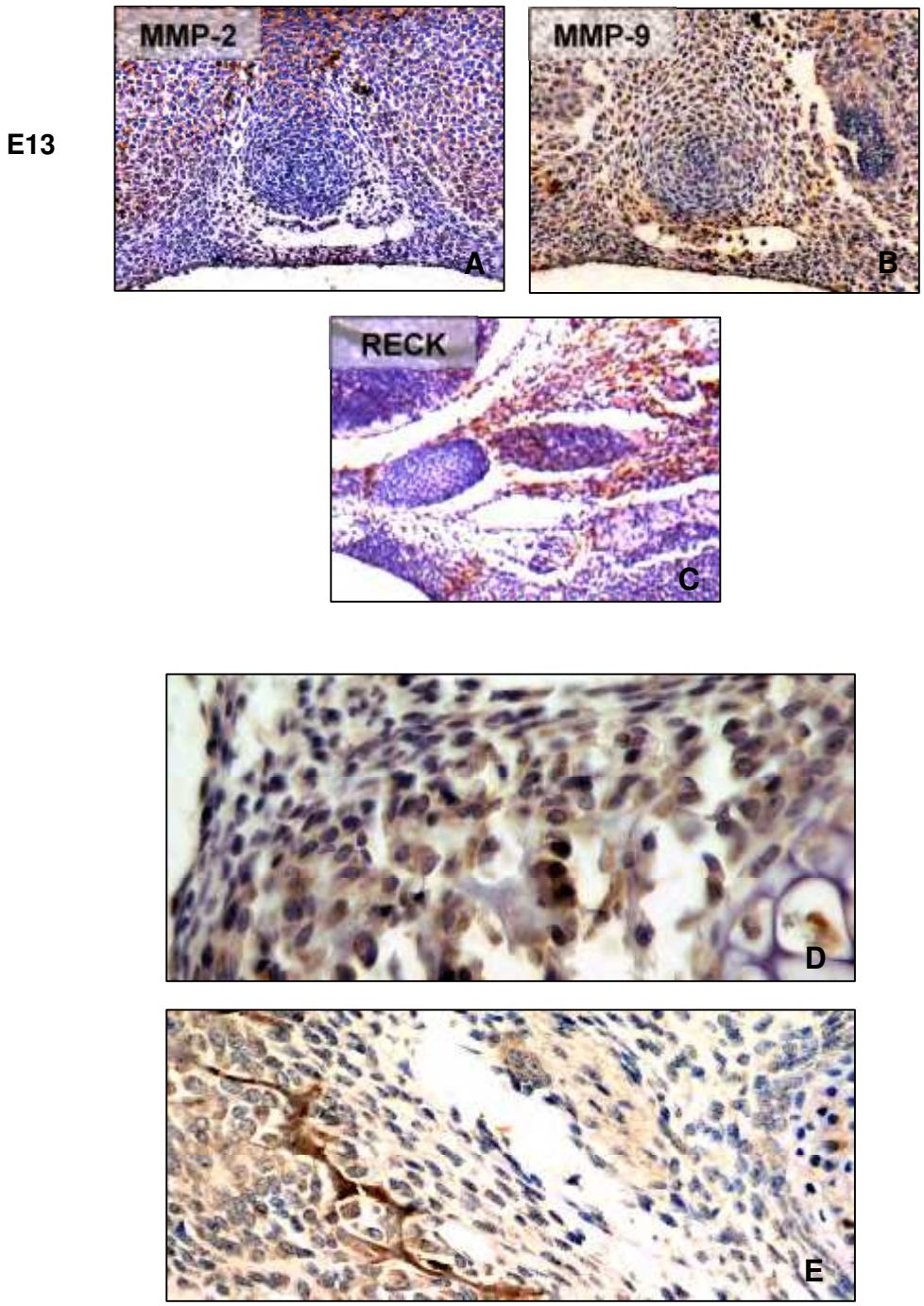


Figura 4.11: *Imunolocalização das MMPs, TIMPs e RECK na ossificação intramembranosa da maxila e mandíbula. Em E13, as células da crista neural que migram para a formação do osso maxilar foram imunomarcadas por (A) MMP-2, (B) MMP-9 e (C) RECK. Nos períodos E14-E15, o osso alveolar, em torno da cartilagem de Meckel, foi imunomarcado nos osteoblastos para as MMPs (D) e TIMPs e RECK (E). Aumento: 10x (C), 20x (A-B) e 40x (D-E).*

4.3 – Resultados Ossificação Endocondral

Nossos resultados demonstram pela primeira vez a expressão de RECK nas células osteogênicas e condrogênicas durante a ossificação endocondral, bem como a sua expressão diferencial em relação às MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2. O resumo dos resultados encontrados por imunohistoquímica está apresentado nos Quadros 4.3 e 4.4.

Diferenciação Condrocítica (E13)

Após a condensação das células mesenquimais, nos locais das futuras peças ósseas, estas células se diferenciam em condrócitos (região central) e em células do pericôndrio (região periférica - Figura 4.12A) (Iwasaki et al. 1997). Estes condrócitos expressam marcadores específicos, tais como aggrecana e colágeno tipo II, distinguindo-os do pericôndrio (Horton, 1993). Produzem, ainda, MMP-2 (Berton et al., 2000) e MMP-9 (Figura 4.12 B e C), ambas capazes de degradar colágeno tipo II (Itoh et al., 2002; Van den Steen et al., 2002) e, potencialmente, podem estar participando da remodelação da matriz cartilaginosa durante a diferenciação condrocítica (Colnot e Helms, 2001). As células do pericôndrio também foram imuno-coradas pela MMP-2 (Figura 4.12B) que pode estar participando na remodelação da MEC face a sua capacidade de clivar o colágeno tipo I (Aimes e Quigley, 1995) que é a principal proteína secretada pelas células mesenquimais.

A diferenciação dos condrócitos é finamente controlada por diversas moléculas, tais como a proteína relacionada ao hormônio do crescimento (PTHrP) (Amling et al., 1997), o fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2) (Mancilla et al., 1998) e o TGF-β (revisado por Mundlos and Olsen, 1997). Sabe se que ambas as gelatinases podem transformar a forma latente da TGF-β em ativa (Yu e Stamenkovic, 2000), portanto as

gelatinases podem estar aumentando a disponibilidade deste fator de crescimento durante este processo.

Os seus inibidores, RECK, TIMP-1 e TIMP-2, também foram imuno-localizados nos condrócitos (Figura 4.12B-D). Possivelmente, eles podem estar regulando a degradação da matriz pelas MMPs e a disponibilidade de moléculas bioativas.

Molde Cartilaginoso (E14)

A peça óssea já apresenta duas partes bem distintas: a epífise e a diáfise. A epífise contém três zonas de condrócitos: zona repouso, proliferação e pré-hipertrófica, enquanto que a metáfise é composta por condrócitos hipertróficos (Figura 4.13A), sinalizando que este local sofrerá vascularização, entretanto os condrócitos imaturos e proliferativos secretam inibidores angiogênicos (Moses et al., 1999).

A função das TIMPs no esqueleto permanece uma questão em aberto. TIMP-1 e TIMP-2 são proteínas multifuncionais as quais não somente exibem um amplo espectro de inibição contras as MMPs, mas também funcionam como fatores de crescimento e inibidores da angiogênese (Gomez et al.,1997). Tais fatores têm sido isolados da cartilagem (Moses et al., 1990) e condrócitos *in vitro* (Moses et al., 1992; Ohba et al., 1995), e parecem estar relacionados a família das TIMPs (Moses, 1997; Ohba et al., 1995). Além disso, as TIMPs -1 e -2 estimulam a reabsorção óssea pelo osteoclastos por um mecanismo que não está relacionado à sua função de inibição das MMPs (Shibutani et al., 1999). Nós detectamos as TIMPs no pericôndrio do molde cartilaginoso (Figura 4.13D) e é possível que elas estejam atuando como fatores anti-angiogênicos, já que a invasão vascular inicia-se do pericôndrio para a área central da peça cartilaginosa. Transcritos da TIMP-2 foram previamente detectados nestas mesmas células (Colnot e Helms, 2001). Entretanto, as MMPs foram intensamente detectadas nos condrócitos

hipertróficos (Figura 4.13B), provavelmente, participando da remodelação da matriz para a futura invasão celular, já que as gelatinases são necessárias para a degradação da cartilagem (Kawashima-Ohya et al., 1998), sendo que a MMP-9 é a reguladora da apoptose dos condrócitos hipertróficos, promotora da angiogênese (Vu et al., 1998) e da liberação do VEGF da matriz (Bergers et al., 2000). Além disso, transcritos para a MMP-9 são expressos por estas células (Colnot e Helms, 2001).

RECK foi moderadamente imuno-localizado também nos condrócitos pré e hipertróficos e em algumas células do pericôndrio (Figura 4.13C). Acreditamos que esta proteína possa estar regulando a atuação das MMPs neste processo.

Invasão Vascular e Celular (E15)

A substituição da matriz cartilaginosa avascular por matriz óssea, via ossificação endocondral, é realizada pela atuação coordenada de diversos tipos celulares e necessita de uma etapa vascular. A invasão vascular ocorre somente na MEC em torno dos condrócitos hipertróficos, onde as células endoteliais começam a invadir o molde cartilaginoso a partir do pericôndrio e transportam células indiferenciadas e diferenciadas osteogênicas, osteoclastos/condroclastos e hematopoiéticas, formando, portanto, o colar ósseo que é responsável pela degradação do septo transverso (interface entre os condrócitos hipertróficos e as células do colar ósseo) (Figura 4.14A) (Lee et al., 1999). A MMP-9 foi moderadamente imuno-localizada nas células musculares, nos condrócitos pré e hipertróficos (Figura 4.14C), porém intensamente nas células do colar ósseo (Figura 4.14D). Transcritos para a MMP-9 já haviam sido reportados nestes mesmos locais e é bem conhecido que a MMP-9 participa do recrutamento osteoclástico (Blavier e Delaissé, 1995; Engsig et al., 2000; Colnot e Helms, 2001; Takahara et al., 2004).

RECK foi imuno-corado no músculo, condrócitos em proliferação, pré e hipertróficos, por toda a extensão do pericôndrio e células do colar ósseo (Figura 4.14D). As TIMPs foram imuno-marcadas por toda a extensão do pericôndrio e colar ósseo, moderadamente no músculo, nos condrócitos em proliferação e fracamente nos condrócitos hipertróficos (Figura 4.14E) e os transcritos para a TIMP-2 também são expressos por estas células (Colnot e Helms, 2001).

Após a migração vascular e celular, a MEC da cartilagem é, então, removida pelos condroclastos e substituída por uma matriz óssea rica em colágeno tipo I, uma molécula secretada por osteoblastos. Os condroclastos diferem dos osteoclastos por estarem localizadas na junção osteocondral e pelo fato de que elas expressão menos TRAP que os osteoclastos (Vu et al., 1998; Engisig et al., 2000). Transcritos para as gelatinases foram detectados nas células que migram do colar ósseo para o centro da diáfise (Colnot e Helms, 2001; Takahara et al., 2004) e as MMPs derivadas de osteoblastos podem ser importantes para a reabsorção óssea, particularmente nos estágios iniciais da remoção da osteóide antes do ataque osteoclástico (Meikle et al., 1995). A MMP-9 é expressa por condroclastos e osteoblastos (Lorenzo et al., 1992) e nós a imuno-localizamos nestas células, bem como nas células do pericôndrio (Figura 4.15A) bem como RECK (Figura 4.15B).

E16-E20

Nesta fase, o osso já está completamente formado e a placa de crescimento está estabelecida (Figura 4.16A) e o crescimento ósseo longitudinal (trabéculas ósseas) é estabelecido via ossificação endocondral. Já o crescimento lateral (cortical) é via ossificação pericondral, onde o pericôndrio do molde cartilaginoso é substituído pelo periósteo (Scott-Scavage e Hall, 1980).

Na placa de crescimento, sabe-se que transcritos para a MMP-9 estão presentes (Reponen et al., 1994; Takahara et al., 2004) e ambas as MMPs foram imuno-localizadas nos osteoblastos e nos condrócitos hipertróficos (E16) (Figura 4.16 B e C), porém esta diminui progressivamente de E17 a E20 (Figura 4.17 A e B). Já RECK e TIMPs foram intensamente imuno-marcadas nos osteoblastos, condrócitos proliferativos e hipertróficos durante todo o período (Figura 4.16 C – E) (Figura 4.17 C – E). Ao nível do pericôndrio e periósteo, ambas as MMPs foram pouco imuno-coradas nas células do pericôndrio (E16) (Figura 4.16 F e G) e a sua expressão diminui progressivamente (E17-E20) (Figura 4.17 A e F). Entretanto RECK e as TIMPs foram intensamente imuno-coradas nestas células (Figura 4.16 F - I) (Figura 4.17 F – I).

Em E16, transcritos de RECK foram fracamente e difusamente localizados nos condrócitos hipertróficos e osteoblastos da placa de crescimento, células do periósteo e pericôndrio, músculo e células da medula óssea (Figura 4.19 A e B). Já em E18, houve o mesmo padrão de distribuição do mRNA, porém mais intenso (Figura 4.20 A - D). *RECK* foi ainda moderadamente encontrado no ligamento do joelho (Figura 4.21 A e B).

PN1

Ao nível da placa de crescimento, a MMP-2 foi moderadamente imuno-corada nos condrócitos hipertróficos (Figura 4.18B), enquanto que a MMP-9 foi somente encontrada nos osteoblastos próximos as trabéculas ósseas (Figura 4.18C). Já RECK, TIMP-1 e TIMP-2 foram intensamente imuno-localizadas nos osteoblastos próximos a cartilagem hipertrófica e ao osso neo-formado., bem como nas células do pericôndrio e periósteo (Figura 4.18 D – I).

De acordo com os resultados obtidos, podemos inferir que as MMPs bem como seus inibidores participam ativamente do controle do crescimento ósseo durante todo o processo de ossificação dos ossos longos.

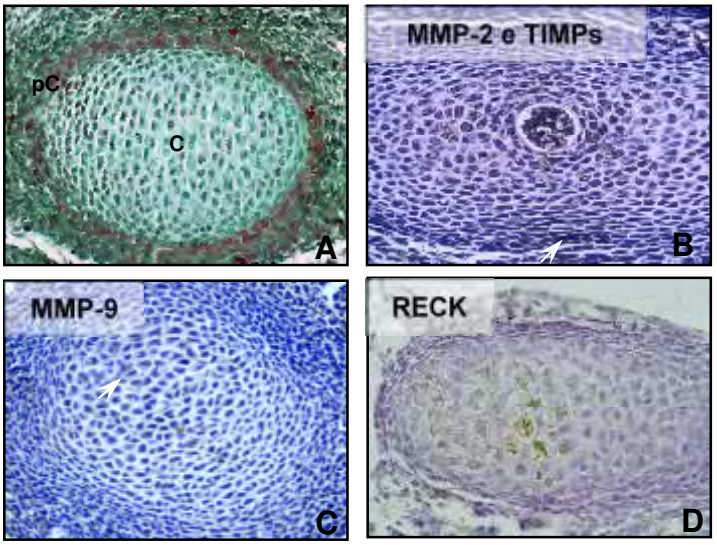


Figura 4.12: *Imunolocalização das MMPs, TIMPs e RECK na fase de diferenciação dos condrócitos da ossificação endocondral (E13). (A) Tricômico de masson. Condrócitos foram imuno-marcados por (B) MMP-2, TIMPs, (C) MMP-9 (seta) e (D) RECK. Algumas células do pericôndrio foram positivas para a MMP-2 (seta). C: condrócito e pC: pericôndrio. Aumento: 10x (A, C e D) e 20x (B).*

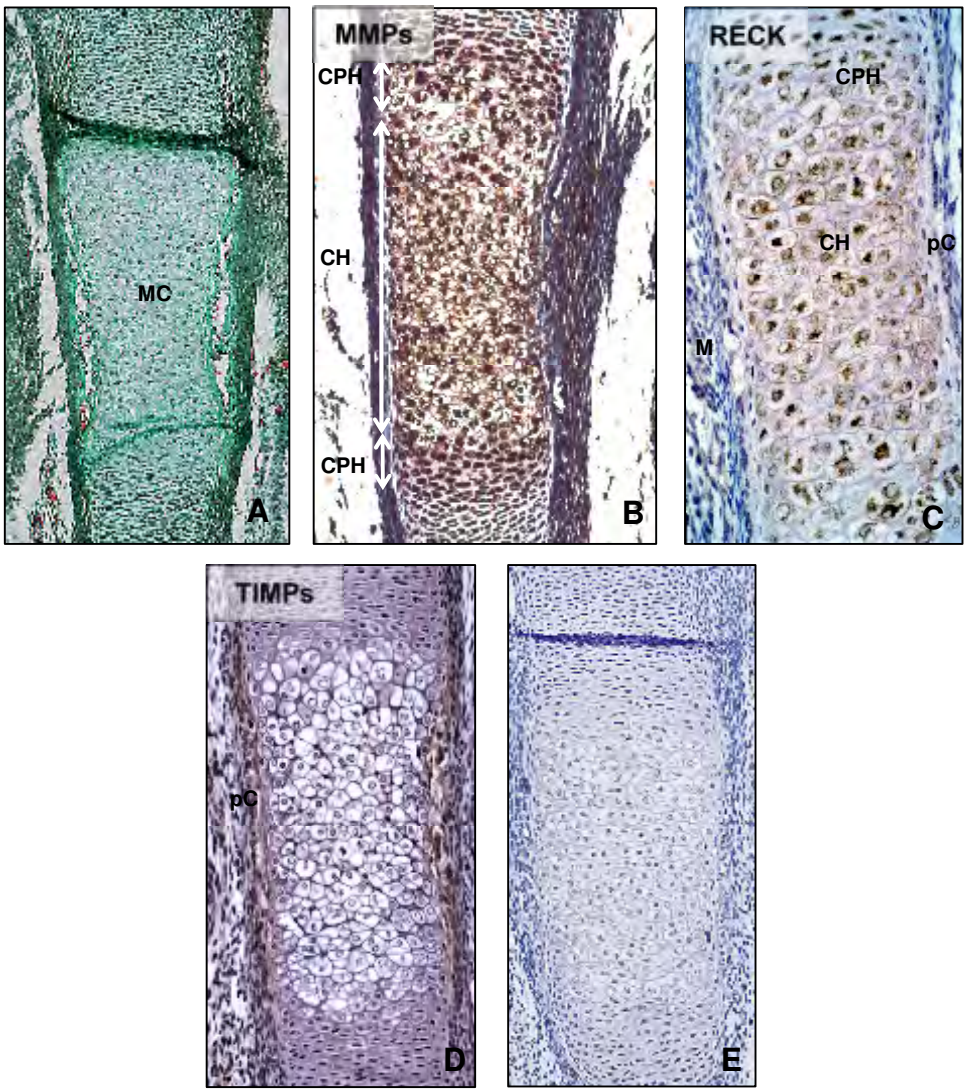


Figura 4.13: *Imunolocalização das MMPs, TIMPs e RECK na fase de molde cartilaginoso da ossificação endocondral (E14). (A) Tricômico de Masson. (B) As MMPs -2 e -9 apresentaram o mesmo perfil de imuno-marcação nos condrócitos pré-hipertróficos e hipertróficos. (C) RECK imunolocalizado nos condrócitos pré-hipertróficos e hipertróficos, células do pericôndrio e músculo. (D) Ambas as TIMPs foram imunolocalizadas somente nas células do pericôndrio. (E) Controle negativo. CH: condrócito hipertrófico, CPH: condrócito pré-hipertrófico, M: músculo, MC: molde cartilaginoso, pC: pericôndrio. Aumento: 10x.*

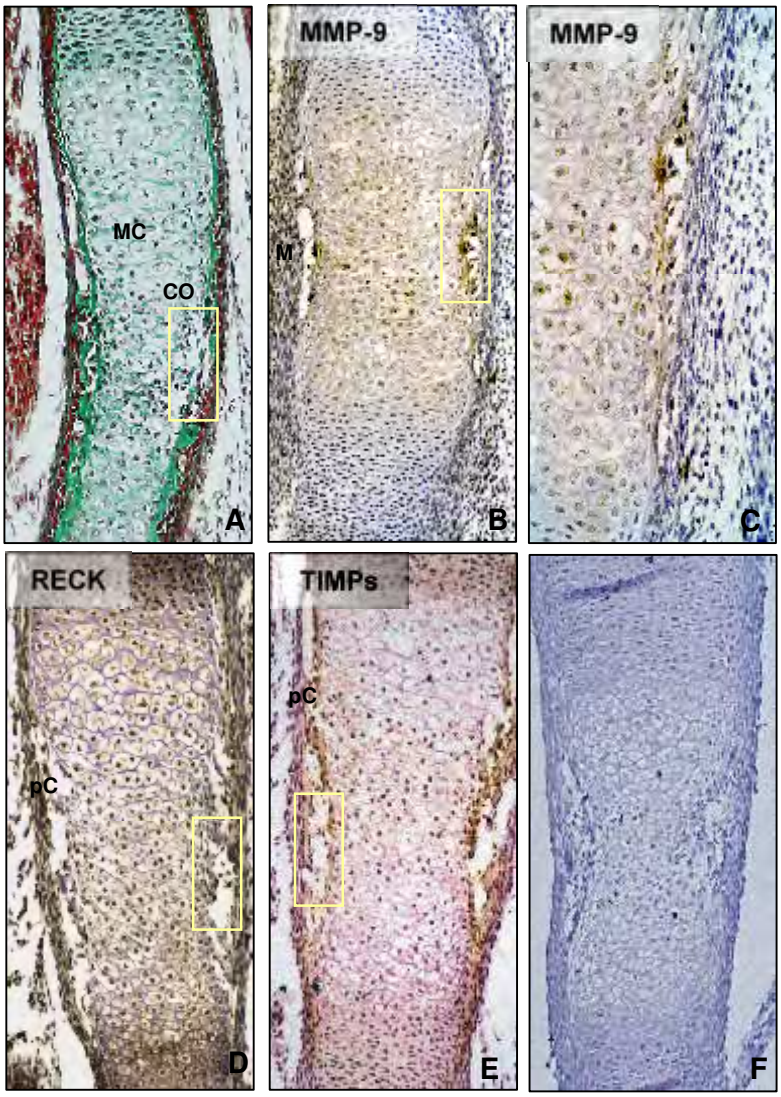


Figura 4.14: *Imunolocalização das MMPs, TIMPs e RECK na fase de invasão vascular e celular inicial da ossificação endocondral (E15). (A) Tricômico de Masson. (B) MMP-9 localizada nas células musculares, condrócitos pré e hipertróficos e (C) colar ósseo. (D) RECK foi imuno-corado no músculo, condrócitos proliferativos, pré e hipertróficos, células do pericôndrio e colar ósseo. (E) As TIMPs exibiram o mesmo perfil visto para RECK, entretanto não foram localizadas nos condrócitos pré-hipertróficos. (F) Controle negativo. CO: colar ósseo, CH: condrócito hipertrófico, CPH: condrócito pré-hipertrófico, M: músculo, MC: molde cartilaginoso e pC: pericôndrio. Aumento: 10x (A e B e D-F) e 20x (C).*

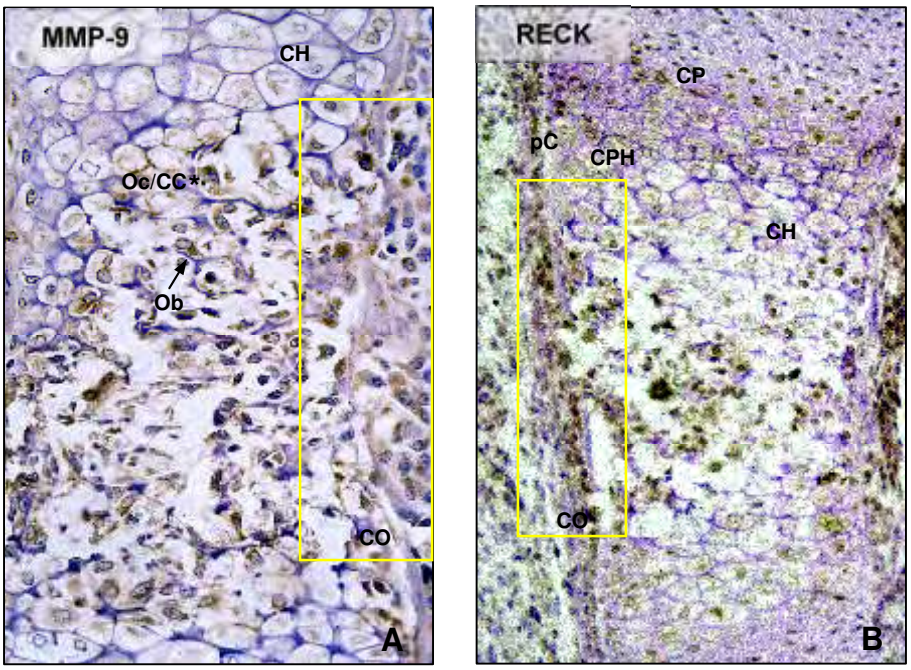


Figura 4.15: *Imunolocalização das MMPs, e RECK na fase de invasão vascular e celular final da ossificação endocondral (E15). (A) MMP-9 expressa por células que migram do colar ósseo e invadem o centro da diáfise, por condrócitos hipertróficos, osteoblastos (seta) e por osteoclastos/condroclastos próximos ao septo transverso (asterisco). (B) RECK apresentou o mesmo perfil da MMP-9, porém imunocorado também nos condrócitos pré-hipertróficos e de proliferação e no pericôndrio. CO: colar ósseo, CH: condrócito hipertrófico, CPH: condrócito pré-hipertrófico, CP: condrócito em proliferação, Oc/CC: osteoclasto e/ou condroclasto, Ob: osteoblasto, pC: pericôndrio. Aumento: 10x (B) e 20x (A).*

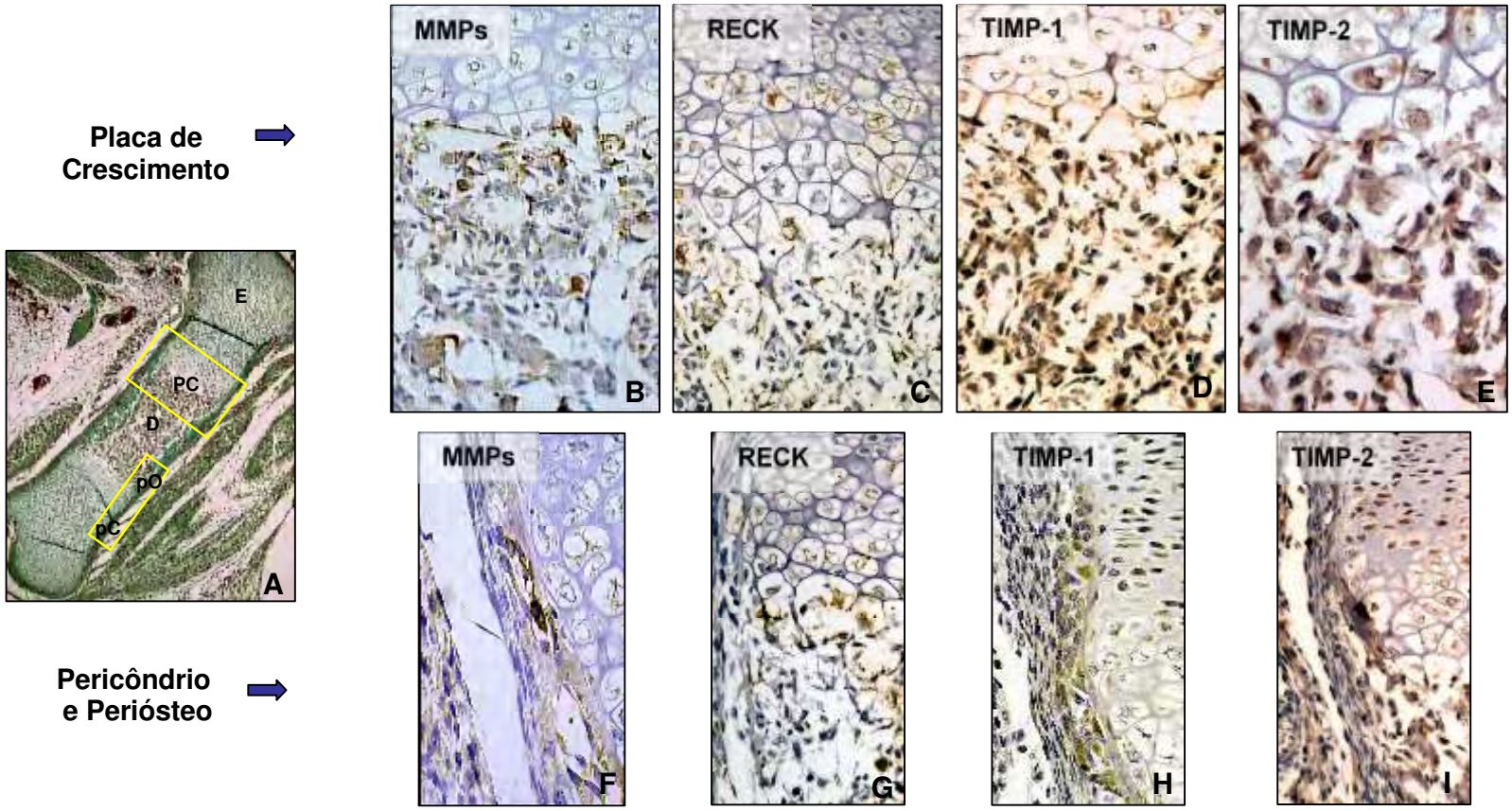


Figura 4.16: *Imunolocalização das MMPs, TIMPs e RECK aos 16 dias do desenvolvimento embrionário (E16). (A) Tricômico de Masson. (B-D) As MMPs, RECK e TIMPs apresentaram o mesmo perfil de imunomarcação nos condrócitos hipertróficos e osteoblastos. (F-I) As MMPs, RECK e TIMPs foram localizadas nas células do pericôndrio. (G-I) RECK e as TIMPs foram imuno-marcadas no periósteo e nos condrócitos em proliferação. Aumento: 4x (A), 10x (F-I), 20x (B-C) e 40x (D-E).*

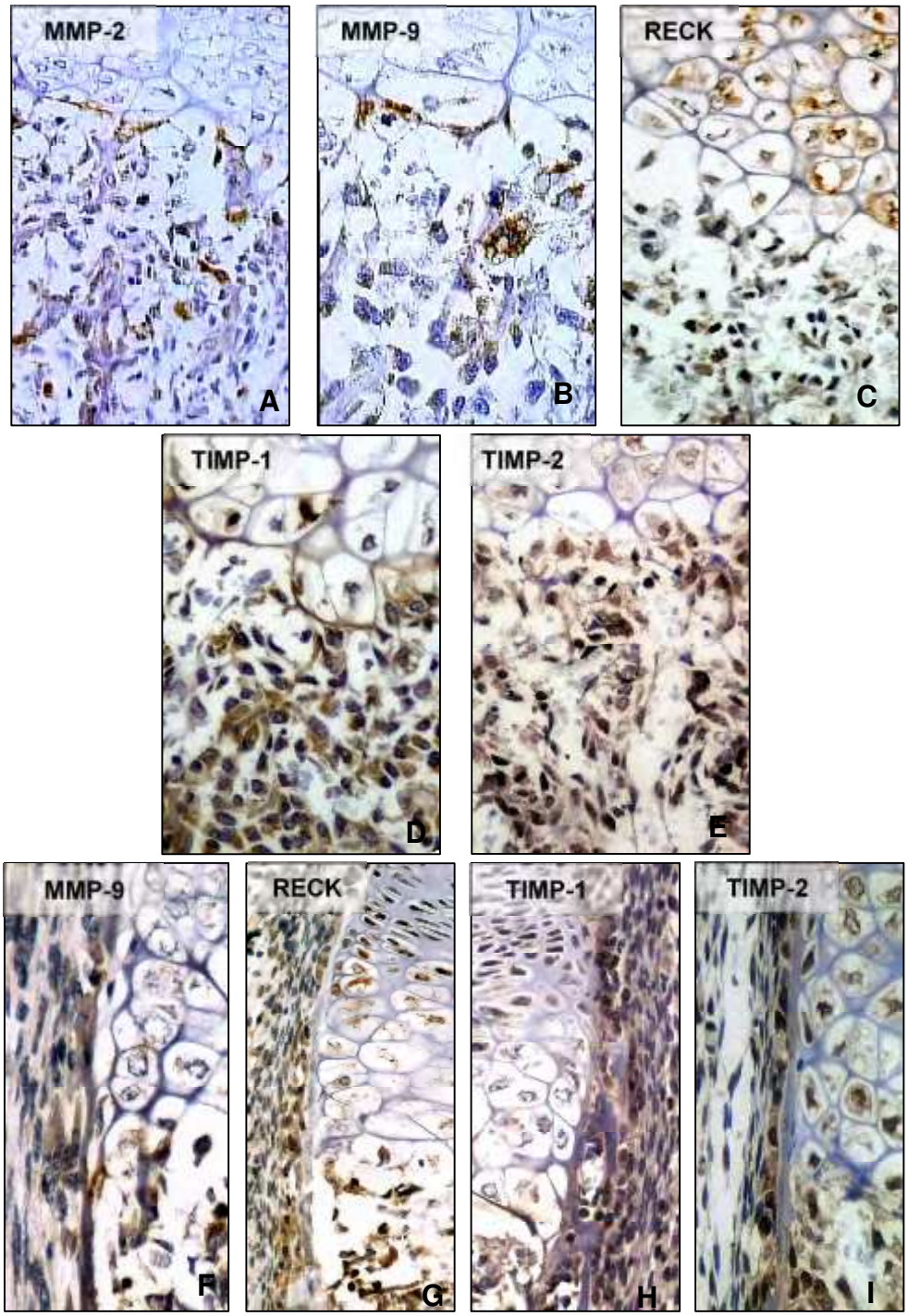


Figura 4.17: *Imunolocalização das MMPs, TIMPs e RECK dos 17 aos 20 dias do desenvolvimento embrionário (E17-E20). (A-E) Na placa de crescimento, os osteoblastos foram imunomarcados para as MMPs, RECK e TIMPs. Os condrócitos hipertróficos também foram imunocorados por (C) RECK, (D) TIMP-1 e (E) TIMP-2. As células do pericôndrio e periósteo também foram imunocoradas por (F) MMP-9, (G) RECK, (H) TIMP-1 e (I) TIMP-2. Aumento: 20x (A-C e F-I) e 40x (D-E).*

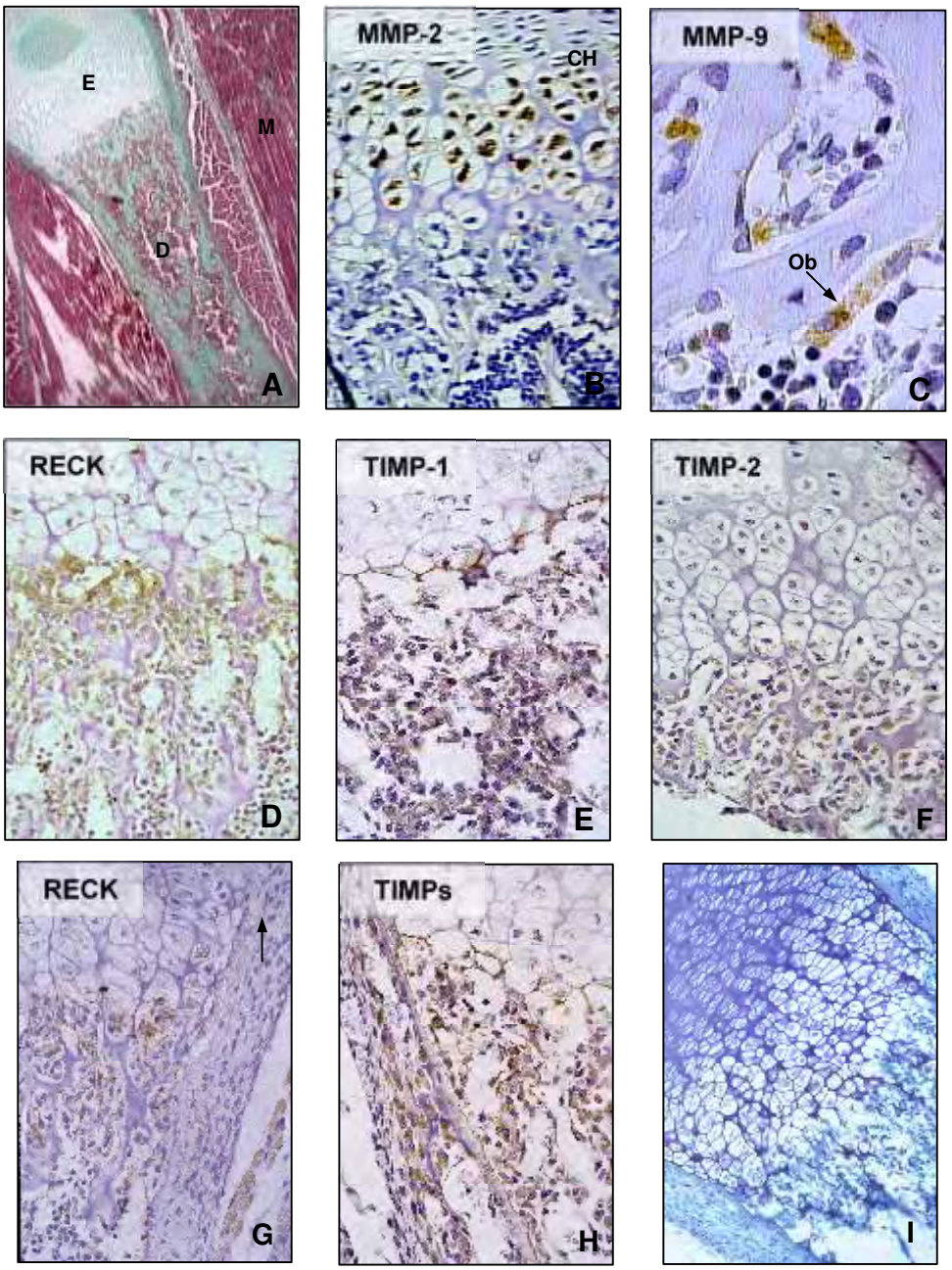


Figura 4.18: *Imunolocalização das MMPs, TIMPs e RECK no recém nascido de 1 dia de vida (PN1). (A) Tricômico de Masson. Ao nível da placa de crescimento, (B) MMP-2 foi imunolocalizada nos condrócitos hipertróficos, (C) MMP-9 nos osteoblastos próximos as trabéculas ósseas, (D) RECK localizado nos condrócitos hipertróficos e osteoblastos, (E) TIMP-1 e (F) TIMP-2 nos osteoblastos. Ao nível do periósteo e pericôndrio, (G) RECK em poucas células do pericôndrio (seta), (H) TIMPs nas células do pericôndio e periósteo. (I) Controle negativo. Aumento 4x (A), 10x (I), 20x (B e D-H) e 100x (C). CH: condrócito hipertrófico, E: epífise, D: diáfise, M: músculo, Ob: osteoblasto.*

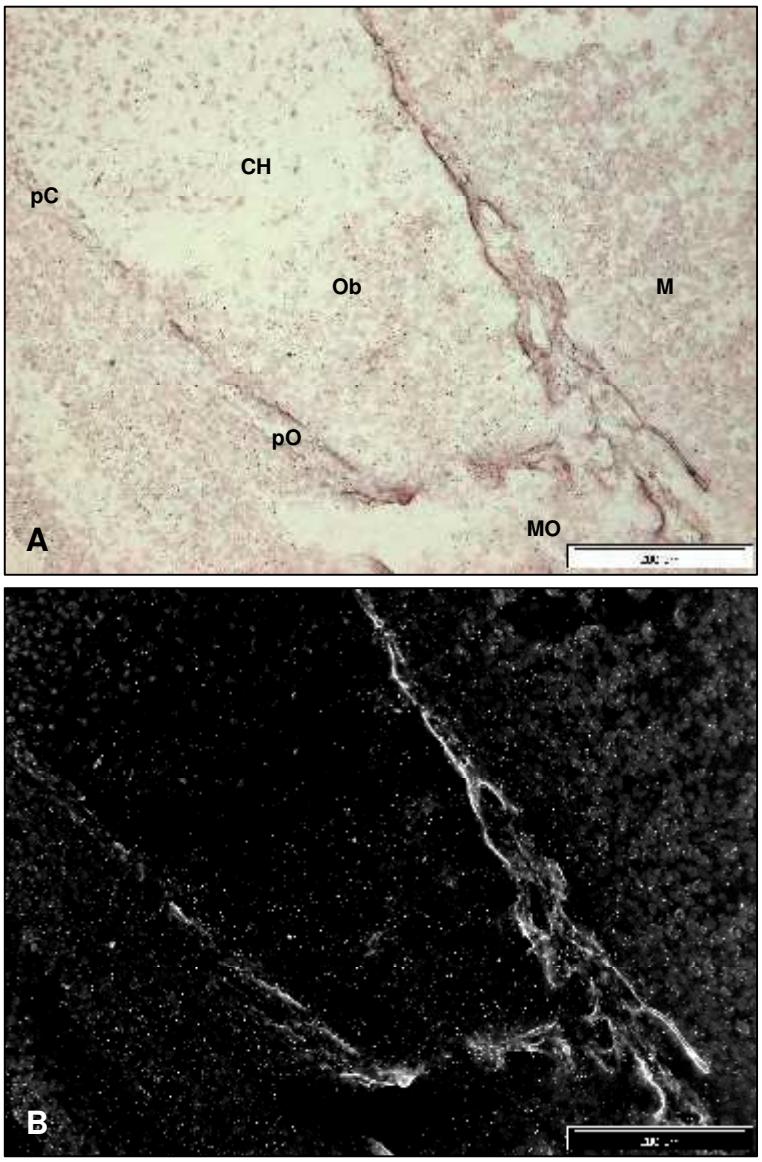


Figura 4.19: *Hibridização in situ para RECK em ossos longos (E16). (A) mRNA localizado nos osteoblastos, periósteo, pericôndrio, condrócitos hipertróficos, células da medula óssea e músculo. (B) Mesmo corte em preto e branco e o mRNA hibridizado são os grânulos brancos. CH: condrócitos hipertróficos, M: músculo, MO: medula óssea, Ob: osteoblasto, pC: pericôndrio e pO: periósteo.*

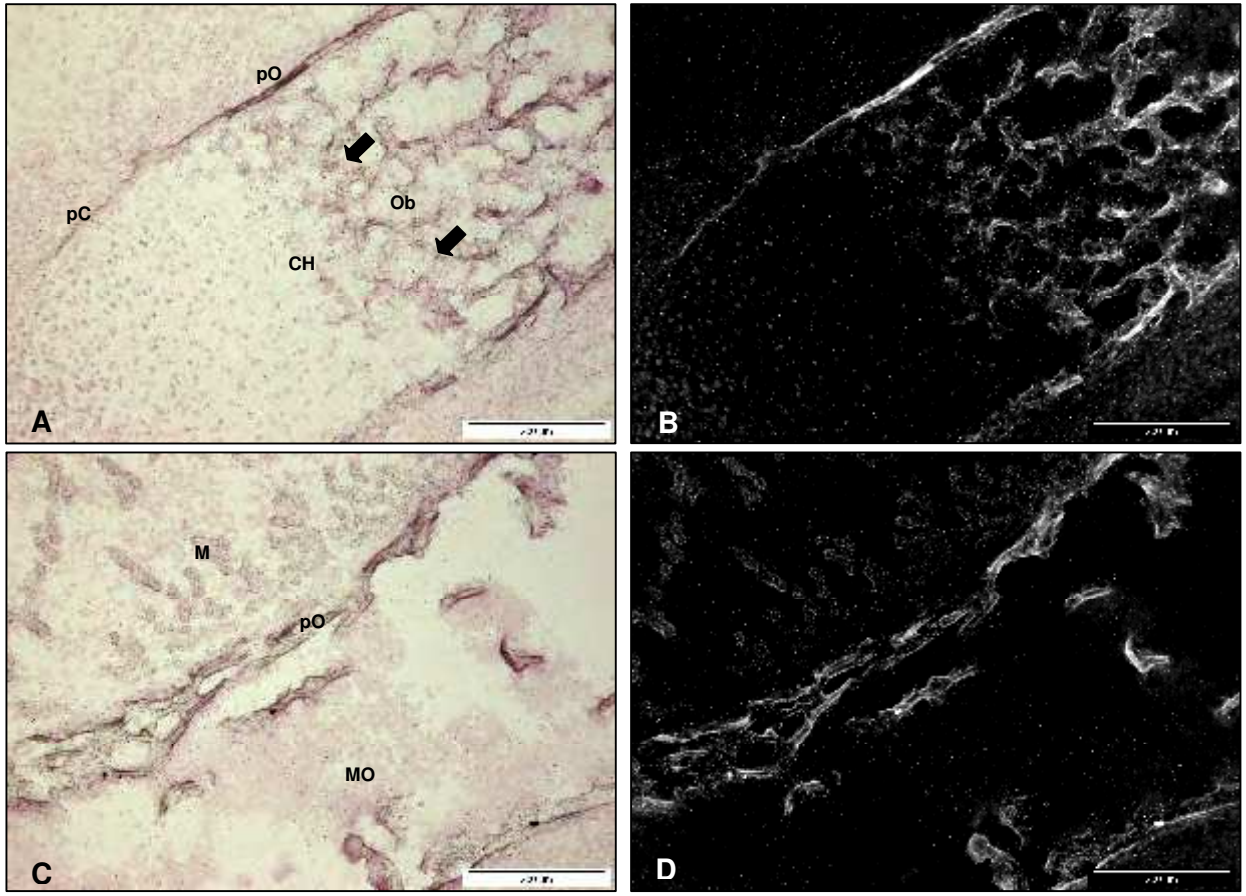


Figura 4.20: *Hibridização in situ para RECK em ossos longos (E18). (A) mRNA localizado nos oetaoblastos (setas), periósteo, pericôndrio, condrócitos hipertróficos e células da medula óssea. (C) mRNA também encontrado no músculo adjacente a peça óssea. (B e D) Mesmo corte em preto e branco e o mRNA hibridizado são os grânulos brancos. CH: condrócitos hipertróficos, M: músculo, MO: medula óssea, Ob: osteoblasto, pC: pericôndrio e pO: periósteo.*

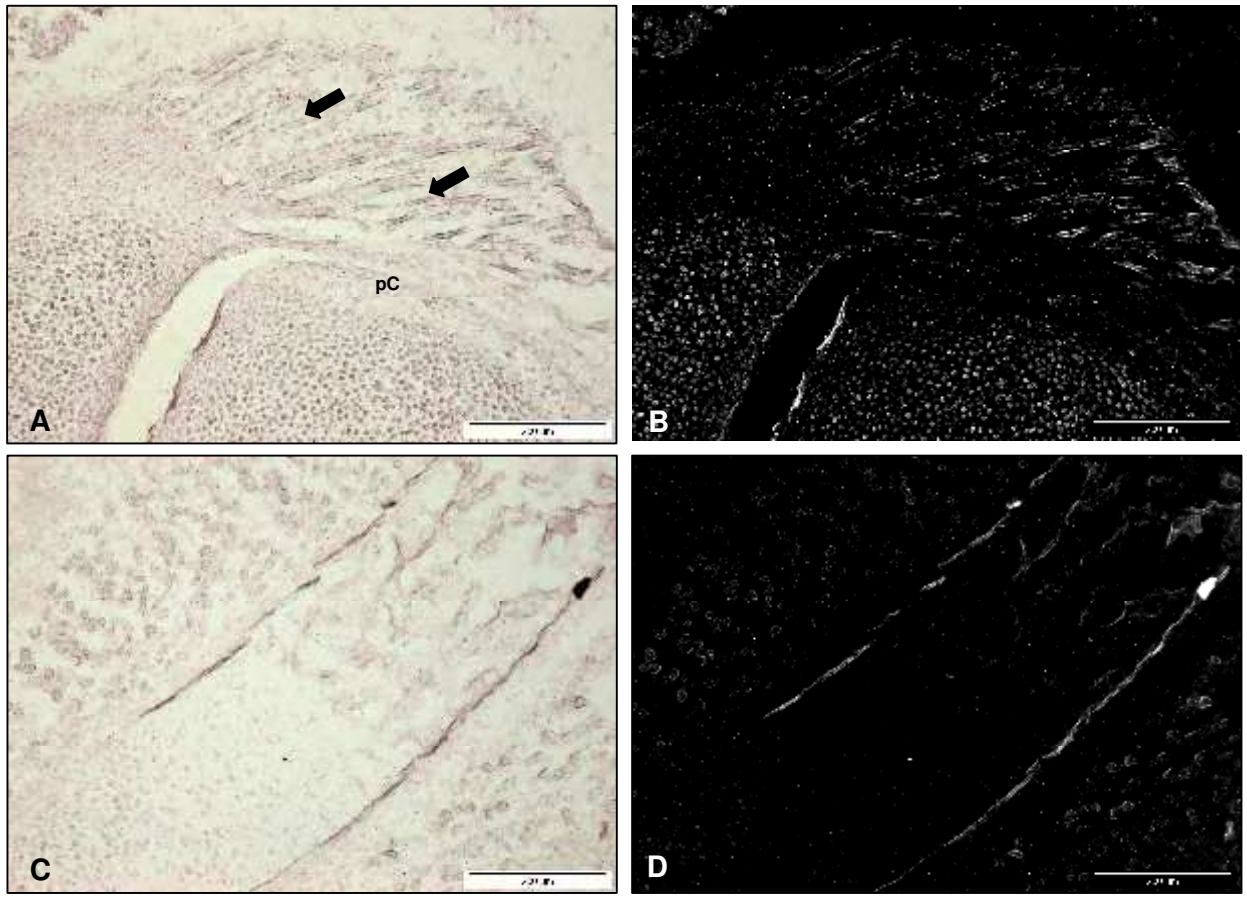


Figura 4.21: *Hibridização in situ para RECK em ossos longos (E18). (A) mRNA localizado nos ligamentos do joelho (setas) e pericôndrio. (B) Mesmo corte em preto e branco e o mRNA hibridizado são os grânulos brancos. (C e D) Controles negativos (sonda 5') com pouco background (grânulos pretos). pC: pericôndrio.*

Quadro 4.3: Resumo dos resultados encontrados em imunohistoquímica durante os estágios iniciais da ossificação endocondral em camundongos.

Estágio do Desenvolvimento e Células Envolvidas		*MMP-2*	*MMP-9*	*RECK*	*TIMP-1*	*TIMP-2*
Diferenciação Condrocítica (E13)	Condrócitos	+++	+	+	+	+
	Pericôndrio	+	-	-	-	-
Molde Cartilaginoso (E14)	Condrócitos em Repouso	-	-	-	-	-
	Condrócitos Proliferativos	++	++	++	-	-
	Condrócitos Pré-Hipertróficos	+++	+++	+++	-	-
	Condrócitos Hipertróficos	+++	+++	+++	-	-
	Pericôndrio	-	-	+	++	++
Invasão Vascular e Celular (E15)	Condrócitos em Repouso	-	-	-	-	-
	Condrócitos Proliferativos	-	-	+++	+	+
	Condrócitos Pré-Hipertróficos	-	++	++	-	-
	Condrócitos Hipertróficos	+++	+	+	+	+
	Pericôndrio	+	++	+++	+++	+++
	Osteoclastos/Chondroclastos		++	+	+	+
	Osteoblastos		++	+	+	+

Legenda: Ausente (-), fraco (+), moderado (++) e intenso (+++).

Quadro 4.4: Resumo dos resultados encontrados em imunohistoquímica durante os estágios finais da ossificação endocondral em camundongos.

Estágio do Desenvolvimento e Células Envolvidas		***MMP-2***	***MMP-9***	***RECK***	***TIMP-1***	***TIMP-2***
E16	Condrócitos em Repouso	-	-	-	-	-
	Condrócitos Proliferativos	-	-	++	++	++
	Condrócitos Pré-Hipertróficos	-	-	+	+	+
	Condrócitos Hipertróficos	+	++	+++	+++	+++
	Osteoblastos	+	+++	++	++	++
	Periósteo	-	-	++	+++	+++
	Pericôndrio	-	++	++	++	++
E17 a	Condrócitos em Repouso	-	-	-	-	-
E20	Condrócitos Proliferativos	-	-	+	-	-
	Condrócitos Pré-Hipertróficos	-	-	+	-	-
	Condrócitos Hipertróficos	-	+	+++	++	+++
	Osteoblastos	+	++	++	+++	+++
	Periósteo	-	++	+++	+++	+++
	Pericôndrio	-	++	+++	+++	+++
PN1	Condrócitos em Repouso	-	-	-	-	-
	Condrócitos Proliferativos	-	-	-	-	-
	Condrócitos Pré-Hipertróficos	-	-	-	-	-
	Condrócitos Hipertróficos	++	-	-	-	-
	Osteoblastos	-	+	+++	+++	++
	Periósteo	-	-	+	+++	+++
	Pericôndrio	-	-	-	++	++

Legenda: Ausente (-), fraco (+), moderado (++) e intenso (+++).

Conclusões

5 – Conclusões

Com base nos resultados obtidos pudemos constatar que:

- As MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e RECK são diferencialmente expressas pelas células do órgão do esmalte e odontoblastos, e localizadas em compartimentos celulares diferentes dependendo da fase da amelogênese.
- RECK é diferencialmente expresso pelas células odontogênicas e localizadas em regiões diferentes dependendo da fase da odontogênese.
- As MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e RECK são diferencialmente expressas pelas células osteogênicas e condrogênicas durante o desenvolvimento da mandíbula e maxila.
- As MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e RECK são diferencialmente expressas pelas células osteogênicas e condrogênicas durante a ossificação endocondral.

Os resultados obtidos apontam para a expressão diferenciada de MMPs, TIMPs e RECK nos diversos eventos estudados, sugerindo que a atividade biológica destas proteínas regula a degradação da matriz extracelular tanto durante o desenvolvimento dos tecidos como sua manutenção. Além disso, pela primeira vez, demonstra-se a expressão de RECK pelas células formadoras dos tecidos ósseo e dentário.

Considerações Finais

6 – Considerações Finais

O esqueleto dos mamíferos tem três distintas origens embrionárias. A primeira é o mesoderma paraxial, o qual origina o esqueleto axial. O segundo é o mesoderma da placa lateral, o qual origina o esqueleto apendicular. Em contraste com os dois primeiros, o terceiro é o ectoderma (crista neural), o qual origina o esqueleto facial. Então, a despeito de todos os ossos serem produzidos por osteoblastos e secretarem a mesma matriz, os ossos têm diferentes origens na ontogenia. Esta diferença pode indicar que os osteoblastos de diferentes origens podem apresentar diferentes mecanismos de sinalização e funções (revisado por Chung et al., 2004).

Nestes últimos anos nosso grupo de pesquisa vem procurando delinear o perfil de expressão das MMPs, TIMPs e RECK, principalmente, no tecido ósseo. Nós verificamos que as MMPs -2 e -9 e RECK são expressas diferencialmente por células do tecido conjuntivo e ósseo durante o reparo alveolar em ratos adultos após a exodontia do incisivo (Accorsi-Mendonça et al., 2007) e por células mesenquimais e epiteliais que contribuem para a formação do palato secundário em embriões de camundongos (Ana Cláudia Cardoso de Oliveira Demarchi, dados não publicados). No presente trabalho, nós verificamos que as MMPs -2, -9, TIMPs -1, -2 e RECK também são diferencialmente expressas por células condrogênicas e osteogênicas durante a ossificação endocondral e intramembranosa em embriões de camundongo. Em conjuntos esses resultados indicam que a proteína RECK é expressa por osteoblastos de qualquer origem embrionária e, devido à modulação em seus níveis de expressão, ela pode ser importante para a formação e manutenção do tecido ósseo.

Perspectivas Futuras

7 – Perspectivas Futuras

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, nós formulamos um novo projeto o qual será desenvolvido nos próximos anos como pesquisa de pós-doutoramento. O objetivo central deste novo desafio será a avaliação da expressão dos genes *Ras, Myc, Jun, Fos e Msx*, e seus respectivos fatores de transcrição, os quais regulam RECK, MMPs -2, -9 e -14 e TIMPs -1, -2, -3 e -4. Estes fatores de transcrição são produtos de proto-oncogenes que são moléculas-chave e possuem diversas funções na transdução de sinal, proliferação, diferenciação celular e desenvolvimento embrionário, bem como na transformação celular e oncogênese. Avançados estudos têm demonstrado que os oncogenes desempenham importantes funções no controle da atividade das células ósseas e, assim, nós pretendemos avaliá-los durante a ossificação endocondral em embriões de camundongos. Para tal, utilizaremos a técnica imunohistoquímica e *western blot* para a localização e quantificação destas proteínas, respectivamente, hibridização *in situ* e o Real-Time PCR para a localização e quantificação do mRNA, respectivamente e zimografia em gel e in situ para a quantificação e localização da atividade enzimática, respactivamente. Este trabalho será supervisionado pelo Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes (Departamento de Estomatologia, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo) e em colaboração com o Prof. Dr. José Mauro Granjeiro (Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense) e a Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar (Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo).

Referências Bibliográficas

8 - Referências Bibliográficas

Aberg T, Wozney J, Thesleff I (1997) Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. **Dev Dyn** 210:383-96.

Abiko Y, Kutsuzawa M, Kowashi Y, Kaku T, Tachikawa T (1999) In situ detection of gelatinolytic activity in developing craniofacial tissues. **Anat Embryol (Berl)** 200:283-7.

Accorsi-Mendonça T, Paiva KBS, Zambuzzi WF, Cestari TM, Lara VS, Sogayar MC, Taga R, Granjeiro JM Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and RECK during alveolar bone regeneration in rat. **J Mol Histol** (*in press*).

Ahokas K, Lohi J, Lohi H, Elomaa O, Karjalainen-Lindsberg ML, Kere J, Saarialho-Kere U (2002) Matrix metalloproteinase-21, the human orthologue for XMMP, is expressed during fetal development and in cancer. **Gene** 301:31-41.

Aimes RT, Quigley JP (1995) Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyses the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific ¾- and ¼-length fragments. **J Biol Chem** 270:5872-6.

Allan JA, Docherty AJP, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ (1995) Binding of gelatinase A and B to type-I collagen and other matrix components. **Biochem J** 309:299-306.

Amano O, Koshimizu U, Nakamura T, Iseki S (1999) Enhancement by hepatocyte growth factor of bone and cartilage formation during embryonic mouse mandibular development in vitro. **Arch Oral Biol** 44:935-46.

Amling M, Neff L, Tanaka S, Inoue D, Kuida K, Weir E, Philbrick WM, Broadus AE, Baron R (1997) Blc-2 lies downstream of parathyroid hormone-related peptide in a signaling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development. **J Cell Biol** 136:205-13.

Andersen TL, Overejo MC, Kirkegaard T, Lenhard T, Foged NT, Delaissé JM (2004) A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by others cells. **Bone** 35:1107-19.

Andujar MB, Couble P, Couble ML, Magloire H (1991) Differential expression of type I and type III colagen genes during tooth development. **Development** 111:691-8.

Apte SS, Hayashi K, Seldin MF, Mattei MG, Hayashi M, Olsen BR (1994) Gene encoding a novel murine tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP), TIMP-3, is expressed in developing in mouse epithelia, cartilage, and muscle, and is located on mouse chromosome 10. **Dev Dyn** 200:177-97.

Apte SS, Olsen BR, Murphy G (1995) The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. **J Biol Chem** 270:14313-8.

Apte SS, Fukai N, Beier DR, Olsen BR (1997) The matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) gene is structurally distinct from other MMP genes and is co-expressed with the TIMP-2 gene during mouse embryogenesis. **J Biol Chem** 272:25511-7.

Arbeláez LF, Bergmann U, Tuuttila A, Shanbhag VP, Stigbrand T (1997) Interaction of matrix metalloproteinase-2 and -9 with pregnancy zone protein and α2-macroglobulin. **Arch Biochem Biophys** 37:62-8.

Arner EC, Tortorella MD (1995) Signal transduction through chondrocyte integrin receptors induces matrix metalloproteinase synthesis and synergizes with interleukin-1. **Arthritis Rheum** 38:1304-14.

Arsenault AL, Robinson BW (1989) The dentino-enamel junction: a structural and microanalytical study of early mineralization. **Calcif Tissue Int** 45:111-21.

Ashworth JL, Murphy G, Rock MJ, Sherratt MJ, Shapiro SD, Shuttleworth CA, Kielty CM (1999) Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodeling. **Biochem J** 340:171-81.

Aszódi A, Bateman JF, Gustafsson E, Boot-Handford R, Fassler R (2000) Mammalian skeletogenesis and extracellular matrix: what can we learn from knockout mice? **Cell Struct Funct** 25:73-84.

Atkinson SJ, Crabbe T, Cowell S, Ward RV, Butler MJ, Sato H, Seiki M, Reynolds JJ, Murphy G (1995) Intermolecular autolytic cleavage can contribute to the activation of procollagenase A by cell membrane. **J Biol Chem** 270:30479-85.

Azzam HS, Thompson EW (1992) Collagen-induced activation of the M(r) 72,000 type IV collagenase in normal and malignant human fibroblastoid cells. **Cancer Res** 52:4540-4.

Baker AH, Edwards DR, Murphy G (2002) Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. **J Cell Sci** 115:3719-27.

Barrett AJ, Rawlings ND, O'Brien EA (2001) The MEROPS database as a protease information system. **J Struct Biol** 134:95-192.

Bartlett JD, Simmer JP (1999) Proteinases in developing dental enamel. **Crit Rev Oral Biol Med** 10:425-41.

Bartlett JD, Simmer JP, Xue J, Margolis HC, Moreno EC (1996) Molecular cloning and mRNA tissue distribution of a novel matrix metalloproteinase isolated from porcine enamel organ. **Gene** 183:123-8.

Bartlett JD, Zhou Z, Skobe Z, Dobeck JM, Tryggvason K (2003) Delayed tooth eruption in membrane type-1 matrix metalloproteinase deficient mice. **Connect Tissue Res** 44:300-4.

Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, Podhajcer OL, Chenard MP, Rio MC, Chambon P (1990) A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. **Nature** 348:699-704.

Bauer EA, Stricklin GP, Jeffrey JJ, Eisen AZ (1975) Collagenase production by human skin fibroblasts. **Biochem Biophys Res Commun** 64:232–40.

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

Beertsen W, Holmbeck K, Niehof A, Bianco P, Chrysovergis K, Birkedal-Hansen H, Everts V (2003) Inhibition of molar eruption and root elongation in MT1-MMP-deficient mice. **Connect Tissue Res** 44:298-9.

Bégue-Kirn C, Krebsbach PH, Bartlett JD, Butler WT (1998) Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. **Eur J Oral Sci** 106:963-70.

Benbow U, Brinckerhoff CE (1997) The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? **Matrix Biol** 15:519-26.

Bertaux B, Hornebeck W, Eisen AZ, Dubertret L (1991) Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases. **J Invest Dermatol** 97:679-85.

Berton A, Godeau G, Emonard H, Baba K, Bellon P, Hornebeck W, Bellon G (2000) Analysis of the ex vivo specificity of human gelatinases A and B towards skin collagen and elastic fibers by computerized morphometry. **Matrix Biol** 19:139-48.

Bewsey KE, Wen C, Purple C, Homandberg GA (1996) Fibronectin fragments induce the expression of stromelysin-1 mRNA and protein in bovine chondrocytes in monolayer culture. **Biochim Biophys Acta** 1317:55-64.

Bigg HF, Shi YE, Liu YE, Steffensen B, Overall CM (1997) Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A – TIMP-4 binds progelatinase A and COOH-terminal domain in a similar manner to TIMP-2. **J Biol Chem** 272:15496-500.

Birkedal-Hansen H (1993) Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. **J Periodontal** 64:474-84.

Birkedal-Hansen H (1995) Proteolytic remodeling of extracellular matrix. **Curr Opin Cell Biol** 7:728-35.

Blair HC, Dean DD, Howell DS, Teitelbaum SL, Jeffrey JJ (1989) Hypertrophic chondrocytes produce immunoreactive collagenase in vivo. **Connect Tissue Res** 23:65-73.

Blavier L, Delaissé JM (1995) Matrix metalloproteinases are obligatory for the migration of preosteoclasts to the developing marrow cavity of primitive long bones. **J Cell Sci** 108:3649-59.

Blavier L, DeClerck YA (1997) Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 is expressed in the interstitial matrix in adult mouse organs and during embryonic development. **Mol Biol Cell** 8:1513-27.

Blavier L, Lazaryev A, Groffen J, Heisterkamp N, DeClerck YA, Kaartinen V (2001) TGF-β-3-induced palatogenesis requires matrix metalloproteinases. **Mol Biol Cell** 12:1457-66.

Bleicher F, Couble ML, Frages JC, Couble P, Magloire H (1999) Sequential expression of matrix protein genes in developing rat teeth. **Matrix Biol** 18:133-43.

Blumenfeld I, Srouji S, Peled M, Livne E (2002) Metalloproteinases (MMPs -2, -3) are involved in TGF-β and IGF-1-induced bone defect healing in 20-month-old female rats. **Arch Gerontol Geriatr** 35:59-69.

Bluteau G, Conrozier T, Mathieu P, Vingnon E, Herbage D, Mallein-Gerin F (2001) Matrix metalloproteinase-1, -3, -13 and aggrecanase-1 and -2 are differentially expressed in experimental osteoarthritis. **Biochim Biophys Acta** 1526:147-58

Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A (2005) PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. **Cell** 120:303-13.

Bord S, Horner A, Hembry RM, Reynolds JJ, Compston JE (1996) Production of collagenase by human osteoblasts and osteoclasts in vivo. **Bone** 19:35-40.

Bord S, Horner A, Hembry RM, Reynolds JJ, Compston JE (1997) Distribution of matrix metalloproteinases and their inhibitor, TIMP-1, in developing human osteophytic bone. **J Anat** 191:39-48.

Bord S, Horner A, Hembry RM, Compston JE (1998) Stromelysin-1 (MMP-3) and stromelysin-2 (MMP-10) expression in developing human bone: potential roles in skeletal development. **Bone** 23:7-12.

Bord S, Horner A, Beeton CA, Hembry RM, Compston JE (1999) Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) distribution in normal and pathological human bone. **Bone** 24:229-35.

Borden P, Solymar D, Sucharczuk A, Lindman B, Cannon P, Heller RA (1996) Cytokine control of interstitial collagenase ans collagenase-3 gene expression in human chondrocytes. **J Biol Chem** 271:23577-81.

Bosshardt DD, Schroeder HE (1993) Attempts to label matrix synthesis of human root cementum in vitro. **Cell Tissue Res** 274:343-52.

Bosshardt DD, Schroeder HE (1996) Cementogenesis reviewed: a comparison between human premolars and rodent molars. **Anat Rec** 245:267-92.

Bosshardt DD, Nanci A (1997) Immunodetection of enamel- and cementum-related (bone) proteins at the enamel-free area and cervical portion of the tooth in rat molars. **J Bone Miner Res** 12:367-79.

Boudreau N, Sympson CJ, Werb Z, Bissell MJ (1995) Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. **Science** 267:891-3.

Bourd-Boittin K, Septier D, Hall R, Goldberg M, Menashi S (2004) Immunlocalization of enamelysin (matrix metalloproteinase-20) in the forming rat incisor. **J Histochem Cytochem** 52:437-45.

Bourd-Boittin K, Fridman R, Fanchon S, Septier D, Goldberg M, Menashi S (2005) Matrix metalloproteinase inhibition impairs the processing, formation and mineralization of dental tissues during mouse molar development. **Exp Cell Res** 304:493-505.

Bourguignon LY, Gunja-Smith Z, Iida N, Zhu HB, Young LJ (1998) CD44v(3, 8–10) is involved in cytoskeleton-mediated tumor cell migration and matrix metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells. **J Cell Physiol** 176:206–15.

Boyde A (1989). Enamel. In: Oksche A, Vollrath L (eds), Handbook of Microscopic Anatomy, v. V/6: Teeth. Berlin, Springer, 310-473.

Breckon JJ, Hembry RM, Reynolds JJ, Meikle MC (1995) Matrix Metalloproteinase and TIMP-1 localization at sites of osteogenesis in the craniofacial region of rabbit embryo. **Anat Rec** 242:177-87.

Brinckerhoff CE, Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinases: a tail of a frog thet became a prince. **Nat Rev Mol Cell Biol** 3:207-14.

Brooke BS, Karnik SK, Li DY (2003) Extracellular matrix in vascular morphogenesis and disease: structure versus signal. **Trends Cell Biol** 13:51-6.

Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevensen WG, Quigley JP, Cheresh DA (1996) Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin αvβ3. **Cell** 85:683-93.

Brown CC, Hembry RM, Reynolds JJ (1989) Immunolocalization of metalloproteinases and their inhibitor in the rabbit growth plate. **J Bone Joint Surg Am** 71:580-93.

Brown PD, Levy AT, Marguilies IM, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG (1990) Independent expression and cellular processing of Mr 72,000 type IV collagenase and interstitial collagenase in human tumorigenic cell lines. **Cancer Res** 50:6184-91.

Butler GS, Will H, Atkinson SJ, Murphy G (1997) Membrane-type-2 matrix metalloproteinase can initiate the processing of progelatinase A and is regulated by the tissue inhibitors of metalloproteinases. **Eur J Biochem** 244:653-7.

Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ, Will H, Tamura T, van Westrum SS, Crabbe T, Clements J, D'Ortho MP, Murphy G (1998) The TIMP-2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A: a kinetic study. **J Biol Chem** 273:871-80.

Canalis E, Rydziel S, Delany AM, Varguese S, Jefrey JJ (1995) Insulin-like growth factors inhibit interstitial collagenase synthesis in bone cell cultures. **Endocrinology** 136:1348-54.

Caron C, Xue J, Bartlett JD (1998) Expression and localization of membrane type 1 matrix metalloproteinase in tooth tissues. **Matrix Biol** 17:501-11.

Caron C, Xue J, Sun X, Simmer JP, Bartlett JD (2001) Gelatinase A (MMP-2) in developing tooth tissues and amelogenin hydrolysis. **J Dent Res** 80:1660-4.

Case JP, Sano H, Lafyatis R, Remmers EF, Kumkumian GK, Wilder RL (1989a) Transin/stromelysin expression in the synovium of rats with experimental erosive arthritis. In situ localization and kinetics of expression of the transformation-associated metalloproteinase in euthymic and athymic Lewis rats. **J Clin Invest** 84:1731-40.

Case JP, Lafyatis R, Remmers EF, Kumkumian GK, Wilder RL (1989b) Transin/stromelysin expression in rheumatoid synovium. A transformation-associated metalloproteinase secreted by phenotypically invasive synoviocytes. **Am J Pathol** 135:1055-64.

Caterina JJ, Yamada S, Caterina NCM, Longenecker G, Holmbäck K, Shi J, Yermovsky AE, Engler JA, Birkedal-Hansen H (2000a) Inactivating mutation of the mouse tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) gene alters proMMP-2 activation. **J Biol Chem** 275:26416-22.

Caterina JJ, Shi J, Sun X, Qian Q, Yamada S, Liu Y, Krakora S, Bartlett JD, Yamada Y, Engler JA, Birkedal-Hansen H, Simmer JP (2000b) Cloning, characterization, and expression analysis of mouse enamelysin. **J Dent Res** 79:1697-1703.

Caterina JJ, Skobe Z, Shi J, Ding Y, Simmer JP, Birkedal-Hansen H, Bartlett JD (2002) Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. **J Biol Chem** 277:49598-604.

Cawston TE, Galloway WA, Mercer E, Murphy G, Reynolds JJ (1981) Purification of rabbit bone inhibitor of collagenase. **Biochem J** 195:159-65.

Cawston TE, Murphy G, Mercer E, Galloway WA, Hazleman BL, Reynolds JJ (1983) The interaction of purified rabbit bone collagenase with purified rabbit bone metalloproteinase inhibitor. **Biochem J** 211:313-8.

Cawston TE, Bigg HF, Clark IM, Hazleman BL (1993) Identification of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2)-progelatinase complex as the third metalloproteinase inhibitor peak in rheumatoid synovial fluid. **Ann Rheum Dis** 52:177-81.

Cawston TE, Rowan A (1998) Prevention of cartilage breakdown by matrix metalloproteinase inhibition: a realistic therapeutic target? **Br J Rheumatol** 37:353-6.

Chai Y, Mah A, Crohin C, Groff S, Bringas P Jr, Le T, Santos V, Slavkin HC (1994) Specific transforming growth factor-bta subtypes regulate embryonic mouse Meckel'scartilage and tooth development. **Dev Biol** 162:85-103.

Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM (2000) Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. **Development** 127:1671-9.

Chirco R, Liu XW, Jung KK, Kim HRC (2006) Novel functions of TIMPs in cells signaling. **Cancer Metastasis Rev** 25:99-113.

Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. **Biochemistry** 18:5294-5299.

Cho MI, Garant PR (1996) Expression and role of epidermal growth factor receptors during differentiation of cementoblasts, osteoblasts, and periodontal ligament fibroblasts in the rat. **Anat Rec** 245:342-60.

Chubinskaya S, Huch K, Mikecz K, Cs-Szabo G, Hasty KA, Kuettner KE, Cole AA (1996) Chondrocyte matrix metalloproteinase-8: up-regulation of neutrophil collagenase by interleukin-1 beta in human cartilage from knee and ankle joints. **Lab Invest** 74:232-40.

Crabbe T, Smith B, O'Connell J, Docherty AJP (1994a) Human progelatinase A can be activated by matrilysin. **FEBS Lett** 345:14-6.

Cole AA, Chubinskaya S, Schumacher B, Huch K, Cs-Szabo G, Yao J, Mikecz K, Hasty KA, Kuettner KE (1996) Chondrocyte matrix metalloproteinase-8: human articular chondrocytes Express neutrophil collagenase. **J Biol Chem** 271:11023-6.

Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He C, Bauer EA, Goldberg GI (1988) H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. **J Biol Chem** 263:6579-87.

Collier IE, Krasnov PA, Strongin AY, Birkedal-Hansen H, Goldberg GI (1992) Alanine scanning mutagenesis and functional analysis of the fibronectin-like collagen-binding domain from human 92-kDa type IV collagenase. **J Biol Chem** 267:6776-81.

Collins JM, Remamoorthy K, Da Silveira A, Patson P, Mão JJ (2005) Expression of matrix metalloproteinase genes in the rat intramembranous bone during postnatal growth and upon mechanical stresses. **J Biomecham** 38:485-92.

Colnot CI, Helms JA (2001) A molecular analysis of matrix remodeling and angiogenesis during long bone development. **Mech Dev** 100:245-50.

Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG (1995) Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) stimulates fibroblast proliferation via a cyclic adenosine 3', 5'-monophosphatase (cAMP)-dependent mechanism. **J Biol Chem** 270:13453-9.

Cotrim P, Andrade CR, Line S, Almeida OP, Coletta RD (2002) Expression ans activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in the development of rat first molar tooth germ. **Braz Dent J** 13:97-102.

Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. **Science** 295:2387-92.

Curran S, Murray G (1999) Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. **J Pathol** 189:300-8.

Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR, Bonewald LF (2002) Proteolysis of latent transforming growth factor-β (TGF-β)-binding protein-1 by osteoclasts. **J Biol Chem** 277:21352-60.

D'Angelo M, Yan Z, Nooreyazdan M, Pacifi M, Sarment DS, Billings PC, Leboy PS (2000) MMP-13 is induced during chondrocyte hypertrophy. **J Cell Biochem** 77:678-93.

D'Angelo M, Sarment DP, Billings PC, Pacifi M (2001a) Activation of transforming growth factor β in chondrocytes undergoing endochondral ossification. **J Bone Miner Res** 16:2339-47.

D'Angelo M, Billings PC, Pacifi M, Leboy OS, Kirsch T (2001b) Authentic matrix vesicles contain active metalloproteinases (MMP): a role for matrix vesicle-associated MMP-13 in activation of transforming growth factor-β. **J Biol Chem** 276:11347-53.

Davoli MA, Lamplugh L, Beauchemin A, Chan K, Mordier S, Mort JS, Murphy G, Docherty AJP, Leblond CP, Lee ER (2001) Enzymes active in the areas undergoing cartilage resorption during the development of the secondary ossification center in the tibiae of rats aged 0-21 days: II. Two proteinases, gelatinase B and collagenase-3, are implicated in the lysis of collagen fibrils. **Dev Dyn** 222:71-88.

Dean DD, Muniz OE, Howell DS (1989) Association of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) with hypertrophic cell enlargement in the growth plate. **Matrix** 9:366-75.

DeClerck YA, Yean TD, Lee Y, Tomich JM, Langley KE (1993) Characterization of the functional domain of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). **Biochem J** 289:65-9.

Delany AM, Jeffrey JJ, Rydziel S, Canalis E (1995) Cortisol increases interstitial collagenase expression in osteoblasts by posttranscriptional mechanisms. **J Biol Chem** 270:26607-12.

Delaissé JM, Eeckhout Y, Neff L, Francois-Gillet C, Henriet P, Su Y, Vaes G, Baron R (1993) (Pro)collagenase (matrix metalloproteinase-1) is present in rodent osteoclasts and in the underlying bone-resorbing compartment. **J Cell Sci** 106:1071-82.

Delaissé JM, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L (2003) Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. **Microsc Res Tech** 61:504-13.

Denhardt DT, Feng B, Edwards DR, Cocuzzi ET, Malyankar UM (1993) Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP, aka EPA): structure, control of expression and biological functions. **Pharmacol Ter** 59:329-41.

DenBesten PK, Heffernan LM (1989) Separation by polyacrylamide gel electrophoresis of multiple proteases in rat and bovine enamel. **Arch Oral Biol** 34:399-404.

Deryugina EI, Ratnikov B, Monosov E, Postnova TI, DiScipio R, Smith JW, Strongin AY (2001) MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin αvβ3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. **Exp Cell Res** 263:209–23.

Desrivieres S, Lu H, Peyri N, Soria C, Legrand Y, Menashi S (1993) Activation of the 92 kDa type IV collagenase by tissue kallikrein. **J Cell Physiol** 157:587-93.

Dew G, Murphy G, Stanton H, Vallon R, Angel P, Reynolds JJ, Hembry RM (2000) Localisation of matrix metalloproteinases and TIMP-2 in resorbing mouse bone. **Cell Tissue Res** 299:385-94.

DiBattista JA, Pelletier JP, Zafarullah M, Iwata K, Martel-Pelletier J (1995) Interleukin-1β induction of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) is functionally antagonized by protaglandin E2 in human synovial fibroblasts. **J Cell Biochem** 57:619-29.

Dolo V, Ginestra A, Cassara D, Violini S, Lucania G, Torrisi MR, Nagase H, Canevari S, Pavan A, Vitorelli ML (1998) Selective localization of matrix metalloproteinase 9, β1 integrins, and human lymphocyte antigen class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells. **Cancer Res** 58:4468-74.

Domon S, Shimokawa H, Matsumoto Y, Yamaguchi S, Soma K (1999) In situ hybridization for matrix metalloproteinase-1 and cathepsin K in rat root-resorbing tissue induced by tooth movement. **Arch Oral Biol** 44:907-15.

D'Ortho MP, Will H, Atkinson S, Butler G, Messent A, Gavrilovic J, Smith B, Timpl R, Zardi L, Murphy G (1997) Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. **Eur J Biochem** 250:751-7.

Durbeej M, Ekblom P (1997) Dystroglycan and laminins: glycoconjugates involved in branching epithelial morphogenesis. **Exp Lung Res** 23:109-18.

Echizenya M, Kondo S, Takahashi R, Oh J, Kawashima S, Kitayama H, Takahashi C, Noda M (2005) The membrane-anchored MMP-regulator RECK is a target of myogenic regulatory factors. **Oncogene** 24:5850-7.

Egeblad M, Werb Z (2002) New roles for matrix metalloproteinases in cancer. **Nat Rev Cancer** 2: 163–76.

Ellerbroek SM, Stack MS (1999) Membrane associated matrix metalloproteinases in metastasis. **BioEssays** 21:940-9.

Ellerbroek SM, Fishman DA, Kearns AS, Bafetti LM, Stack MS (1999) Ovarian carcinoma regulation of matrix metalloproteinase-2 and membrane type 1 matrix metalloproteinase through beta1 integrin. **Cancer Res** 59:1635-41.

Ellerbroek SM, Wu YI, Overall CM, Stack MS (2001) Functional interplay between type I collagen and cell surface matrix metalloproteinase activity. **J Biol Chem** 276:24833-42.

Emonard H, Hornebeck W (1997) Binding of 92kDa and 72kDa progelatinases to insoluble elastin modulates to insoluble elastin modulates their proteolytic activation. **J Biol Chem** 378:265-71.

English WR, Puente XS, Freije JM, Knäuper V, Amour A, Merryweather A, López-Otin C, Murphy G (2000) Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-α convertase activity but does not activate pro-MMP-2. **J Biol Chem** 275:14046-55.

Engsig MT, Chen QJ, Vu TH, Pedersen AC, Therkildsen B, Lund LR, Henriksen K, Lenhard T, Foges NT, Werb Z, Delaissé JM (2000) Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. **J Cell Biol** 151:879-89.

Everts V, Hoeben K, Beerstsen W (1993) The release of tissue inhibitor of metalloproteinases by calvarial bone explants and its immunolocalization. **Bone Miner** 22:43-55.

Everts V, Delaissé JM, Korper W, Jansen DC, Tigehelaar-Gutter W, Saftig P, Beertsen W (2002) The bone lining cells: its role in cleaning Howship´s lacunae and initiating bone formation. **J Bone Miner Res** 17:77-90.

Fanchon S, Bourd K, Septier D, Everts V, Beertsen W, Menashi S, Goldberg M (2004) Involvement of matrix metalloproteinases in the onset of dentin mineralization. **Eur J Oral Sci** 112:171-6.

Fang KC, Raymond WW, Blount JL, Caughey GH (1997) Dog mast cell alpha-chymase activates progelatinase B by cleaving the Phe88-Gln89 and Phe91-Glu92 bonds of the catalytic domain. **J Biol Chem** 272:25628-35.

Fata JE, Werb Z, Bissell MJ (2004) Regulation of mammary gland brnching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes. **Breast Cancer Res** 6:1-11.

Ferreras M, Felbor U, Lenhard T, Olsen BR, Delaissé JM (2000) Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. **FEBS Lett** 486:247-51.

Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Lascau-Coman V, Moldovan F, Jovanovic D, Raynauld JP, Pelletier JP (1998) Collagenase-1 and collagenase-3 synthesis in normal and early experimental osteoarthritic canine cartilage: na immunohistochemical study. **J Rheumatol** 25:1585-94.

Fernandez-Catalan C, Bode W, Huber R, Turk D, Calvete JJ, Lichte A, Tschesche H, Maskos K (1998) Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinase-2, the soluble progelatinase A receptor. **EMBO J** 17:5238-48.

Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST (1999) Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. **Circ Res** 85:906-11.

Fessler LI, Duncan KG, Fessler JH, Salo T, Tryggvason K (1984) Characterization of the procollagen IV cleavage products produced by a specific tumor collagenase. **J Biol Chem** 259:9783-9.

Filanti C, Dickson GR, Di Martino D, Ulivi V, Sanguineti C, Romano P, Palermo C, Manduca P (2000) The expression of metalloproteinase-2, -9, and -14 and of tissue inhibitors-1 and -2 is developmentally modulated during osteogenesis in vitro, the mature osteoblastic phenotype expresing metalloproteinase-14. **J Bone Miner Res** 15:2154-68.

Fini ME, Cook JR, Mohan R, Brinckerhoff CE (1998) Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. In Matrix Metalloproteinases, ed. WC Parks, RP Mecham. pp. 299–356. New York: Academic.

Fiore E, Fusco C, Romero P, Stamenkovic I (2002) Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatina B) proteolytically cleaves ICAM-1 and participles in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity. **Oncogene** 21:5213-5223.

Firestein GS, Paine MM, Littman BH (1991) Gene expression (collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases, complement and HLA-DR) in rheumatoid arthritis and ostheoarthritis synovium. **Arthritis Rheum** 34:1094-1105.

Flenniken AM, Williams BR (1990) Developmental expression of the endogenous TIMP gene and a TIMP-lacZ fusion gene in transgenic mice. **Genes Dev** 4:1094-106.

Fosang AJ, Neame PJ, Last K, Hardingham TE, Murphy G, Hamilton JA (1992) The interglobular domain of cartilage aggrecan is cleaved by PUMP, gelatinases, and cathepsin B. **J Biol Chem** 267:19470-4.

Fowlkes JL, Enghild JJ, Suzuki K, Nagase H (1994) Matrix metalloproteinases degrades insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. **J Biol Chem** 269:25742-6.

Frank RM, Nalbandian J (1967) Ultrastructure of amelogenesis. In: Miles AEW (ed), Structural and Chemical Organization of Teeth. New York, Academic, 399-466.

Freemont AJ, Hampson V, Tilman R, Goupile P, Taiwo Y, Hoyland JA (1997) Gene expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific. **Ann Rheum Dis** 56:542-9.

Fridman R, Toth M, Pena D, Mobashery S (1995) Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). **Cancer Res** 55:2548-55.

Frommer J, Margolies MR (1971) Contribution of Meckel's cartilage to ossification of the mandible in mice. **J Dent Res** 50:1260-7.

Fukae M, Tanabe T, Murakami C, Dohi N, Uchida T, Shimizu M (1996) Primary structure of the porcine 89-kDa enamelin. **Adv Dent Res** 10:111-8.

Fukae M, Tanabe T, Uchida T, Lee SK, Ryu OH, Murakami C, Wakida K, Simmer JP, Yamada Y, Bartlett JD (1998) Enamelysin matrix metalloproteinase-20: localisation in the developing tooth and effects of pH and calcium on amelogenin hydrolysis. **J Dent Res** 77:1580-8.

Fuller K, Chambers TJ (1995) Localization of mRNA for collagenase in osteocytic, bone surface and chondrocytic cells but not osteoclasts. **J Cell Sci** 108:2221-30.

Gack S, Vallon R, Schmidt J, Grigoriadis A, Tuckermann J, Schenkel J, Weiher H, Wagner EF, Angel P (1995) Expression of interstitial collagenase during skeletal development of the mouse is restricted to osteoblast-like cells and hypertrophic chondrocytes. **Cell Growth Differ** 6:759-67.

Galvez BG, Matias-Roman S, Yanez-Mo M, Sanchez-Madrid F, Arroyo AG (2002) ECM regulates MT1-MMP localization with β1 or αVβ3 integrins at distinct cell compartments modulation its internalization and activity on human endothelial cells. **J Cell Biol** 159:509-21.

Gasson JC, Golde DW, Kaufman SE, Westbrook CA, Hewick RM, Kaufman RJ, Wong GG, Temple PA, Leary AC, Brown EL, Orr EC, Clark SC (1985) Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potenting activity. **Nature** 315:768-71.

Gatsios P, Haubeck HD, Van de Leur E, Frisch W, Apte SS, reiling H, Heinrich PC, Graeve LM (1996) Oncostatin M differentially regulates tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-3 gene expression in human synovial lining cells. **Eur J Cell Biol** 241:56-63.

Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL, Leber TM, Mangan M, Miller K, Nayee P, Owen K, Patel S, Thomas W, Wells G, Wood LM, Woolley K (1994) Processing of tumor necrosis factor-α precursor by metalloproteinases. **Nature** 370:555-7.

Gepstein A, Shapiro S, Arbel G, Lahat N, Livne E (2002) Expression of matrix metalloproteinases in articular cartilage of temporomandibular and knee joints of mice during growth, maturation, and aging. **Arthritis Rheum** 46:3240-50.

Gepstein A, Arbel G, Blumenfeld I, Peled M, Livne E (2003) Association of metalloproteinases, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, and proteoglycans with, development, aging, and osteoarthritis processes in mouse temporomandibular joint. **Histochem Cell Biol** 120:23-32.

Gerlach RF, Line SRP (2005) Ameloblastos. In: Carvalho FSF e Collares-Buzato CB: Células - Uma abordagem multidisciplinar. Ed. Manole, pp. 95-106.

Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V (1997) Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. **Science** 277:225-8.

Goldberg GI, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Wilhelm S, He CS (1989) Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteinases designated TIMP-2. **Proc Nat Acad Sci USA** 86:8207-11.

Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich T, Marmer BL (1992) 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. **J Biol Chem** 267:4583-91.

Goldberg M, Septier D, Bourd K, Hall R, Jeanny JC, Jonet L, Colin S, Tager F, Chaussain-Miller C, Garabedian M, George A, Goldberg H, Menashi S (2002) The dentino-enamel junction revisited. **Connect Tissue Res** 43:482-9.

Goldberg M, Septier D, Bourd K, Hall R, George A, Goldberg H, Menashi S (2003) Immunohistochemical localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in the forming rat incisor. **Connect Tissue Res** 44:143-53.

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. **Eur J Cell Biol** 74:111-22.

Gomis-Rüth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H, Bode W (1997) Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. **Nature** 389:77–81.

Grassmann W, Dyckerhoff H (1928) Über die Proteinase und die Polypeptidase der Hefe. 13. Abhandlung über Pflanzenproteasen in der von R. Wilstätter und Mitarbeiten begonnenen Untersuchungsreihe. Hoppe-Seyler's Z. **Physiol Chem** 179:41-78.

Gravallese EM, Darling JM, Ladd AL, Katz JN, Glimcher LH (1991) In situ hybridization studies of stromelysin and collagenase messenger RNA expression in reumathoid synovium. **Arthritis Rheum** 34:1076-84.

Green DD, Hembry RM, Atkinson SJ, Meikle MC (1990) Immunolocalization of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in mechanically deformed fibrous joints. **Am J Orthod Dentofacial Orthop** 97:281-88.

Gross J, Lapière CM (1962) Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proc Nat Acad Sci USA** 54:1197-1204.

Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Wolff L, Wang J, Fukushima P, Mansoor A, Stetler-Stevenson M (1998) In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. **J Clin Invest** 102:2002-10.

Gusmann H, Santana RB, Zehnder M (2002) Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. **Eur J Oral Sci** 110:353-7.

Haas TL, Davis SJ, Madri JA (1998) Three-dimensional type I collagen lattices induce coordinate expression of matrix metalloproteinases MT1-MMP and MMP-2 in microvascular endothelial cells. **J Biol Chem** 273:3604-10.

Hahn-Dantona EA, Aimes ET, Quigley JP (2000) The isolation, characterization, and molecular cloning of a 75-kDa gelatinase B-like enzyme, a member of the matrix metalloproteinase (MMP) family. **J Biol Chem** 275:40827-38.

Hahn-Dantona EA, Ruiz JF, Bornstein P, Strickland DK (2001) The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. **J Biol Chem** 276:15498-503.

Hayami T, Endo N, Tokunaga K, Yamagiwa H, Hatano H, Uchida M, Takahashi HE (2000) Spatiotemp;oral change of rat collagenase (MMP-13) mRNA expression in the development of the rat femoral neck. **J Bone Miner Metab** 18:185-93.

Hall BK (1991) Cellular interactions during cartilage and bone development. **J Craniofac Genet Dev Biol** 11:238-50.

Hall BK, Witten PE (2005) The origin and plasticity of skeletal tissues in vertebrate evolution and development. In: Anderson JS, Sues HD (eds). Major transitions in vertebrate evolution. Festschrift for Dr. Robert L. Caroll. Bloomington, IN: Indiana University Press.

Hall R, Septier D, Embery G, Goldberg M (1999) Stromelysin-1 (MMP-3) in forming enamel and predentine in rat incisor – coordinated distribution with proteoglycans suggests a functional role. **Histochem J** 31:761-70.

Hammani K, Blakis A, Morsette D, Bowcock AM, Schmutte C, Henriet P, DeClerck YA (1996) Structure and characterization of the human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene. **J Biol Chem** 271:25498-505.

Hanemaaijer R, Sorsa T, Kontinnen YT, Ding Y, Sutinen M, Visser H, van Hinsbergh VWM, Helaakoski T, Kainulainen T, Ronka H, Tschesche H, Salo T (1997) Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts ans endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor α and doxycicline. **J Biol Chem** 272:31504-9.

Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L (2007) The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. **Acta Odontol Scand** 65:1-13.

Hao L, Du M, Lopez-Campistrous A, Fernandez-Patron C (2004) Agonist-induced activation of matrix metalloproteinase-7 promotes vasoconstriction through the epidermal growth factor-receptor pathway. **Circ Res** 94:68-76.

Harada Y, Ishizeki K (1998) Evidence for transformation of chondrocytes and site-specific resorption during the degradation of Meckel's cartilage. **Anat Embryol (Berl)** 197:439-50.

Haro H, Crawford HC, Fingleton B, MacDougall JR, Shinomiya K, Spengler DM, Matrisian LM (2000) Matrix metalloproteinase-3-dependent generation of a macrophage chemoattractant in a model of herniated disc resorption. **J Clin Invest** 105:133-41.

Harper E, Bloch KJ, Gross J (1971) The zymogen of tadpole collagenase. **Biochemistry** 10:3035–41.

Hasty KA, Pourmotabbed TF, Goldberg GI, Thompson JP, Spinella DG, Stevens RM, Mainard CL (1990) Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. **J Biol Chem** 265:11421-4.

Hathaway HJ, Shurr BD (1996) Mammary gland morphogenesis is inhibited in transgenic mice that overexpress cell surface beta 1,4-galactosyltransferase. **Development** 122:2859-72.

Hatori K, Sasano Y, Takasashi I, Kamakura S, Kagayama M, Sasaki K (2004) Osteoblasts and osteocytes express MMP2 and -8 and TIMP1, -2, and -3 along with extracellular matrix molecules during appositional bone formation. **Anat Rec (Part A)** 277:262-71.

Haeusler G, Walter I, Helmreich M, Egerbacher M (2005) Localization of matrix metalloproteinases (MMPs), their tissue inhibitors, and vascular endothelial growth factor (VEGF) in growth plates of

children and adolescents indicates a role for MMPs in human postnatal growth and skeletal maturation. **Calcif Tissue Int** 76:326-35.

Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K (1992) Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. **FEBS Lett** 298:29-32.

Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A (1994) Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). **J Cell Sci** 107:2373-9.

Heath JK, Atkinson SJ, Meikle MC, Reynolds JJ (1984a) Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to bone resorbing agents. **Biochim Biophys Acta** 802:151-4.

Heath JK, Meikle MC, Atkison SJ, Reinolds JJ (1984b) A factor synthesized by rabbit periosteal fibroblasts stimulates bone resorption and collagenase production by connective tissue cells in vitro. **Biochim Biophys Acta** 800:301-5.

Heikinheimo K, Salo T (1995) Expression of basement membrane type IV collagen and type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in human fetal teeth. **J Dent Res** 74:1226-1234.

Henkemeyer M, Rossi DJ, Holmyard DP, Puri MC, Mbanalu G, Harpal K, Shih TS, Jacks T, Pawson T (1995) Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking Ras GTPase-activating protein. **Nature** 377:695-701.

Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen RA, Rodgers WH (1996) Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. **Am J Pathol** 149:273-82.

Herman MP, Sukhova GK, Kisiel W, Foster D, Kehry MR, Libby P, Schonbeck U (2001) Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. **J Clin Invest** 107:1117–26.

Hernandez-Barrantes S, Toth M, Bernardo MM, Yurkova M, Gervasi DC, Raz Y, Sang QXA, Fridman R (2000) Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. **J Biol Chem** 275:12080-9.

Hernandez-Barrantes S, Shimura Y, Soloway PD, Sang QA, Fridman R (2001) Differential roles TIMP-4 and TIMP-2 in pro MMP-2 activation by MT1-MMP. **Biochem Biophys Res Comum** 281:126-30.

Hill PA, Murphy G, Docherty AJP, Hembry RM, Millica TA, Reynolds JJ, Meikle MC (1994) The effects of selective inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP-1 in isolated osteoclasts. **J Cell Sci** 107:3055:64.

Himelstein BP, Conte-Soler R, Bernhard EJ, Dilks DW, Muschel RJ (1994) Metalloproteinases in tumor progression: the contribution of MMP-9. **Inv Metast** 14:246-58.

Holliday IS, Welgus HG, Fliszar CJ, Veith GM, Jefrey JJ, Gluck SL (1997) Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase. **J Biol Chem** 272:22053-8.

Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, Mankani M, Robey PG, Poole AR, Pidoux I, Ward JM, Birkedal-Hansen H (1999) MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. **Cell** 99:81-92.

Holmbeck K, Biano P, Chrysovergis K, Birkedal-Hansen H (2003) MT1-MMP-dependent, apoptotic remodeling of unmineralized cartilage: a critical process in skeletal growth. **J Cell Biol** 163:661-71.

Holmbeck K, Biano P, Pidoux I, Inoue S, Billinghurst RC, Wu W, Chrysovergis K, Yamada S, Birkedal-Hansen H, Poole AR (2005) The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. **J Cell Sci** 118:147-56.

Horton WA (1993) In vitro chondrogenesis in human chondrodysplasias. **Am J Med Genet** 45:179-82.

Hou P, Troen T, Overejo MC, Kirkegaard T, Andersen TL, Byrjalsen I, Ferreras M, Sato T, Shapiro SD, Foged NT, Delaissé JM (2004) Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) in osteoclasts: new lesson on the involvement of MMPs in bone resorption. **Bone** 34:37-47.

Huang W, Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M (2002) Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) gene expression is increased in human osteoarthritic femoral head cartilage. **J Cell Biochem** 85:295-303.

Huebner JL, Otterness IG, Freund EM, Caterson B, Kraus VB (1998) Collagenase 1 and collagenase 3 expression in a guinea pig model of osteoarthritis. **Arthritis Rheum** 42:590.

Iamaroon A, Wallon UM, Overall CM, Diewert VM (1996) Expression of 72-kDa gelatinase (matrix metalloproteinase-2) in the developing mouse craniofacial complex. **Arch Oral Biol** 41:1109-19.

Ichiyasu H, McCormack JM, McCarthy KM, Dowbkowski D, Preffer FI, Schneeberger EE (2004) Matrix metalloproteinase-9-deficient dendritic cells have impaired migration through tracheal epithelial tight junctions. **Am J Respir Cell Mol Biol** 30:761-70.

Imai K, Yokohama Y, Nakanishi I, Ohuchi E, Fujii Y, Nakai N, Okada Y (1995) Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. **J Biol Chem** 270:6691-7.

Imai H, Osumi-Yamashita N, Ninomiya Y, Eto K (1996) Contibution of early-emigrating midbrain crest cells to the dental mesenchyme of mandibular molar teeth in rat embryos. **Dev Biol** 176:151-65.

Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Pierschbacher MD, Okada Y (1997) Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta 1 release. **Biochem J** 322:809-14.

Inada M, Wang Y, Byrne MH, Rahman MU, Miyaura C, López-Otin C, Krane SM (2004) Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. **Proc Nat Acad Sci USA** 101:17192-7.

Irie K, Tsuruga E, Sakakura Y, Muto T, Yajima T (2001) Immunohistochemical localization of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in osteoclasts in vivo. **Tissue Cell** 33:478-82.

Ishizeki K, Kuroda N, Nagano H, Nawa T (1992) Morphological modifications during long-term survival of Meckel's cartilage hypertrophic chondrocytes transplanted in the mouse spleen. **Arch Histol Cytol** 55:261-72.

Ishizeki K, Nagano H, Fujiwara N, Nawa T (1994) Morphological changes during survival, cellular transformation, and calcification of the embryonic mouse: Meckel's cartilage transplanted into heterotopic sites. **J Craniofac Genet Dev Biol** 14:33-42.

Ishizeki K, Takigawa M, Nawa T, Suzuki F (1996a) Mouse Meckel's cartilage chondrocytes evoke bone-like matrix and further transform into osteocyte-like cells in culture. **Anat Rec** 245:25-35.

Ishizeki K, Chida T, Yamamoto H, Nawa T (1996b) Light and electron microscopy of stage-specific features of the transdifferentiation of mouse Meckel's cartilage chondrocytes in vitro. **Acta Anat (Basel)** 157:1-10.

Ishizeki K, Takigawa M, Harada Y, Suzuki F, Nawa T (1996c) Meckel's cartilage chondrocytes in organ cultures synthesize bone-type proteins accompanying osteocytic phenotype expression. **Anat Embryol (Berl)** 193:61-71.

Ishizeki K, Hiraki Y, Kubo M, Nawa T (1997) Sequential synthesis of cartilage and bone marker proteins during transdifferentiation of mouse Meckel's cartilage chondrocytes in vitro. **Int J Dev Biol** 41:83-9.

Ishizeki K, Nomura S, Takigawa M, Shioji H, Nawa T (1998a) Expression of osteopontin in Meckel's cartilage cells during phenotypic transdifferentiation in vitro, as detected by in situ hybridization and immunocytochemical analysis. **Histochem Cell Biol** 110:457-66.

Ishizeki K, Kubo M, Yamamoto H, Nawa T (1998b) Immunocytochemical expression of type I and type II collagens by rat Meckel's chondrocytes in culture during phenotypic transformation. **Arch Oral Biol** 43:117-26.

Ishizeki K, Saito H, Shinagawa T, Fujiwara N, Nawa T (1999) Histochemical and immunohistochemical analysis of the mechanism of calcification of Meckel's cartilage during mandible development in rodents. **J Anat** 194:265-77.

Ishizeki K, Nawa T (2000) Further evidence for secretion of matrix metalloproteinase-1 by Meckel's chondrocytes during degradation of the extracellular matrix. **Tissue Cell** 32:207-15.

Ito A, Itoh Y, Sasaguri Y, Morimatsu M, Mori Y (1992) Effects of interleukin-6 on the metabolism of connective tissue components in rheumatoid synovial fibroblasts. **Arthritis Rheum** 35:1197-1201.

Ito A, Nose T, Takahashi S, Mori Y (1995) Cycloxygenase inhibitors augment the production of pro-matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B) in rabbit articular chondrocytes. **FEBS Lett** 360:75-9.

Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thorgesen IB, Enghd JJ, Sasguri Y, Mori Y (1996) Degradation of IL1β by MMP. **J Biol Chem** 271:14657-60.

Itoh T, Matsuda H, Tanioka M, Kuwabara K, Itohara S, Suzuki R (2002) The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. **J Immunol** 169:2643-7.

Itoh Y, Binner S, Nagase H (1995) Steps involved in activation of the complex of pro-matrix metalloproteinase 2 (progelatinase A) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 by 4-aminophenylmercuric acetato. **Biochem J** 308:645-51.

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

Iwasaki M, Le AX, Helms JA (1997) Expression of indian hedgehog, bone morphogenetic protein 6 and gli during skeletal morphogenesis. **Mech Dev** 69:197-202.

Jernvall J, Kettunen P, Karavanova I, Martin LB, Thesleff I (1994) Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells Express growth stimulating Fgf-4 gene. **Int J Dev Biol** 38:463-9.

Jernvall J, Aberg T, Kettunen P, Keranen S, Thesleff I (1998) The life history of na embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. **Development** 125:161-9.

Jessen H, Moe H (1972) The fine structure of macrophages in the enamel organ, with special reference to the microtubular system. **Z Zellforsch Mikrosk Anat** 126:466-82.

Jiang A, Lehti K, Wang X, Weiss SJ, Keski-Oja J, Pei D (2001) Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis. **Proc Nat Acad Sci USA** 98:13693-98.

Johnson JL, George SJ, Newby AC, Jackson CL (2005) Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries. **Proc Nat Acad Sci USA** 102:15575-80.

Joronen K, Salminen H, Glumoff V, Savontaus M, Vuorio E (2000) Temporospatial expression of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases-1, -2, and -3 during development, growth and aging of the mouse skeleton. **Histochem Cell Biol** 114:157-65.

Josephsen K and Fejerskov O (1977) Ameloblast modulation in the maturation zone of the rat incisor enamel organ. A light and electron microscopic study. **J Anat** 124:45-70.

Jung KK, Liu XW, Chirco R, Fridman R, Kim HR (2006) Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. **EMBO J** 25:3934-42.

Kahari VM, Saarialho-Kere U (1999) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor growth and invasion. **Ann Med** 31:34-45.

Kallenbach E (1970) Fine structure of rat incisor enamel organ during late pigmentation and regression stages. **J Ultrastruct Res** 30:38-63.

Kallenbach E (1978) Fine structure of the stratum intermedium, stellate reticulum, and outer enamel epithelium in the enamel organ of the kitten. **J Anat** 126:247-60.

Kanyama M, Kuboki T, Kojima S, Fujisawa T, Hatorri T, Takigawa M, Yamashita A (2000) Matrix metalloproteinases ans tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids of patients with temporomandibular joint osteoarthritis. **J Orofac Pain** 14:20-30.

Karsdal MA, Fjording MS, Foged NT, Delaissé JM, Lochter A (2001) Transforming growth factor-beta-induced osteoblast elongation regulates osteoclastic bone resorption through a p38 mitogen-activated protein kinase- and matrix metalloproteinase-dependent pathway. **J Biol Chem** 279:39350-8.

Karsdal MA, Larsen L, Engsig MT, Lou H, Ferreras M, Lochter A, Delaissé JM, Foged NT (2002) MMP dependent activation of latent TGF-β controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. **J Biol Chem** 277:44061-8.

Karsdal MA, Andersen TA, Bonewald L, Christiansen C (2004) Matrix metalloproteinases (MMPs) nsafeguard osteoblasts from apoptosis during transdifferentiation into osteocytes: MT1-MMP maintains osteocyte vialbility. **DNA Cell Biol** 23:155-65.

Kawashima-Ohya Y, Satakeda H, Kuruta Y, Kawamoto T, Yan W, Akagawa Y, Hayakawa T, Noshiro M, Okada Y, Kakamura S, Kato Y (1998) Effects of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide on expressions of matrix metalloproteinase-2, -3, and -9 in growth plate chondrocytes cultures. **Endocrinology** 139:2120-7.

Kennedy AM, Inada M, Krane SM, Christie PT, Harding B, Lopez-Otin C, Sanchez LM, Pannett AA, Dearlove A, Hartley C, Byrne MH, Reed AA, Nesbit MA, Whyte MP, Thakker RV (2005) MMP13 mutation causes spondyloepimetaphyseal dysplasia, Missouri type (SEMD) (MO). **J Clin Invest** 115:2832-42.

Kerkela E, Bohling T, Herva R, Uria JA, Saarialho-Kere U (2001) Human macrophage metalloelastase (MMP-12) expression is induced in chondrocytes during fetal development and malignant transformation. **Bone** 29:487-93.

Kettunen P, Thesleff I (1998) Expression and function of FGFs -4, -8, and -9 suggest functional redundancy and repetitive use as epithelial signals during tooth morphogenesis. **Dev Dyn** 211:256-68.

Kevorkian L, Young DA, Darrah C, Donell ST, Shepstone L, Porter S, Brockbank SMV, Edwards DR, Parker AE, Clark IM (2004) Expression profilling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. **Arthritis Rheum** 50:131-41.

Keyszer G, Lambiri I, Keysser M, Keysser C, Nagel R, Burmester GR, Jung K (1998) Matrix metalloproteinases, but not cathepsins B, H, and L or their inhibitors in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis are potentially useful markers of disease activity. **Z Rheumatol** 57:392-8.

Kheradmand F, Werner E, Tremble P, Symons M, Werb Z (1998) Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. **Science** 280:898-902.

Kinoh H, Sato H, Tsunezuka Y, Takino T, Kawashima A, Okada Y, Seiki M (1996) MT-MMP, the cell surface activator of proMMP-2 (pro-gelatinase A), is expressed with its substrate in mouse tissue during embryogenesis. **J Cell Sci** 109:953-9.

Kinoshita T, Sato H, Takino T, Itoh M, Akizawa T, Seiki M (1996) Processing of a precursor of 72-kilodalton type IV collagenase/gelatinase A by a recombinant membrane-type 1 matrix metalloproteinase. **Cancer Res** 56:2535-8.

Kinoshita T, Sato H, Okada A, Ohuchi E, Imai K, Okada Y, Seiki M (1998) TIMP-2 promotes activation of procollagenase A by membrane-type 1 matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads. **J Biol Chem** 273:16098-103.

Kiviranta R, Morko J, Alatalo SL, NicAmhlaoibh R, Risteli J, Laitala-Leinonen T, Vuorio E (2005) Impaired bone resorption in cathepsin K-deficient mice is partially compensated for enhanced osteoclastogenesis and increased expression of other proteases via an increased RANKL/OPG ratio. **Bone** 36:159-72.

Kleiner DE Jr, Unsworth EJ, Krutzsch HC, Stetler-Stevenson WG (1992) Higher-order complex formation between the 72-kilodalton type IV collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases-2. **Biochemistry** 31:1665-72.

Knäuper V, Wilhelm SM, Seperack PK, DeClerck YA, Langley KE, Osthues A, Tschesche H (1993) Direct activation of human neutrophil procollagenase by recombinant stromelysin. **Biochem J** 295:581-6.

Knäuper V, Will H, López-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, Hembry RM, Murphy G (1996a) Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. **J Biol Chem** 271:17124-31.

Knäuper V, Murphy G, Tschesche H (1996b) Activation of human neutrophil procollagenase by stromelysin 2. **Eur J Biochem** 235:187-91.

Knäuper V, Smith B, López-Otin C, Murphy G (1997) Activation of progelatinase B (proMMP-9) by active collagenase-3 (MMP-13). **Eur J Biochem** 248:369-73.

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

Kolkenbrock H, Orgel D, Hecker-Kia A, Noak W, Ulbrich N (1991) The complex between a tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2) and 72-kDa progelatinase is a metalloproteinase inhibitor. **Eur J Biochem** 198:775-81.

Kollar EJ, Mina M (1991) Role of the early epithelium in the patterning of the teeth and Meckel's cartilage. **J Craniofac Genet Dev Biol** 11:223-8.

Kondapaka SB, Fridman R, Reddy KB (1997) Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells. **Int J Cancer** 70:722-6.

Kostoulas G, Lang A, Nagase H, Baici A (1999) Stimulation of angiogenesis through cathepsin B inactivation of the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. **FEBS Lett** 455:286-290.

Kouwenhoven M, Ozenci V, Tjernlund A, Pashenkov M, Homman M, Press R, Link H (2002) Monocyte-derived cells express and secrete matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitors and are imbalanced in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol** 126(1-2):161-71.

Krekoski CA, Neubauer D, Graham JB, Muir D (2002) Metalloproteinase-dependent predegeneration in vitro enhances axonal regeneration within acellular peripheral nerve grafts. **J Neurosci** 22:10408-15.

Kubota E, Imamura H, Kubota T, Shibata T, Murakami K (1997) Interleukin 1 beta and stromelysin (MMP3) activity of synovial fluid as possible markers of osteoarthritis in the temporomandibular joint. **J Oral Maxillofac Surg** 55:20-7.

Kubota T, Kubota E, Matsumoto A, Kawai Y, Saito H, Mikuni-Takagaki Y, Sato S (1998) Identification of matrix metalloproteinases (MMPs) in synovial fluid from patients with temporomandibular disorder. **Eur J Oral Sci** 106:992-8.

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

Kumta SM, Huang L, Cheng YY, Chow LTC, Lee KM, Zheng MH (2003) Expression of VEGF and MMP-9 in giant cell tumor of bone and other osteolytic lesions. **Life Sci** 73:1427-36.

Kwan JA, Schulze CJ, Wang W, Leon H, Sariahmetoglu M, Sung M, Sawicka J, Sims DE, Sawicki G, Schulz R (2004) Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. **FASEB J** 18:690-2.

Langille RM (1994) In vitro analysis of the spatial organization of chondrogenic regions of avian mandibular mesenchyme. **Dev Dyn** 201:55-62.

Laskowski M Jr, Kato I (1980) Protein inhibitors of proteinases. **Annu Rev Biochem** 49:593-626.

Lee AY, Akers KT, Collier M, Li L, Eisen AZ, Seltzer JL (1997) Intracellular activation of gelatinase A (72-kDa type IV collagenase) by normal fibroblasts. **Proc Nat Acad Sci USA** 94:44424-9.

Lefebvre V, Peeters-Joris C, Vaes G (1991) Production of gelatin-degrading matrix metalloproteinases (type IV collagenases) and inhibitors by artivular chondrocytes during their dedifferentiation by serial subcultures and under stimulation by interleukin-1 and tumornecrosis factor alpha. **Biochim Biophys Acta** 1094:8-18.

Lemaître V, D'Armiento J (2006) Matrix metalloproteinases in development and disease. **Birth Defects Res (Part C)** 78:1-10.

Levi E, Fridman R, Miao HQ, Ma YS, Yayon A, Vlodavsky I (1996) Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. **Proc Nat Acad Sci USA** 93:7069-74.

Li J, Zhang YP, Kirsner RS (2003) Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. **Microsc Res Tech** 60:107-14.

Li WQ, Zafarullah M (1998) Oncostatin M up-regulates tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene expression in articular chondrocytes via de novo transcription, protein synthesis, and tyrosine kinase- and mitogen-activated protein kinase-dependent mechanisms. **J Immunol** 161:5000-7.

Lightner VA, Erickson HP (1990) Binding of hexabrachion (tenascin) to the extracellular matrix and substratum and its effect on cell adhesion. **J Cell Sci** 95:263-77.

Limb GA, Matter K, Murphy G, Cambrey AD, Bishop PN, Morris GE, Kwan PT (2005) Matrix metalloproteinase-1 associates with intracellular organelles and confers resistance to laminin A/C degradation during apoptosis. **Am J Physiol** 166:1555-63.

Lin HC, Chang JH, Jain S, Gabison EE, Kure T, Kato T, Fukai N, Azar DT (2001) Matrilysin cleavage of corneal collagen type XVIII NC1 domain and generation of a 28-kDa fragment. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 42:2517-24.

Lindy O, Konttinen YT, Sorsa T, Ding Y, Santavirta S, Ceponis A, Lopez-Otin C (1997) Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) in human rheumatoid synovium. **Arthritis Rheum** 40:1391-9.

Linsuwanont B, Takagi Y, Ohya K, Shimokawa H (2002) Expression of matrix metalloproteinase-9 mRNA and protein during deciduos tooth resorption in bovine odontoclasts. **Bone** 31:472-8.

Liu YE, Wang M, Greene J, Su J, Ullrich S, Li H, Sheng S, Alexander P, Sang QA, Shi YE (1997) Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP-4). **J Biol Chem** 272:20479-83.

Llano E, Pendas AM, Freije JP, Nakano A, Knauper V, Murphy G, López-Otin C (1999) Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. **Cancer Res** 59:2570-6.

Lohi J, Wilson CL, Roby JD, Parks WC (2001) Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. **J Biol Chem** 276:10134-44.

Lohler J, Timpl R, Jaenisch R (1984) Embryonic lethal mutation in mouse collagen I gene causes rupture of blood vessels and is associated with erythropoietic and mesenchymal cell death. **Cell** 38:597-607.

Lohmander LS, Hoerrner LA, Dahlberg L, Roos H, Bjornsson S, Lark MW (1993) Stromelysin, tissue inhibitor of metalloproteinases and proteoglycan fragments in human knee joint fluid after injury. **J Rheumatol** 20:1362-8.

Lorenzo JA, Pilbeam CC, Kalinowski JF, Hibbs MS (1992) Production of both 92- and 72-kDa gelatinases by bone cells. **Matrix** 12:282-90.

Lotz M, Guerne PA (1991) Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). **J Biol Chem** 266:2017-2020.

Low MG (1989) The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. **Biochim Biophys Acta** 988:427-54.

Luo D, Mari B, Stoll I, Anglard P (2002) Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysins 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase. **J Biol Chem** 277:25527-36.

Luo XH, Liao EY, Liao HJ, Jin Y, Zhou HD, Huang G (2003) Recombinant matrix metalloproteinase-14 catalytic domain induces apoptosis in human osteoblastic SaOS-2 cells. **J Endocrinol Invest** 26:1111-6.

Luttun A, Lutgens E, Manderveld A, Maris K, Collen D, Carmeliet P, Moons L (2004) Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth. **Circulation** 109:1408-14.

Lyer V, Pumiglia K, DiPersio CM (2005) Alpha3beta1 integrin regulates MMP-9 mRNA stability in immortalized keratinocytes: a novel mechanisms of integrin-mediated MMP gene expression. **J Cell Sci** 118:1185-95.

Lynch CC, Hikosaka A, Acuff HB, Martin MD, Kawai N, Singh RK, Vargo-Gogola TC, Begtrup JL, Peterson TE, Fingleton B, Shirai T, Matrisian LM, Futakuchi M (2005) MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. **Cancer Cell** 7:485-96.

MacNeil RL, Thomas HF (1993) Development of the murine periodontium II. Role of the epithelial root sheath in formation of the periodontal attachment. **J Periodontol** 64:285-91.

Maeda S, Sawai T, Uzuki M, Takahashi Y, Omoto H, Seki M, Sakurai M (1995) Determination of interstitial collagenase (MMP1) in patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis** 54:970-5.

Mancilla EE, De Luca F, Uyeda JA, Czerwiec FS, Baron J (1998) Effects of fibroblast growth factor-2 on longitudinal bone growth. **Endocrinology** 139:2900-4.

Maquoi E, Frankenne F, Baramova E, Munaut C, Sounni NE, Remacle A, Noel A, Murphy G, Foidart JM (2000) Membrane Type 1 matrix metalloproteinase-associated degradation of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in human tumor cell lines. **J Biol Chem** 275:11368-78.

Marchenko GN, Strongin AY (2001) MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors. **Gene** 265:87-93.

Martel-Pelletier J, Zafarullah M, Kodama S, Pelletier JP (1991) In vitro effects of interleukin on the synthesis of metalloproteases, TIMP, plasminogen activators ans inhibitors in human artivular cartilage. **J Rheumatol Suppl** 27:80-4.

Martignetti JA, Aqeel AA, Sewairi WA, Boumah CE, Kambouris M, Mayouf SA, Sheth KV, Eid WA, Dowling O, Harris J, Glucksman MJ, Bahabri S, Meyer BF, Desnick RJ (2001) Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthrits syndrome. **Nat Genet** 28:261-5.

Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM (2000) The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. **Arch Oral Biol** 45:757-65.

Martínez A, Oh HR, Unsworth EJ, Bregonzio C, Saavedra JM, Stetler-Stevenson WG, Cuttitta F (2004) Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. **Biochem J** 383:413-8.

Maruya Y, Sasano Y, Takahashi I, Kagayama M, Mayanagi H (2003) Expression of extracellular matrix molecules, MMPs and TIMPs in alveolar bone, cementum and periodontal ligaments during rat tooth eruption. **J Electron Microsc** 52:593-604.

Matsumoto S, Katoh M, Saito S, Watanabe T, Masuho Y (1997) Identification of soluble type of membrane-type matrix metalloproteinase-3 formed by alternatively spliced mRNA. **Biochim Biophys Acta** 1354:159-70.

Mattot V, Raes MB, Henriet P, Eeckhout Y, Stehelin D, Vandenbunder B, Desbiens X (1995) Expression of interstitial collagenase is restricted to skeletal tissue during mouse embryogenesis. **J Cell Sci** 108:529-35.

Mazzone M, Baldassarre M, Beznoussenko G, Giacchetti G, Cao J, Zucker S, Luini A, Buccione R (2004) Intracellular processing and activation of membrane type 1 matrix metalloprotease depends on its partitioning into lipid domains. **J Cell Sci** 117:6275-87.

McClelland P, Onuia JE, Miles RR, Tu Y, Haevey AK, Chandrasekhar S, Hock JM, Bidwell JP (1998) Intermittent administration of parathyroid hormone (1-34) stimulates matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in rat long bone. **J Cell Biochem** 70:391-401.

McQuibban GA, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clarck-Lewis I, Overall CM (2000) Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. **Science** 289:1202-6.

McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, Power C, Clarck-Lewis I, Overall CM (2001) Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. **J Biol Chem** 276:43503-8.

Mecham RP, Broekelmann TJ, Fliszar CJ, Shapiro SD, Welgus HG, Senior RM (1997) Elastin degradation by matrix metalloproteinases. Cleavage site specificity and mechanisms of elastolysis. **J Biol Chem** 272:18071-6.

Meikle MC, Sellers A, Reynolds JJ (1980) Effect of tensile mechanical stress on the synthesis of metalloproteinases by rabbit cranial sutures in vitro. **Calcif Tissue Int** 30:77-82.

Meikle MC, McGarrity AM, Thomson BM, Reynolds JJ (1991) Bone-derived growth factors modulate collagenase and TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) activity and type I collagen degradation by mouse calvarial osteoblasts. **Bone Miner** 12:41-55.

Meikle MC, Bord S, Hembry RM, Reynolds JJ (1995) The synthesis of collagenase, gelatinase-A (72 kDa) and –B (95 kDa), and TIMP-1 and -2 by human osteoblasts from normal and arthritic bone. **Bone** 17:255-60.

Mehraban F, Kuon SY, Riera H, Chang C, Moskowitz RW (1994) Prostromelysin and procollagenase genes are differentially up-regulated in chondrocytes fram knees of rabbits with experimental osteoarthritis. **Arthritis Rheum** 37:1189-97.

Mignatti P, Tsuboi R, Robbins E, Rifkin DB (1986) In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. **J Cell Biol** 108:671-82.

Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ, Geoghegan KF, Hambor JE (1996) **J Clin Invest** 97:761-8.

Miyamoto S, Yano K, Sugimoto S, Ishii G, Hasebe T, Endoh T, Kodama K, Goya M, Chiba T, Ochiai A (2004) Matrix-metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor biovailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 3. **Cancer Res** 64:665-71.

Miyazaki K, Hasegawa M, Funahashi K, Umeda M (1993) A metalloproteinase inhibitor domain in Alzheimer amyloid protein precursor. **Nature** 362:839-41.

Moe D, Birkedal-Hansen H (1979) Proteolytic activity in developing bovine enamel. **J Dent Res** 58:1012-13.

Mohtai M, Smith RL, Schuman DJ, Tsuji Y, Torti FM, Hutchinson NI, Stetler-Stevenson WG, Goldberg GI (1993) Expression of 92-kd type IV collagenase/gelatinase (gelatinase B) in osteoarthritic cartilage and is induction in normal human articular cartilage by interleukin 1. **J Clin Invest** 92:179-85.

Moldovan F, Pelletier JP, Hambor J, Cloutier JM, Martel-Pelletier J (1997) Collagenase-3 (matrix metalloproteinase 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitru mimicking effect by transforming growth factor beta. **Arthritis Rheum** 40:1653-61.

Moll UM, Youngleib G, Rosinski K, Quigley JP (1990) Tumor promoter-stimulated Mr 92,000 gelatinase secreted by normal and malignant human cells: isolation and characterization of the enzyme from HT1080 tumor cells. **Cancer Res** 50:6162-70.

Monteagudo C, Merino MJ, San-Juan J, Liotta LA, Stetler-Stevenson MS (1990) Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, benign, and malignant breast tissue. **Am J Pathol** 136:585-92.

Moses MA, Langer R (1991) A metalloproteinase inhibitor as an inhibitor of neovascularization. **J Cell Biochem** 47:230-5.

Moses MA, Sudhalter J, Langer R (1992) Isolation and characterization of an inhibitor of neovascularization from scapular chondrocytes. **J Cell Biol** 119:475-82.

Moses MA (1997) The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Stem Cells** 15:180-9.

Moses MA, Wiederschain D, Wu I, Fernandez CA, Ghazizadeh V, Lane WS, Flynn E, Sytkowski A, Tao T, Langer R (1999) Troponin I is present in human cartilage and inhibits angiogenesis. **Proc Nat Acad Sci USA** 16:2645-50.

Mott JD, Thomas CL, Rosenbach MT, Takahara K, Greenspan DS, and Banda MJ (2000) Post-translational proteolytic processing of procollagen C-terminal proteinase enhancer releases a metalloproteinase inhibitor. **J Biol Chem** 275, 1384–90.

Mudgett JS, Hutchinson NI, Chartrain NA, Forsyth AJ, McDonnell J, Singer II, Bayne EK, Flanagan J, Kawka D, Shen CF, Stevens K, Chen H, Trumbauer M, Visco DM (1998) Susceptibily of stromelysin 1- deficient mice to collagen induced arthritis and cartilage destruction. **Arthritis Rheum** 41:110-21.

Mundlos S, Olsen BR (1997) Heritable diseases of the skeleton. Part II: molecular insights into skeletal decelopment-matrix components and their homeostasis. **FASEB J** 11:227-33.

Murphy G, Houbrechts A, Cockett MI, Williamson RA, O'Shea M, Docherty AJP (1991) The N-terminal domain of 72kDa gelatinase a is not required for catalysis, but is essential for membrane activation and modulates interactions with tissue inhibitors of metalloproteinases. **Biochemistry** 30:8097-102.

Murphy G, Segain JP, O'Shea M, Cockett MI, Ioannou C, Lefebvre O, Chambon P, Basset P (1993) The 28-kDa N-terminal domain of mouse stromelysin-3 has the general properties of a weak metalloproteinase. **J Biol Chem** 268:15435-41.

Murphy G, Nguyen Q, Cockett MI, Atkinson SJ, Allan JA, Knight CG, Willenbrock F, Docherty AJ (1994) Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. **J Biol Chem** 269:6632-6.

Murphy G, Willenbrock F (1995) Tissue inhibitors of metalloproteinases. **Methods Enzymol** 248:496-510.

Muschler J, Levy D, Boudreau R, Henry M, Campbell K, Bissell MJ (2002) A role for dystroglycan in epithelial polarization: loss of function in breast tumor cells. **Cancer Res** 62:7102-9.

Nabeshima K, Inoue T, Shimao YT (2002) Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. **Pathol Int** 52:255-64.

Nagai H, Aoki M (2002) Inhibition of growth plate angiogenesis and endochondral ossification with diminished expression of MMP-13 in hypertrophic chondrocytes in FGF-2-treated rats. **J Bone Miner Res** 20:142-7.

Nagase H, Enghild JJ, Suzuki K, Salvesen G (1990) Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl)mercuric acetate. **Biochemistry** 29:5783-9.

Nagase H (1997) Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. **J Biol Chem** 378:151-60.

Nagase H, Woessner JF Jr (1999) Matrix metalloproteinases. **J Biol Chem** 274:2191-4.

Nagase H, Visse R, Murphy G (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res** 69:562-73.

Nanci A, Slavkin HC, Smith CE (1987) Application of high-resolution immunocytochemistry to the study of the secretory, resorptive, and degradative functions of ameloblasts. **Adv Dent Res** 1:148-61.

Nanci A, Smith CE (1992). Development and calcification of enamel. In: Bonucci E (eds), Calcification in Biological Systems. Boca Raton, Florida, CRC, 313-43.

Nemoto O, Yamada H, Mukaida M, Shimmei M (1996) Stimulation of TIMP-1 production by oncostatin M in human articular cartilage. **Arthritis Rheum** 39:560-66.

Netzer KO, Suzuki K, Itoh Y, Hudson BG, and Khalifah RG (1998) Comparative analysis of the noncollagenous NC1 domain of type IV collagen: identification of structural features important for assembly, function, and pathogenesis. **Protein Sci** 7:1340-51.

Neuhold LA, Killar L, Zhao W, Sung ML, Warner L, Kilik J, Tuner J, Wu W, Billinghurst C, Meijers T, Poole AR, Babij P, DeGennaro LJ (2001) Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. **J Clin Invest** 107:35-44.

Neurath H (1989) Proteolytic processing and physiological regulation. **Trends Biochem Sci** 14:268-71.

Nguyen Q, Mort JS, Roughley PJ (1992) Preferential mRNA expression of prostromelysin relative to procollagenase and in situ localization in human articular cartilage. **J Clin Invest** 89:1189-97.

Nguyen Q, Willenbrock F, Cockett MI, O'Shea M, Docherty AJP, Murphy G (1994) Different domain interactions are involved in the binding of tissue inhibitors of metalloproteinases to stromelysin-1 and gelatinase A. **Biochemistry** 33:2089-95.

Nishikawa S, Josephsen K (1987) Cyclic localization of actin and its relationship to junctional complexes in maturation ameloblasts of the rat incisor. **Anat Rec** 219:21-31.

Nishikawa S, Sasaki F (1996) Phagocytotic processing of apoptotic bodies of transitional ameloblasts by MHC class II-expressing macrophages in rat incisor. **J Histochem Cytochem** 44:1459-67.

Nishikawa S, Sasaki F (1999) Internalization of amelogenin by dendritic cells of the papillary layer during transition and early maturation stages. **Histochem Cell Biol** 112:301-5.

Nishikawa S, Sasaki F (2000) Detection of immature dendritic cells in the enamel organ of rat incisors by using anti-cystatin C and anti-MHC class II immunocytochemistry. **J Histochem Cytochem** 48:1243-55.

Nishikawa S (2005) Presence of anti-cystatin C-positive dendritic cells or macrophages and localization of cysteine preoteases in the apical bud of the enamel organ in the rat incisor. **J Histochem Cytochem** 53:643-51.

Nie D, Ishikawa Y, Yoshimori T, Wuthier RE, Wu LN (1998) Retinoic acid treatment elevates matrix metalloproteinase-2 protein and mRNA levels in avian growth plate chondrocyte. **J Cell Biochem** 68:90-9.

Noda M, Oh J, Takahashi R, Kondo S, Kitayama H, Takahashi C (2003) RECK: a novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. **Cancer Metast Rev** 22:167-75.

Noirey N, Staquet MJ, Gariazzo MJ, Serres M, Andre C, Schmitt D, Vincent C (2002) Relationship between expression of matrix metalloproteinases and migration of epidermal and in vitro generated Langerhans cells. **Eur J Cell Biol** 81:383-9.

Nuttall RK, Sampieri CL, Pennington CJ, Gill SE, Schultz GA, Edwards DR (2004) Expression analysis of the entire MMP and TIMP gene families during mouse tissue development. **FEBS Lett** 563:129-34.

Ochieng J, Fridman R, Nangia-Makker P, Kleiner DE, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG, Raz A (1994) Galactin-3 is a novel substrate for human matrix metalloproteinases-2 and -9. **Biochemistry** 33:14109-14.

O'Connell JP, Willenbrock F, Docherty AJP, Eaton D, Murphy G (1994) Analysis of the role of the COOH-terminal domain in the activation, proteolytic activity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interactions of gelatinase B. **J Biol Chem** 269:14967-73.

Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H (1992) Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. **J Biol Chem** 267:3581-4.

Ogata Y, Itoh Y, Nagase H (1995) Steps involved in activation of the pro-matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B)-tissue inhibitor of metalloproteinases-1 complex by 4-aminophenylmercuric acetate and proteinases. **J Biol Chem** 270:18506-11.

Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, Nishimura S, Imamura Y, Kitayama H, Alexander DB, Ide C, Horan TP, Arakawa T, Yoshida H, Nishikawa S, Itoh Y, Seiki

M, Itohara S, Takahashi C, Noda M (2001) The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. **Cell** 107:789-800.

Ohba Y, Goto Y, Kimura Y, Suzuki F, Hisa T, Takahashi K, Takigawa M (1995) Purification of an angiogenesis inhibitor from culture medium conditioned by a human chondrosarcoma-derived chondrocytic cell line, HCS-2/8. **Biochim Biophys Acta** 1245:1-8.

Okada Y, Nagase H, Harris ED Jr (1986) A multi-substrate metalloproteinase from rheumatoid synovial cells. **Trans Assoc Am Physicians** 99:143:53.

Okada Y, Watanabe S, Nakanishi I, Kishi J, Hayakawa T, Watorek W, Travis J, Nagase H (1988) Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases by neutrophil elastase and other serine proteinases. **FEBS Lett** 229:157-60.

Okada Y, Morodomi T, Enghild JJ, Suzuki K, Yasui A, Nakanishi I, Salvesen G, Nagase H (1990) Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid sinovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. **Eur J Biochem** 194:721-30.

Okada Y, Gonoji Y, Naka K, Tomita K, Nakanishi I, Iwata K, Yamashita K, Hayakawa T (1992a) Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. **J Biol Chem** 267:21712-9.

Okada Y, Shinmei M, Tanaka O, Naka K, Kimura A, Nakanishi I, Bayliss MT, Iwata K, Nagase H (1992b) Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium. **Lab Invest** 66:680:90.

Okaji M, Sakai H, Sakai E, Hashimoto F, Kobayashi Y, Yoshida N, Okamoto K, Yamamoto K, Kato Y (2003) The regulation of bone resorption in tooth formation and eruption processes in mouse alveolar crest devoid of cathepsin K. **J Pharmacol Sci** 91:285-94.

Okamura T, Shimokawa H, Takagi Y, Ono H, Sasaki S (1993) Detection of collagenase mRNA in odontoclasts of bovine root-resorbing tissue by in situ hybridization. **Calcif Tissue Int** 52:325-30.

Okumura Y, Sato H, Seiki M, Kido H (1997) Proteolytic activation of the precursor of membrane tupe 1 matrix metalloproteinase by human plasmin. A possible cell surface activator. **FEBS Lett** 402:181-4.

Olekyszyn J, Augustine AJ (1996) Plasminogen modulation of IL-1-stimulated degradation in bovine and human articular cartilage explants. The role of the endogenous inhibitors: PAI-1, alpha 2-antiplasmin, alpha 1-PI, alpha 2-macroglobulin and TIMP. **Inflamm Res** 45:464-72.

Olson MW, Gervasi DC, Mobashery S, Fridman R (1997) Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. **J Biol Chem** 272:29975-83.

Olson MW, Toth M, Gervasi DC, Sado Y,Ninomiya Y, Fridman R (1998) High affinity binding of latent matrix metalloproteinase-9 to the α2(IV) chain of collagen IV. **J Biol Chem** 273:10672–81.

Onodera S, Nishihira J, Iwabuchi K, Koyama Y, Yoshida K, Tanaka S, Minami A (2002) Macrophage migration inhibitory factor up-regulates matrix metalloproteinase-9 and -13 in rat osteoblasts. **J Biol Chem** 277:7865-74.

Ortega N, Behonick DJ, Colnot C, Cooper DN, Werb Z (2005) Galectin-3 is a downstream regulator of matrix metalloproteinase-9 function during endochondral bone formation. **Mol Biol Ce**ll 16:3028-39.

Olekyszyn J, Augustine AJ (1996) Plasminogen modulation of IL-1-stimulated degradation in bovine and human articular cartilage explants. The role of the endogenous inhibitors: PAI-1, alpha 2-antiplasmin, alpha 1-PI, alpha 2-macroglobulin and TIMP. **Inflamm Res** 45:464-72.

Osthues A, Knauper V, Oberhoff R, Reinke H, Tschesche H (1992) Isolation and characterization of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) from human rheumatoid synovial fluid. **FEBS Lett** 296:16-20.

Overall CM, Limeback H (1988) Identification and characterization of enamel proteinases isolated from developing enamel: amelogeninolytic serine proteinases are associated with enamel maturation in pig. **Biochem J** 256:965-72.

Overall CM, Wrana JL, Sodek J (1991) Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-β 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. **J Biol Chem** 266:14064–71.

Overall CM, King AE, Sam DK, Ong AD, Lau TTY, Wallon UM, DeClerck YA, Atherstone J (1999) Identification of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) binding site on the hemopexin carboxyl domain of human felatinase A by site-directed mutagenesis. **J Biol Chem** 274:4421-9.

Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Rönkä T, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L (2000) The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells in down-regulated by TGB-β1. **J Dent Res** 79:77-84.

Palosaari H, Ding Y, Larmas M, Sorsa T, Bartlett JD, Salo T, Tjaderhane L (2002) Regulation and interactions of MT1-MMP and MMP-20 in human odontoblasts and pulp tissue in vitro. **J Dent Res** 81:354-9.

Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Salo T (2003) Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. **Eur J Oral Sci** 111:117-27.

Panagakos FS, Kumar S (1994) Modulation of proteases and their inhibitors in immortal human osteoblast-like cells by tumor necrosis factor-alpha in vitro. **Inflammation** 18:243-65.

Partridge CA, Phillips PG, Niedbala MJ, Jeffrey JJ (1997) Localization and activation of type IV collagenase/gelatinase at endothelial focal contacts. **Am J Physiol** 272:L813-L22.

Patterson BC, Sang QA (1997) Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). **J Biol Chem** 272:28823-5.

Pei D, Weiss SJ (1995) Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. **Nature** 375:244-7.

Pei D (1999) Leukolysin/MMP25/Mt6-MMP: a novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage. **Cell Res** 9:291-303.

Pimentel ER (2001) Matriz Extracelular. In: Carvalho HF e Recco-Pimentel SM. A Célula 2001. Ed. Manole, São Paulo, pg. 217.

Pispa J, Jung HS, Jernvall J, Kettunen P, Mustonen T, Tabata MJ, Kere J (1999) Cusp patterning defect in Tabby mouse teeth and its partial rescue by FGF. **Dev Biol** 216:521-34.

Porte D, Tuckermann J, Becker M, Baumann B, Teurich S, Higgins T, Owen MJ, Schorpp-Kistner M, Angel P (1999) Both AP-1 and Cbfa1-like factors are required for the induction of interstitial collagenase by parathyroid hormone. **Oncogene** 18:667-78.

Pozzi A, Moberg PE, Miles LA, Wagner S, Soloway P, Gradner HA (2000) Elevated matrix metalloproteinase and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization. **Proc Nat Acad Sci USA** 97:2202-7.

Puente XS, Sanchez LM, Overall CM, López-Otin C (2003) Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. **Nat Rev Genet** 4:544-58.

Qi JH, Ebrahem Q, Moore N, Murphy G, Claesson-Welsh L, Bond M, Baker A, Anand-Apte B (2003) A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. **Nat Med** 9:407-15.

Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Shipley J, Nagase H, French DL, Quigley JP (1999) Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmim/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. **J Biol Chem** 274:13066-76.

Randall LE, Hall RC (2002) Temperospatial expression of matrix metalloproteinases 1, 2, 3, and 9 during early tooth development. **Connect Tissue Res** 43:205-11.

Rao VH, Bridge JA, Neff JR, Schaefer GB, Buehler BA, Vishwanatha JK, Pollock RE, Nicolson GL, Yamamoto M, Gokaslam ZL (1995) Expression of 72 kDa and 92 kDa type IV collagenases from human giant-cell tumor of bone. **Clin Exp Metastasis** 13:420-6.

Ratzinger G, Stoitzner P, Ebner S, Lutz MB, Layton GT, Rainer C, Senior RM, Shipley JM, Fritsch P, Schuler G, Romani N (2002) Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. **J Immunol** 168:4361-71.

Ray A, Bal BS, Ray BK (2005) Transcriptional induction of matrix metalloproteinase-9 in the chondrocyte and synoviocyte cells is regulated via a novel mechanism: evidence for functional cooperation between serum amyloid A-activating factor-1 and AP-1. **J Immunol** 175:4039-48.

Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J (1996) The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. **J Clin Invest** 97:2011-9.

Reith EJ, Cotty VF (1967) The absorptive activity of ameloblasts during the maturation of enamel. **Anat Rec** 157:577-88.

Reith EJ (1970) The stages of amelogenesis as observed in molar teeth of youngs rats. **J Ultrastruct Res** 17:111-51.

Reponen P, Salhberg C, Munaut C, Thesleff I, Tryggvason K (1994) High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclasts lineage during mouse development. **J Cell Biol** 124:1091-102.

Rhee JS, Coussens LM (2002) RECKing MMP function: implications for cancer development. **Trends Cell Biol** 12:209-11.

Rifas L, Fausto A, Scott MJ, Avioli LV, Welgus HG (1994) Expression of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human osteoblast-like cells: differentiation is associated with repression of metalloproteinases biosynthesis. **Endocrinology** 134:213-21.

Roeb E, Rose-John S, Erren A, Edwards DR, Matern S, Graeve L, Heinrich PC (1995) Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) in rat liver cells is increased by lipopolysaccharide and prostaglandin E2. **FEBS Lett** 357:33-6.

Robinson C, Briggs HD, Atkinson PJ, Weatherell JA (1979) Matrix and mineral changes in developing enamel. **J Dent Res** 58:871-80.

Robinson C, Brookes SJ, Shore RC, Kirkham J (1998) The developing enamel matrix: nature and function. **Eur J Oral Sci** 106:282-91.

Rodriguez-Manzaneque JC, Lane TF, Ortega MA, Hynes RO, Lawler J, Iruela-Arispe ML (2001) Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. **Proc Nat Acad Sci USA** 98:12485-90.

Rohrbach DH (1993) Molecular and cellular aspects of basement membranes. Academic Press.

Sadowski T, Dietrich S, Koschinsky F, Sedlacek R (2003) Matrix metalloproteinase 19 regulates insulin-like growth factor-mediated proliferation, migration, and adhesion in human keratinocytes through proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3. **Mol Biol Cell** 14:4569-80.

Sadowski T, Dietrich S, Koschinsky F, Ludwig A, Proksch E, Titz B, Sedlacek R (2005) Matrix metalloproteinase 19 processes the laminin 5 gamma 2 chain and induces epithelial cell migration. **Cell Mol Life Sci** 62:870-80.

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

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

Saito S, Katoh M, Masumoto M, Matsumoto S, Masuho Y (1997) Collagen degradation induced by the combination of IL-1 alpha and plasminogen in rabbit articular cartilage explant culture. **J Biochem (Tokyo)** 122:49-54.

Sakiyama H, Inaba N, Toyoguchi T, Okada Y, Matsumoto M, Moriya H, Ohtsu H (1994) Immunolocalization of complement C1s and matrix metalloproteinase 9 (92 kDa gelatinase/type IV collagenase) in the primary ossification center of the human femur. **Cell Tissue Res** 277:239-45.

Sakuraba I, Hatakeyama J, Hatakeyama Y, Takahashi I, Marayanagi H, Sasano Y (2006) The MMP activity in developing rat molar roots and incisors demonstrated by in situ zymography. **J Mol Hist** 37:87-93.

Salamonsen LA, Nagase H, Suzuki R, Woolley DE (1993) Production of matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) and matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A: 72 kDa gelatinase) by ovine endometrial cells in vitro: different regulation and preferential expression by stromal fibroblasts. **J Reprod Fertil** 98:583-9.

Sarkar L, Sharpe PT (1999) Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development. **Mech Dev** 85:197-200.

Sasahara RM, Takahashi C, Noda M (1999a) Involvement of the Sp1 site in ras-mediated downregulation of the RECK metastasis suppressor gene. **Biochem Biophys Res Commun** 264:668-75.

Sasahara RM, Takahashi C, Sogayar MC, Noda M (1999b) Oncogene-mediated downregulation of RECK, a novel transformation suppressor gene. **Br J Med Biol Res** 32:891-5.

Sasahara RM, Brochado SM, Takahashi C, Oh J, Maria-Engler SS, Granjeiro JM, Noda M, Sogayar MC (2002) Transcriptional control of RECK metastasis/angiogenesis supressor gene. **Cancer Detect Prev** 52:1-9.

Sasano Y, Zhu JX, Tsubota M, Takahashi I, Onodera K, Mizoguchi I, Kagayama M (2002) Gene expression of MMP8 and MMP13 during embryonic development of bone and cartilage in the rat mandible and hind limb. **J Histochem Cytochem** 50:325-32.

Sasaki T, Goldberg M, Takuma S, Garant PR (1990) Cell biology of tooth enamel formation. In: Myers HM (ed), Monographs in Oral Science. Basel, Karger, 1-204.

Sasaki T, Gohring W, Mann K, Maurer P, Hohenester E, Knäuper V, Murphy G, Timpl R (1997) Limited cleavage of extracellular matrix protein BM-40 by matrix metalloproteinases increases its affinity for collagens. **J Biol Chem** 272:9237-43.

Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawas A, Yamamoto E, Seiki M (1994) A matrix metalloproteinase express don the surface of invasive tumor cells. **Nature** 370:61-5.

Sato H, Kinoshita T, Takino T, Nakayama K, Seiki M (1996) Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. **FEBS Lett** 393:101-4.

Sato T, Overejo MC, Hou P, Heegaard AM, Kumegawa M, Foged NT, Delaissé JM (1997) Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts. **J Cell Sci** 110:589-96.

Sato T, Foged NT, Delaissé JM (1998) The migration of purified osteoclasts through collagen is inhibited by matrix metalloproteinase inhibitors. **J Bone Miner Res** 13:59-66.

Saunders S, Jalkanen M, O'Farrell S, Bernfield M (1989) Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycans. **J Cell Biol** 108:1547-56.

Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser HJ, Baliova M, Krzyzankova M, Marsche G, Young MF, Mihalik D, Gotte M, Malle E, Schaefer RM, Grone HJ (2005) The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. **J Clin Invest** 115:2223-33.

Schibutani T, Yamashita K, Aoki T, Iwayama Y, Nishikawa T, Hayakawa T (1999) Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) stimulate oseoclastic bone resorption. **J Bone Miner Metabol** 17:245-51.

Schonbeck U, Mach F, Libby P (1998) Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. **J Immunol** 161:3340-6.

Schwab W, Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, Dressler J, Kotzsch M, Shakibaej M (2004) Interleukin-1β-induced bexpression of the urokinase-type plasminogen activator receptor and its co-localization with MMPs in human articular chondrocytes. **Histol Histopathol** 19:105-112.

Scott-Savage P, Hall BK (1980) Differentiation ability of the tibial periosteum from the embryonic chick. **Acta Anat** 196:129-40.

Seltzer JL, Weingarten H, Akers KT, Eschbach ML, Grant GA, Eisen AZ (1989) Cleavage specifity of type IV collagenase (gelatinase) from human skin. **J Biol Chem** 264:19583-6.

Selvamurugan N, Brown RJ, Partridge NC (2000) Regulation of collagenase-3 gene expression in osteoblastic and non-osteoblastic cell lines. **J Cell Biochem** 79:182-190.

Selvamurugan N, Kwok S, Alliston T, Reiss M, Partridge NC (2004) Transforming growth factor-β1 regulation of collagenase-3 expression in osteoblastic cells by cross-talk between the Smad and MAPK signaling pathways and their components, Smad2 and Runx2. **J Biol Chem** 279:19327-34.

Septier D, Hall RC, Embry G, Goldberg M (2001) Immunoelectron microscopic visualization of pro- and secreted forms of decorin and biglycan in the predentin and during dentin formation in the rat incisor. **Calcif Tissue Int** 69:38-45.

Seo DW, Li H, Guedez L, Wingfield PT, Diaz T, Salloum R, Wei BY, Stetler-Stevenson WG (2003) TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. **Cell** 114:171-80.

Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ (1993) Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophage. **J Biol Chem** 268:23824-9.

Shapiro SD, Fliszar CJ, Broekelmann TJ, Mecham RP, Senior RM, Welgus HG (1995) Activation of the 92-kDa gelatinase by stromelysin and 4-aminophenylmercuric acetate. Differential processing and stabilization of the carboxyl-terminal domain by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). **J Biol Chem** 270:6351-6.

Shapiro SD (1998) Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. **Curr Opin Cell Biol** 10:602.

Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC, Lin RH (2001) A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppresion. **Cancer Res** 61:237-42.

Shin SJ, Lee JI, Baek SH, Lim SS (2002) Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapiucal lesions. **J Endod** 28:313-5.

Shingu M, Miyauchi S, Nagai Y, Yasutake C, Horie K (1995) The role of IL-4 and IL-6 and IL-1-dependent cartilage matrix degradation. **Br J Rheumatol** 34:101-6.

Shipley JM, Doyle GA, Fliszar CJ, Ye QZ, Johnson LL, Shapiro SD, Welgus HG, Senior RM (1996) The structural basis for the elastolytic activity of the 92-kDa and 72-kDa gelatinases. Role of the fibronectin type II-like repeats. **J Biol Chem** 271:4335–41.

Shirafuji Y, Tanabe H, Satchell DP, Henschen-Edman A, Wilson CL, Ouellette AJ (2003) Structural determinants of procryptdin recognition and cleavage by matrix metallproreinase-7. **J Biol Chem** 278:7910-9.

Shlopov BV, Lie WR, Mainardi CL, Cole AA, Chubinskaya S, Hasti KA (1997) Osteoarthritic lesions involvement of three different colagenases. **Arthritis Rheum** 40:2065-74.

Shum L, Sakakura Y, Bringas P Jr, Luo W, Snead ML, Mayo M, Crohin C, Millar S, Werb Z, Buckley S, Hall FL, Warburton D, Slavkin HC (1993) EGF abrogation-induced fusilli-form dysmorphogenesis of Meckel's cartilage during embryonic mouse mandibular morphogenesis in vitro. **Development** 118:903-17.

Simmer JP, Fukae M, Tanabe T, Yamagoshi Y, Uchida T, Xue J, Margolis HC, Shimizu M, DeHart BC, Hu CC, Bartlett JD (1998) Purification, characterization, and cloning of enamel matrix serine protease 1. **J Dent Res** 77:377-86.

Siri A, Knäuper V, Veinara N, Caocci F, Murphy G, Zardi L (1995) Different susceptibility of small and large human tenascin-C isoforms to degradation by matrix metalloproteinases. **J Biol Chem** 270:8650-4.

Smith CE, Warshawsky H (1977) Quantitative analysis of cell turnover in the enamel organ of the rat incisor. Evidence for ameloblast death immediately after enamel matrix secretion. **Anat Rec** 187:63-98.

Smith CE, Nanci A (1995) Overview of morphological changes in enamel organs cells associated with major events in amelogenesis. **Int J Dev Biol** 39:153-61.

Smith CE (1998) Cellular and chemical events during enamel maturation. **Crit Rev Oral Biol Med** 9:128-61.

Sorkin BC, Wang MY, Dobeck JM, Albergo KL, Skobe Z (2000) The cadherin-catenin complex is expressed alternately with the adenomatous polyposis coli protein during rat incisor amelogenesis. **J Histochem Cytochem** 48:397-406.

Sorsa T, Salo T, Koivunen E, Tyynela J, Konttinen YT, Bergmann U, Tuuttila A, Niemi E, Teronen O, Heikkila P, Tschesche H, Leinonen J, Osman S, Stenman UH (1997) **J Biol Chem** 272:21067-74.

Sottrup-Jensen L, Birkedal-Hansen H (1989) Human fibroblast collagenase-α2-macroglobulin interactions. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian α2-macroglobulins. **J Biol Chem** 264:393–401.

Souza AP, Line SRP (2002) The biology of matrix metalloproteinases. **Rev FOB** 10:1-6.

Spence McCachren S (1991) Expression of metalloproteinases ans metalloproteinase inhibitor in human arthritic synovium. **Arthritis Rheum** 34:1985-93.

Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE (1990) Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a cysteine active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. **Proc Nat Acad Sci USA** 87:364-8.

Stahle-Backdahl M, Sandstedt B, Bruce K, Lindahl A, Jimenez MG, Vega JA, Lopez-Otin C (1997) Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in post-natal bone remodelling and in rheumatoid arthritis. **Lab Invest** 76:717-28.

Stanton H, Ung L, Fosang AJ (2002) The 45 kDa collagen-binding fragment of fibronectina induces matrix metalloproteinase-13 synthesis by chondrocytes and aggrecan degradation by aggrecanases. **Biochem J** 364:181-90.

Staquet MJ, Piccardi N, Piccirilli A, Vincent C, Schmitt D, Msika P (2004) Novel protein kinase C and matrix metalloproteinase inhibitors of vegetable origin as potential modulators of Langerhans cell migration following hasten-induced sensibilization. **Int Arch Allergy Immunol** 133:348-56.

Stawowy P, Margeta C, Kallisch H, Seidah NG, Chrétien M, Fleck E, Graf K (2004) Regulation of matrix metalloproteinase MT1-MMP/MMP-2 in cardiac fibroblasts by TGF-β1 involves furin-convertase. **Cardiovasc Res** 63:87-97.

Stawowy P, Meyborg H, Stibenz D, Stawowy NBP, Roser M, Thanabalasingam U, Veinot JP, Chrétien M, Seidah NG, Fleck E, Graf K (2005) Furin-like proprotein convertases are central

regulators of the membrane type matrix metalloproteinase-Pro-Matrix metalloproteinase-2 proteolytic cascade in atherosclerosis. **Circulation** 111:2820-7.

Steffensen B, Wallon UM, Overall CM (1995) Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. **J Biol Chem** 270:11555-66.

Steffensen B, Bigg HF, Overall CM (1998) The involvement of the fibronectin type II-like modules of human gelatinase A in cell surface localization and activation. **J Biol Chem** 272:20622-8.

Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Onisto M, Levy AT, Liotta LA (1989) Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues. **J Biol Chem** 265:13933-8.

Stetler-Stevenson WG (1990) Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis. Cancer Metastasis Rev 9:289-303.

Stetler-Stevenson WG, Bersch N, Golde DW (1992) Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) has erythroid-potentiating activity. **FEBS Lett** 296:231-4.

Sternlicht MD, Werb Z (2001) How metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol** 17:463-516.

Stickens D, Behonick DJ, Ortega N, Heyer B, Hartenstein B, Yu Y, Fosang AJ, Schorpp-Kistner M, Angel P, Werb Z (2004) Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. **Development** 131:5883-95.

Stöcker W, Grams F, Baumann U, Reinemer P, Gomis-Rüth FX, McKay DB, Bode W (1995) The metzincins - topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Sci** 45:823-40.

Stracke JO, Fosang AJ, Last K, Mercuri FA, Pendás AM, Llano E, Perris R, Di Cesare PR, Murphy G, Knäuper (2000) Matrix metalloproteinases 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP). **FEBS Lett** 478:52-6.

Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI (1995) Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloproteinase. **J Biol Chem** 270:5331-8.

Su S, Dehnade F, Zafarullah M (1996) Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene expression by transforming growth factor-beta and dexamethasone in bovine and human articular chondrocytes. **DNA Cell Biol** 15:1039-48.

Su S, Grover J, Roughley PJ, DiBattista JA, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Zafarullah M (1999) Expression of the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) gene family in normal and osteoarthritic joints. **Rheumatol Int** 18:183-91.

Sulkala M, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L (2002) The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. **J Dent Res** 81:603-7.

Sulkala M, Pääkkönen V, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L (2004) Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13, collagenase-3) is highly expressed in human tooth pulp. **Connect Tissue Res** 45:231-7.

Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjaderhane L (2007) Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. **Arch Oral Biol** 52:121-7.

Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H (1990) Mechanisms of activation tissue procollagenase by matrix metallopreoteinase 3 (stromelysin). **Biochemistry** 29:10261:70.

Tanabe T, Fukae M, Shimizu (1996) Possible actions of metalloproteinases found in porcine enamel in an early secretory stage. **Adv Dent Res** 10:170-2.

Takahara M, Naruse T, Takagi M, Orui H, Ogino T (2004) Matrix metalloproteinase-9 expression, tartrate-resitant acid phosphatase activity, and DNA fragmentation in vascular and cellular invasion into cartilage preceding primary endochondral ossification in long bones. **J Orthop Res** 22:1050-7.

Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, Kitayama H, Maki M, Hitomi K, Kitaura Y, Takai S, Sasahara RM, Horimoto A, Ikawa Y, Ratzkin BJ, Arakawa T, Noda M (1998) Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. **Proc Nat Acad Sci USA** 95:13221-6.

Takahashi I, Onodera K, Bae JW, Mitani H, Sasano Y, Mitani H (2005) Age-related changes in the expression of gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in mandibular condylar, growth plate, and articular cartilage in rats. **J Mol Histol** 36:355-66.

Takano Y, Kawahara I, Hoshino M, Takruchi K, Maeda T, Ohshima H, Hanaizumi Y, Kawano Y (1996) Dendritic cells: a novel cellular component of the rat incisor enamel organ appearing in the late stages of enamel maturation. **Adv Dent Res** 10:94-104.

Takata T, Zhao M, Uchida T, Wang T, Aoki T, Bartlett JD, Nikai H (2000) Immunohistochemical detection and distribution of enamelysin (MMP-20) in human odontogenic tumors. **J Dent Res** 79:1608-16.

Takino T, Sato H, Shinagawa A, Seiki M (1995) Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT2-MMP) gene from a human placenta cDNA library. **J Biol Chem** 270:23013-20.

Tervahartiala T, Pirila E, Ceponis A, Maisi P, Salo T, Tuter G, Kallio P, Tornwall J, Srinivas R, Konttinen YT, Sorsa T (2000) The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2, -8, -13, and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. **J Dent Res** 79:1969-77.

Teti A, Farina AR, Villanova I, Tiberio A, Tacconelli A, Sciortino G, Chambers AF, Gulino A, Mackay AR (1998) Activation of MMP-2 by human GCT23 giant ceel tumor cells induced by osteopontin,

bone sialoprotein and GRGDSP peptides is a RGD and cell shape change dependent. **Int J Cancer** 77:82-93.

Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE (2001) Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. **Arthritis Rheum** 44:585-94.

Tetlow LC, Woolley DE (2001) Expression of vitamin D receptors and matrix metalloproteinases in osteoarthritic cartilage and human articular chondrocytes in vitro. **Osteoarthritics Cartilage** 9:423:31.

Tezuka KI, Nemoto K, Tezuka Y, Sato T, Ikeda Y, Kobori M, Kawashima H, Eguchi nH, Hakeda Y, Kumegawa M (1994) Identification of matrix metalloproteinase 9 in rabbit osteoclasts. **J Biol Chem** 269:15006-9.

Thathiah A, Carson DD (2004) MT1-MMP mediates MUC1 shedding independent of TACE/ADAM17. **Biochem J** 382:363-73.

Thesleff I (2003) Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. **J Cell Sci** 116:1647-8.

Thomas GT, Lewis MP, Speight PM (1999) Matrix metalloproteinases and oral cancer. **Oral Oncol** 35:227-33.

Thomas HF, Kollar EJ (1989) Differentiation of odontoblasts in grafted recombinants of murine epithelial root sheath and dental mesenchyme. **Arch Oral Biol** 34:27-35.

Thorogood P, Hinchliffe J (1975) An analysis of the condensation process of collagen type II at epithelio-mesenchymal interfaces during morphogenesis of the cartilaginous neurocranium. **Dev Biol** 116:494-509.

Titz B, Dietrich S, Sadowski T, Beck C, Petersen A, Seflacek R (2004) Activity of MMP-19 inhibits capillary-like formation due to processing of nidogen-1. **Cell Mol Life Sci** 61:1826-33.

Tjäderhane L, Salo T, Larjava H, Larmas M, Overall CM (1998a) A novel organ culture method to study the function of human odontoblasts in vitro: gelatinase expression by odontoblasts is deifferentially regulated by TGF-β1. **J Dent Res** 77:1488-98.

Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T (1998b) The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. **J Dent Res** 77:1622-9.

Tomasek JJ, Halliday NL, Updike DL, Ahern-Moore JS, Vu TK, Liu RW, Howard EW (1997) Gelatinase A activation is regulated by the organization of the polymerized actin cytoskeleton. **J Biol Chem** 272:7482-7.

Toth M, Sado Y, Ninomiya Y, Fridman R (1999) Biosynthesis of α2 (IV) and α 1(IV) chains of collagen IV and interactions with matrix metalloproteinase-9. **J Cell Physiol** 180:131–9.

Trainor PA (2005) Specification of neural crest cell formation and migration in mouse embryos. **Semin Cell Dev Biol** 16:683-93.

Tsubota M, Sasano Y, Takahashi I, Kagayama M, Shimauchi H (2002) Expression of MMP-8 and MMP-13 mRNAs in rat periodontium during tooth eruption. **J Dent Res** 81:673-8.

Tuck AB, Wilson SM, Khokha R, Chambers AF (1991) Different patterns of gene expression in ras-resistant and ras-sensitive cells. **J Natl Cancer Inst** 83:485-91.

Tucker AS, Headon DJ, Schneider P, Ferguson BM, Overbeek P, Tschopp J, Sharpe PT (2000) Edar/Eda interactions regulate enamel knot formation in tooth morphogenesis. **Development** 127:4691-700.

Tucker AS, Headon DJ, Courtney JM, Overbeek P, Sharpe PT (2004) The activation level of the TNF family receptor, Edar, determines cusp number and tooth number during tooth development. **Dev Biol** 268:185-94.

Tuckermann JP, Pittois K, Partridge NC, Merregaert J, Angel P (2000) Collagenase-3 (MMP-13) and integral membrane protein 2a (Itm2a) are marker genes of chondrogenic/osteoblastic cells in bone formation: sequential temporal, and spatial expression of Itm2a, alkaline phosphatase, MMP-13, and osteocalcin in the mouse. **J Bone Miner Res** 15:1257-65.

Tuckermann JP, Vallon R, Gack S, Grigoriadis AE, Porte D, Lutz A, Wagner EF, Schmidt J, Angel P (2001) Expression of collagenase-3 (MMP-13) in c-Fos-induced osteosarcomas and chondrosarcomas is restricted to a subset of cells of the osteo-/chondrogenic lineage. **Differentiation** 69:49-57.

Tuuttila A, Morgunova E, Bergmann U, Lindqvist I, Maskos K, Fernandez-Catalan C, Bode W, Tryggvason K, Schneider G (1998) Three-dimensional structure of human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 at 2.1 Å resolution. **Mol Biol** 284:1133-40.

Uchida M, Shima M, Shimoaka T, Fujieda A, Obara K, Suzuki H, Nagai Y, Ikeda T, Yamato H, Kawaguchi H (2000) Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) by bone resorptive factors in osteoblastic cells. **J Cell Physiol** 185:207-14.

Uchio-Yamada K, Manabe N, Goto Y, Anan S, Yamamoto Y, Takano K, Ogura A, Matsuda J (2005) Decreased expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase in the kidneys of hereditary nephrotic (ICGN) mice. **J Vet Med Sci** 67:35-41.

Udayakumar TS, Chen ML, Bair EL, von Bredow DC, Cress AE, Nagle RB, Bowden GT (2003) Membrane type-1-matrix metalloproteinase expressed by protate carcinoma cells cleaves human laminin-5 β3 chain and induces cell migration. **Cancer Res** 63:2292-9.

Unemori E, Hibbs MS, Amento EP (1991) Constitutive expression of a 92-kD gelatinase (type V collagenase) by rheumatoid synovial fibroblasts and its induction in normal human fibroblasts by inflammatory cytokines. **J Clin Invest** 88:1656-62.

Uria JA, López-Otin C (2000) Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. **Cancer Res** 60:4745-51.

Uusitalo H, Hiltunen A, Soderstrom M, Aro HT, Vuorio E (2000) Expression of cathepsins B, H, K, L, and S and matrix metallopreoteinases 9 and 13 during chondrocyte hyertrophy and endochondral ossification in mouse fracture callus. **Calcif Tissue Int** 67:382-90.

Vaahtokari A, Aberg T, Jernvall J, Keranen S, Thesleff I (1996) The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth. **Mech Dev** 54:39-43.

Väänänen A, Tjäderhane L, Eklund L, Heljasvaara R, Pihlajaniemi T, Herva R, Ding Y, Bartlett JD, Salo T (2004) Expression of collagen XVIII and MMP-20 in developing teeth and odontogenic tumors. **Matrix Biol** 23:153-61.

Van den Steen PE, Opdenakker G, Wormald MR, Dwek RA, Rudd PM (2001) Matrix remodeling enzymes, the protease cascade and glycosylation. **Biochim Biophys Acta** 1528:61-73.

Van den Steen PE, Proost P, Grillet B, Brand DD, Kang AH, Van Damme J, Opdenakker G (2002) Cleavage of denatures natural collagen type II by neutrophil gelatinase B reveals enzyme specificity, post-translational modifications in the substrate, and the formation of remnant epitopes in rheumatoid arthrits. **FASEB J** 16:379-89.

Van der Zee E, Jansen I, Hoeben K, Beertsen W, Everts V (1998) EGF and IL-1 alpha modulate the release of collagenase, gelatinase and TIMP-1 as well as the release of calcium by rabbit calvarial bone explants. **J Periodontal Res** 33:65-72.

van Meurs J, van Lent P, Holthuysen A, Lambrou D, Bayne E, Singer I, van den Berg W (1999) Active matrix metalloproteinases are present in cartilage during immune complex-mediated arthritis: a pivotal role for stromelysins-1 in cartilage destruction. **J Immunol** 163:5633-9.

Van Wart HE, Birkedal-Hansen H (1990) The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. **Proc Nat Acad Sci USA** 87:5578–82.

Varguese S, Ramsby ML, Jeffrey JJ, Canalis E (1995) Basic fibroblast growth factor stimulates expression of interstitial collagenase and inhibitors of metalloproteinases in rat bone cells. **Endocrinology** 136:2156-62.

Varguese S, Delany AM, Liang L, Gabbitas B, Jeffrey JJ, Canalis E (1996) Transcriptional and posttranscriptional regulation of interstitial collagenase by platelet-derived growth factor BB in bone cell cultures. **Endocrinology** 137:431-7.

Velasco G, Cal S, Merlos-Suárez A, Ferrando AA, Alvarez S, Nakano A, Arribas J, López-Otin C (2000) Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. **Cancer Res** 60:877-82.

Vincenti MP, Coon CI, Mengshol JA, Yocum S, Mitchell P, Brinckerhoff CE (1998) Cloning of the gene for interstitial collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) from rabbit synovial fibroblasts: differential expression with collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1). **Biochem J** 331:341-6.

Vincenti MP (2001) The matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genes. In Matrix Metalloproteinase Protocols, ed. IM Clark, pp. 121–48. Totowa, NJ: Humana.

Visse R, Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res** 92:827-39.

Vogel WF, Aszodi A, Alves F, Pawson T (2001) Discoidin domain receptor 1 tyrosine kinase has an essential role in mammary gland development. **Mol Cell Biol** 21:2906-17.

von Bredow DC, Cress AE, Howard EW, Bowden GT, Nagle RB (1998) Activation of gelatinase-tissue-inhibitors-of-metalloproteinase complexes by matrilysin. **Biochem J** 331:965-72.

Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z (1998). MMP-9/gelatinaseB is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. **Cell** 93:411-22.

Yamagiwa H, Takunaga K, Hayami T, Hatano G, Uchida M, Endo N, Takahashi HE (1999) Expression of metalloproteinase-13 (Collagenase-3) is induced during fracture healing in mice. **Bone** 25:197-203.

Yamamoto K, Matsuo S, Nishimoto T, Wakisaka S, Ichikawa H, Nakata T, Akai M (1994) Ultrastructure of granular materials in rat incisor enamel organ at early maturation stage. **Arch Oral Biol** 29:157-9.

Yamane A, Mayo ML, Bringas Jr P, Chen L, Huynh M, Thai K, Shum L, Slavkin HC (1997) TGF-alpha, EGF, and their cognate EGF receptor are co-expressed with desmin during embryonic, fetal, and neonatal myogenesis in mouse tongue development. **Dev Dyn** 209:353-66.

Yamane A, Bringas Jr P, Mayo ML, Amano O, Takahashi K, Vo H, Shum L, Slavkin HC (1998) Transforming growth factor alpha up-regulates desmin expression during embryonic mouse tongue myogenesis. **Dev Dyn** 213:71-81.

Yana I, Weiss SJ (2000) Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. **Mol Biol Cell** 11:2387-401.

Yoneda T, Sasaki A, Dunstan C, Williams PJ, Bauss F, De Clerck YA, Mundy GR (1997) Inhibition of osteolytic bone metastasis of breast cancer by combined treatment with the bisphosphonate ibandronato and tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-2. **J Clin Invest** 99:2509-17.

Yang Z, Strickland DK, Bornstein P (2001) Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. **J Biol Chem** 276:8403-8.

Yoshiba K, Yoshiba N, Aberdam D, Meneguzzi G, Perrin-Schmitt F, Stoetzel C, Ruch JV, Lesot H (1998) Expression and localization of laminin-5 subunits during mouse tooth development. **Dev Dyn** 211:164-76.

Yoshiba N, Yoshiba K, Stoetzel C, Perrin-Schmitt F, Cam Y, Ruch JV, Lesot H (2003) Temporospatial gene expression and protein localization of matrix metalloproteinases and their inhibitors during mouse molar tooth development. **Dev Dyn** 228:105-12.

Yu Q, Stamenkovic I (1999) Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. **Genes Dev** 13:35-48.

Yu Q, Stamenkovic I (2000) Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-β and promotes tumor invasion and angiogenesis. **Genes Dev** 14:163-76.

Wahlgren J, Salo T, Teronen O, Luoto H, Sorsa T, Tjaderhane L (2002) Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpal and periapical inflammation and periapical root-canal exudates. **Int Endo J** 35:897-904.

Walakovits LA, Moore VL, Bhardwaj N, Gallick GS, Lark MW (1992) Detection of stromelysin and collagenase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthrits and posttraumatic knee injury. **Arthrits Rheum** 35:35-42

Walker DG, Lapiere CM, Gross J (1964) A colagenolytic factor in rat bone promoted by parathyroid extract. **Biochem Biophys Res Commun** 15:397-402.

Walter H, Kawashima A, Nebelung W, Neumann W, Roessner A (1998) Immunohistochemical analysis of several proteolytic enzymes as parameters of cartilage degradation. **Pathol Res Pract** 194:73-81.

Wang Z, Juttermann R, Soloway PD (2000) TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. **J Biol Chem** 275:26411-5.

Ward RV, Atkinson SJ, Slocombe PM, Docherty AJP, Reynolds JJ, Murphy G (1991) Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits the activation of 72 kDa progelatinase by fibroblast membranes. **Biochim Biophys Acta** 1079:242-6.

Warshawsky H, Smith CE (1974) Morphological classification of rat incisor ameloblasts. **Anat Rec** 179:423-46.

Webster NL, Crowe SM. Matrix metalloproteinases, their production by monocytes and macrophages and their potential role in HIV-related diseases. **J Leukoc Biol** 2006; 80:1052-66.

Welgus HG, Campbell EJ, Bar-Shavit Z, Senio RM, Teitelbaum SL (1985) Human alveolar macrophages produce a fibroblast-like collagenase and collagenase inhibitor. **J Clin Invest** 76:219-24.

Welgus HG, Fliszar CJ, Seltzer JL, Achmid TM, Jeffrey JJ (1990) Differential susceptibility of type X collagen to cleavage by two mammalian interstitial collagenases and 72-kDa type IV collagenase. **J Biol Chem** 265:13521-7.

Werb Z, Chin JR (1998) Extracelullar matrix remodeling during morphogenesis. **Ann NY Acad Sci** 857:110-8.

Wernicke D, Seyfert C, Hinzmann B, Gromnica-Ihle E (1996) Cloning of collagenase 3 from the synovial membrane and its expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **J Rheumatol** 23:590-5.

Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI (1989) SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. **J Biol Chem** 264:17213-21.

Wilhelm SM, Shao ZH, Housley TJ, Seperack PK, Baumann AP, Gunja-Smith Z, Woessner Jr., JF (1993) Matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1): identification as the cartilage acid metalloproteinase and effect of pH on catalytic properties and calcium affinity. **J Biol Chem** 268:21908-13.

Will H, Hinzmann B (1995) cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potencial transmembrane domain. **Eur J Biochem** 231:602-8.

Will H, Atkinson SJ, Butler GS, Smith B, Murphy G (1996) The soluble catalytic domain of membrane type I matrix metalloproteinases cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. **J Biol Chem** 271:17119-23.

Williamson RA, Marston FA, Angal S, Koklitis P, Panico M, Morris HR, Carne AF, Smith BJ, Harris TJ, Freedman RB (1990) Disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). **Biochem J** 268:267-74.

Williamson RA, Martorell G, Carr MD, Murphy G, Docherty AJP, Freedman RB, Feeney J (1994) Solution structure of hte active domain of tissue inhibitor of metalloproteinases-2: a new member of the OB fold protein family. **Biochemistry** 33:11745-59.

Willenbrock F, Crabbe T, Slocombe PM, Sutton CW, Docherty AJP, Cockett MI, O'Shea M, Brocklehurst K, Phillips IR, Murphy G (1993) The activity of the tissue inhibitors of metalloproteinases is regulated by c-terminal domain interactions: a kinectic analysis of the inhibition of gelatinase A. **Biochemistry** 32:4330-7.

Winchester SK, Bloch SR, Fiacco GJ, Partridge NC (1999) Regulation of expression of collagenase-3 in normal, differentiating rat osteoblasts. **J Cell Physiol** 181:479-88.

Whittaker DK (1978) The enamel-dentine junction of human and Macaca irus teeth: a light and electron microscopic study. **J Anat** 125:323-35.

Witty JP, Foster SA, Stricklin GP, Matrisian LM, Stern PH (1996) Parathyroid hormone-induced resorption in fetal rat limb bones is associated with production of the metalloproteinases collagenase and gelatinase B. **J Bone Miner Res** 11:72-8.

Wojtowicz-Praga SM, Dickson RB, Hawkins MJ (1997) Matrix metalloproteinases inhibitors. **Invest New Drugs** 15:61-76.

Wu W, Billinhurst RC, Pidoux I, Antoniou J, Zukor D, Tanzer M, Poole AR (2002) Sites of collagenase cleavage and denaturation of type II collagen in aging and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13. **Arthritis Rheum** 46:2087-94.

Wucherpfenning AL, Li YP, Stetler-Stevenson WG, Rosenberg AE, Stashenko P (1994) Expression of 92 kD type IV collagenase/gelatinase B in human osteoclasts. **J Bone Miner Res** 9:549-56.

Zafarullah M, Pelletier JP, Cloutier JM, Martel-Pelletier J (1993) Elevated metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in human osteoarthritic synovia. **J Rheumatol** 20:263-7.

Zafarullah M, Su S, Martel-Pelletier J, DiBattista JA, Costello BG, Stetler-Stevenson WG, Pelletier JP (1996) Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) mRNA is constitutively expressed in bovine, human normal, and osteoarthritic articular chondrocytes. **J Cell Biochem** 60:211-7.

Zhang K, McQuibban GA, Silva C, Butler GS, Johnston JB, Holden J, Clark-Lewis I, Overall CM, Power C (2003). HIV-induced metalloproteinase processing of the chemokine stromal cell derived factor-1 causes neurodegeneration. **Nat Neurosci** 6:1064-71.

Zeichner-David M (2001) Is there more to enamel matrix proteins than biomineralization? **Matrix Biol** 20:307-16.

Zeng Y, Rosborough RC, Li Y, Gupta AR, Bennett J (1998) Temporal ans spatial regulation of gene expression mediated by the promoter for the human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3)-encoding gene. **Dev Dyn** 211:228-37.

Zhou Z, Apte SS, Soininen R, Cao R, Baaklini GY, Rauser RW, Wang J, Cao Y, Tryggvason K (2000) Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase 1. **Proc Nat Acad Sci USA** 97:4052-7.

Zucker S, Moll UM, Lysik RM, DiMassimo EI, Stetler-Stevensen WG, Liotta LA, Scwedes JW (1990) Extraction of type-IV collagenase/gelatinase from plasma membranes of human cancer cells. **Int J Cancer** 45:1137-42.

Anexos

Curriculum Vitae

Curriculum Vitae

Formação Acadêmica

2003 - 2007 Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) Campinas, SP

Pós-Graduação

Doutorado Direto em Biologia Molecular e Funcional – Área: Bioquímica

1999 - 2002 Universidade Estadual Paulista (UNESP) Bauru, SP

Ensino Superior

Licenciatura Plena em Ciências Biológicas

Bolsas

- Bolsista de **Doutorado Sanduíche CAPES** do período de 03/2004 a 03/2007, orientada pelo Prof. Dr. José Mauro Granjeiro e intitulado de *"Desenvolvimento Ósseo e Dentário: Aspectos Biológicos, Bioquímicos e Moleculares da Remodelação da Matriz Extracelular pela Metaloproteinases de Matriz e seus Inibidores"*, trabalho foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Bioengenharia, Materiais e Mineralização Biológica - LBMM, Faculdade de Odontologia de Bauru, USP. Orientação no exterior pelo Prof. Dr. Henry Magloire (BEX 2415/04-6 - 02/2005 a 01/2006), trabalho desenvolvido nas dependências do Laboratoire de Régéneration et Development de Tissus Dentaires, Faculte d'Odontologie de Lyon, Université Claude Bernard, Lyon/França.

- Bolsista de **Iniciação Científica FAPESP** processo n. 00/3702-6, do período de 09/2000 a 08/2001, orientado pelo Prof. Dr. Manoel Lima de Menezes e intitulado de "*Avaliação do Emprego dos Adsorventes: Carvão Ativo, Chromosorb e Membrana C18 na Preparação de Amostras de Ar para a Determinação da d-Aletrina em Ambientes Fechados"* trabalho desenvolvido nas dependências do Laboratório de Cromatografia Gasosa do Centro de Atividades Toxicológicas – CEATOX, UNESP/Botucatu e Instituto Municipal de Saúde, Bauru.

Estágios

- **Iniciação Científica** orientada pelo Prof. Dr. José Mauro Granjeiro, Laboratório de Bioquímica, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, USP/Bauru. Trabalhos desenvolvidos na área de desenvolvimento ósseo e dentário e resposta tecidual ao implante de biomateriais, analisados por técnica imunohistoquímica (imunoperoxidase), além de intenso treinamento em processamento histotécnico padrão e manipulação de animais de laboratório, do período de outubro de 2001 até dezembro de 2002, com 40 horas/semana, nas dependências do Laboratório de Bioquímica – FOB/USP.
- **Iniciação Científica** orientada pelo Prof. Dr. Manoel Lima de Menezes, Departamento de Química, Faculdade de Ciências, UNESP/Bauru. Trabalhos desenvolvidos na área de química analítica utilizando-se HPLC e GC para a análise de pesticidas presentes no ar, do período de março de 2000 até setembro de 2000, com 20 horas/semana, nas dependências do Laboratório de Química, UNESP/Bauru e Instituto Municipal de Saúde, Bauru.

Linhas de Pesquisa

- **Bioengenharia Óssea** (Coordenada pelo Prof. Dr. José Mauro Granjeiro)

Objetivos: Avaliar o comportamento celular de acordo com a variação do substrato 3D no qual estas estão inseridas e o desenvolvimento de novas metodologias para futuro protocolo clínico.

Palavras-chave: Cultura Primária de Osteoblastos Humanos, Matrizes Colagênicas Tridimensionais e Xenoenxerto.

Áreas do Conhecimento: Cultura Celular, Biomateriais, Biologia Molecular, Biologia Celular e Bioquímica.

- **Biomateriais** (Coordenado pelo Prof. Dr. José Mauro Granjeiro)

Objetivos: Avaliação *in vivo* e *in vitro* de biomateriais de origem bovina.

Palavras-chave: Biomaterial Bovino e Reparo Ósseo.

Áreas do Conhecimento: Bioquímica, Histologia e Citologia e Biologia Celular.

- **Desenvolvimento Ósseo** (Coordenado pelo Prof. Dr. José Mauro Granjeiro)

Objetivos: Entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nos processos de ossificação fisiológicos.

Palavras-chave: Metaloproteinases de Matriz (MMP), RECK, Inibidores Teciduais de MMP (TIMP), Imunohistoquímica e Biologia Molecular.

Áreas do Conhecimento: Bioquímica, Embriologia, Histologia e Biologia Molecular.

- **Desenvolvimento Dentário** (Coordenado pelo Prof. Dr. José Mauro Granjeiro)

Objetivos: Entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de mineralização normal dos tecidos duros dentários.

Palavras-chave: RECK, Imunohistoquímica e Biologia Molecular.

Áreas do Conhecimento: Bioquímica, Embriologia, Histologia e Biologia Molecular.

Participação em Projetos

- **Edital 19 Universal CNPq** (proc. n. 479043-2004-3), coordenado pelo Prof. Dr. José Mauro Granjeiro (Universidade Federal Fluminense) (2005 - em andamento).

- **Edital Universal CNPq** (proc. n. 475721/2003-9), intitulado de *"Análise da Expressão do gene RECK Durante o Reparo Ósseo, Osteogênese, Odontogênese e Amelogênese em Camundongos"*, coordenado pelo Prof. Dr. José Mauro Granjeiro (FOB – USP) (2003-2005).

- **Projeto Temático Fapesp** (proc. n. 01/10707-7), intitulado de *"Bases Moleculares do Controle de Proliferação Celular e Origem de Neoplasias na Era Genômica e Proteômica"*, coordenado pela. Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar (Instituto de

Química - USP) e pesquisador principal Prof. Dr. José Mauro Granjeiro (FOB – USP) (2001-2005).

Artigos em Revistas Especializadas

Publicados

- Paiva KBS, Menezes ML (2003) Avaliação do emprego dos adsorventes: Carvão Ativo, Chromosorb W e Membrana C18 na preparação de amostras de ar para a determinação da *d*-aletrina em ambientes fechados. ***Eclética Química***, 28(1):97-103.

- Accorsi-Mendonça T, Zambuzzi WF, Paiva KBS, Lauris JRP, Cestari TM, Taga R, Granjeiro JM (2005) Expression of metalloproteinase-2 in the cell response to porous demineralized bovine bone matrix. ***J Mol Histol*** 36:311-6.

- Menezes R, Bramante CM, Paiva KBS, Letra A, Carneiro E, Zambuzzi WF, Granjeiro JM (2006) Receptor activator NF kappa beta-ligant and osteoprotegerin protein expression in human periapical and cystis granulomas. ***Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endo*** 102(3):404-9.

Submetidos

- Paiva KBS, Zambuzzi WF, Accorsi-Mendonça T, Taga R, Sogayar MC, Granjeiro JM. Immunohistochemical localization of matrix metalloproteinases-2, -9, and RECK during rat incisor amelogenesis. ***Eur J Oral Biol.***
- Gasque KCS, Oliveira RC, Ceolin DS, Cestari TM, Correa A, Paiva KBS, Takyia CM, Taga R, Taga EM, Granjeiro JM. Evaluation of the biocompatibility of an acellular bovine pericardium membrane and its potential as an osteoblast scaffold. ***Ciência Odontológica Brasileira.***
- Zambuzzi WF, Paiva KBS, Zanelatto GN, Corotti MV, Oliveira RC, Taga R, Granjeiro JM. Production of MMP-9 by macrophage- and fibroblast-like cells in response to porous deproteinized bovine bone. ***J Biomat Appli.***
- Accorsi-Mendonça T, Paiva KBS, Zambuzzi WF, Cestari TM, Lara VS, Sogayar MC, Taga R, Granjeiro JM. Expression of matrix metalloproteinases -2, -9, and RECK during alveolar bone regeneration in rat. ***J Mol Histol*** .
- Demarchi ACCO, Zambuzzi WF, Paiva KBS, Silva-Valenzuela MG, Nunes FD, Figueira RCS, Sassahara RM, Demasi MAA, Winnischofer SMB, Sogayar MC, Granjeiro JM. Temporal and spatial distribution of RECK, MMP-2 and MMP-9 during secondary palate development. ***Matrix Biol.***

Comunicação em Congresso Científico

Resumos em Revistas Indexadas

- Accorsi-Mendonça T, Zambuzzi WF, Paiva KBS, Oliveira LCS, Lara VS, Granjeiro JM. Metalloproteinase-2, -9 and RECK protein expression during alveolar bone

regeneration. Trabalho apresentado oralmente ao III International Dental Meeting – UNICAMP and XII Dental Meeting of Piracicaba, 03 a 07 de outubro de 2005, Monte Sião/MG. ***Braz J Oral Sci*** 4(14):814.

- Paiva KBS, Accorsi-Mendonça T, Taga R, Bramanti CM, Granjeiro JM. Physicochemical characterization and histologic analysis of differents xenografts in the repair of critical size defecets in rats. Trabalho apresentado na forma de pôster ao 2º Joint Meeting of the European Calcified Tissue Society (ECTS) and International Bone and Mineral Society (IBMS), 25 a 29 de julho de 2005, Genebra/Suiça. ***Bone*** 36:S103-S479.
- Paiva KBS, Zambuzzi WF, Accorsi-Mendonça T, Demarchi ACCO, Granjeiro JM. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and RECK during amelogenesis in rats. Trabalho apresentado na forma de pôster ao Comparative Endocrinology of Calcium Regulation Workshop, 25 de julho de 2005, Genebra/Suiça. ***Bone*** 36:S103-S479.
- Menezes R, Zambuzzi WF, Paiva KBS, Demarchi ACCO, Accorsi-Mendonça T, Zanelatto GN, Sogayar MC, Granjeiro JM. MMP-9 expression in response to fully-processed inorganic medullar bovine bone. Trabalho apresentado em forma de pôster a Internacional Association of Dental Research (IADR), 10 a 13 de março de 2004, Honolulu/EUA. ***J Dent Res*** 83(Special):3569.
- Zambuzzi WF, Oliveira LC, Paiva KBS, Cestari TM, Demarchi ACCO, Sogayar MC, Taga R, Granjeiro JM. The expression of gelatinases a (MMP-2, 72kda) and b (MMP-9, 92kda) during the alveolar bone repair. Trabalho que será apresentado na forma de pôster a 20º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa

Odontológica (SBPqO), 30 de agosto a 3 de setembro de 2003, Águas de Lindóia/SP. ***Pesquisa Odontológica Brasileira***, 17(Suplemento 2):80.

- Takamori ER, Oliveira RC, Bassetto AP, Canova GC, Paiva KBS, Silva RM, Accorsi-Mendonça T, Buzalaf MAR, Taga R, Sogayar MC, Granjeiro JM. Biocompatibility assessment of a potential bone substitute: the fully processed bovine bone. Trabalho apresentado em forma de pôster a Internacional Association of Dental Research (IADR), 25 a 28 de junho 2003, Gotenburgo/Suécia. ***J Dent Res*** 82:B146.

Resumos em Anais de Congressos:

- Paiva KBS, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Couble M-C, Bleicher F, Magloire H, Granjeiro JM. Protein and gene expression of MMPs, TIMPs, and RECK during mouse endochondral ossification development. Trabalho submetido a **XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBQ)**, 21 a 25 de maio de 2007, Salvador/BA.

- Paiva KBS, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Couble M-C, Bleicher F, Magloire H, Granjeiro JM. Gene and protein expression of MMPs, TIMPs, and RECK during mouse craniofacial development. Trabalho submetido a **XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBQ)**, 21 a 25 de maio de 2007, Salvador/BA.

- Paiva KBS, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Bleicher F, Magloire H, Granjeiro JM. Temporal and spatial MMP-2, -9, TIMP-1, -2, and RECK localization during mouse

endochondral ossification development. Trabalho apresentado na forma de pôster a **XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBQ)**, 01 a 04 de julho de 2006, Águas de Lindóia/SP.

- Accorsi-Mendonça T, Paiva KBS, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Bleicher F, Magloire H, Granjeiro JM. Temporal and spatial MMP-2, -9, TIMP-1, -2, and RECK localization during rat incisor development. Trabalho apresentado na forma de pôster a **XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBQ)**, 01 a 04 de julho de 2006, Águas de Lindóia/SP.
- Paiva KBS, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Couble ML, Bleicher F, Magloire H, Granjeiro JM. Développement dentaire et osseux: aspects biologiques, biochimiques et móleculaires du remodelage de la matrice extracelular par les MMPs et leurs inhibiteurs. Trabalho apresentado na forma de pôster a **Journée Laennec du 13 décembre 2005**, Lyon/França.
- Demarchi ACCO, Zambuzzi WF, Paiva KBS, Nunes F, Valenzuela MG, Sogayar MC, Granjeiro JM. Expression of MMP-2, -9, and RECK during palatogenesis. Trabalho apresentado na forma de pôster a **XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBQ)**, 02 a 05 de julho de 2005, Águas de Lindóia/SP.
- Accorsi-Mendonça T, Zambuzzi WF, Paiva KBS, Demarchi ACCO, Cestari TM, Taga R, Lauris JRP, Granjeiro JM. Metalloproteinase 2 expression during cellular response to the xenograft of during palatogenesis. Trabalho apresentado na forma de pôster a **XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBQ)**, 02 a 05 de julho de 2005, Águas de Lindóia/SP.

- Amado FM, Paiva KBS, Accorsi-Mendonça T, Ceolin D, Belone AFF, Opromola DVA, Fleury RN, Takiya CM, Granjeiro JM. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in lobomycosis (Lacazia loboi). Trabalho apresentado na forma de pôster a **Inhibition of Matrix Metalloproteinases: Expanding the Horizons - A Multidisciplinary Conference**, 23 a 25 de outubro de 2004, New York/USA.
- Paiva KBS, Zambuzzi W F, Demarchi ACCO, Accorsi-Mendonça T, Zanelatto GN, Granjeiro JM. Expression of metalloproteinases-2 and -9 during amelogenesis . Trabalho apresentado na forma de pôster ao **3º International Symposium on Extracellular Matrix e 8º Simpósio Brasileiro sobre Matriz Extracelular (SIMEC)**, 27 a 30 de setembro de 2004, Angra dos Reis/RJ.
- Demarchi ACCO, Zambuzzi WF, Paiva KBS, Accorsi-Mendonça T, Souza AP, Sogayar MC, Granjeiro JM. Avaliação espaço-temporal da expressão das metaloproteinases 2 e 9 durante a palatogênese. Trabalho apresentado na forma de pôster a **XIX Reunião Anual da Federação de Sociedades Brasileiras de Experimentação (FeSBE)**, 25 a 28 de agosto de 2004, Águas de Lindóia/SP.
- Zanelatto GN, Zambuzzi WF, Paiva KBS, Demarchi ACCO, Accorsi-Mendonça T, Oliveira RC, Granjeiro JM. Expressão da gelatinase b e CD68 na resposta tecidual ao implante de osso inorgânico bovino. Trabalho apresentado na forma de pôster a **17º Jornada Odontológica de Bauru (JOB)**, 19 a 22 de maio de 2004, Bauru/SP.
- Paiva KBS, Zambuzzi WF, Accorsi-Mendonça T, Demarchi ACCO, Zanelatto GN, Lara VS, Granjeiro JM. Temporal and spatial analysis of gelatinases distribution during endochondral ossification in mice. Trabalho apresentado na forma de pôster

a **XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBQ)**, 17 a 22 de maio de 2004, Caxambú/MG.

- Zambuzzi WF, Oliveira LC, Paiva KBS, Cestari TM, Demarchi ACCO, Sogayar MC, Taga R, Granjeiro JM. The expression of gelatinases a (MMP-2, 72kda) and b (MMP-9, 92kda) during the alveolar bone repair. Trabalho apresentado na forma de pôster a **20º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica (SBPqO)**, 30 de agosto a 3 de setembro de 2003, Águas de Lindóia/SP.
- Takamori ER, Oliveira RC, Bassetto AP, Paiva KBS, Hoffmann ME, Buzalaf MAR, Taga R, Sogayar MC, Granjeiro JM. Cytotoxicity analysis of a fully processed bovine bone graft. Trabalho apresentado em forma de painel a **XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)**, 17 a 20 de maio de 2003, Caxambu/MG.
- Paiva KBS, Zambuzzi W, Accorsi-Mendonça T, Granjeiro JM. Imunohistoquímica: uma ferramenta para análises bioquímicas e clínicas. Trabalho apresentado oralmente e em forma de painel a **2º Jornada de Farmácia e Bioquímica da Universidade Paulista /Bauru,** 26 de setembro de 2002, Bauru/SP.
- Paiva KBS, Zambuzzi WF, Oliveira RC, Escolástico EC, Granjeiro JM. Biossegurança: precauções contra a contaminação no ambiente clínico odontológico. Trabalho apresentado na forma de painel, na seção de Ciências Biológicasa **XV Jornada Odontológica de Bauru (JOB) - Prof. Dr. Luiz Pegoraro**, 15 de maio de 2002, Bauru/SP.

- Paiva KBS, Menezes ML. Avaliação do emprego dos adsorventes: carvão ativo, chromosorb e membrana C18 na preparação de amostras de ar para a

determinação da d-aletrina. Trabalho apresentado na forma de pôster, na seção de Farmacologia, ao **XIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 23 de novembro 2001, Bauru/SP.

- Paiva KBS, Menezes ML. Desenvolvimento de um aparato para a geração de atmosfera padrão para a coleta de compostos voláteis. Trabalho apresentado oralmente e em forma de pôster, na seção de Química Analítica, ao **XIII Encontro Regional de Química da Sociedade Brasileira de Química (SBQ) e XXXI Semana de Química - UNESP/Araraquara**, 22 de novembro de 2001, Araraquara/SP.

Participação em Congressos e Eventos Científicos

- XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBQ) - Águas de Lindóia/SP - 01 a 04 de julho de 2006.
- Comparative Endocrinology of Calcium Regulation Workshop – Genebra/Suiça - 25 de junho de 2005.
- 2º Joint Meeting of the European Calcified Tissue Society (ECTS) and International Bone and Mineral Society (IBMS) - Genebra/Suiça - 25 a 29 de junho de 2005.
- III International Symposium on Extracellular Matrix e VIII Simpósio Brasileiro sobre Matriz Extracelular (SIMEC) - Angra dos Reis/RJ - 27 a 30 de setembro de 2004.
- III Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (COLAOB) - Campinas/SP - 27 a 30 de julho de 2004.

- InCell Analyzer - Sistema para análise celulares por imagens de alta resolução em tempo real, seminário realizado pela GE Healthcare Bio-Sciences, XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) - Caxambú/MG - 17 a 20 de maio de 2004.

- Workshop: Advanced proteomics solutions, realizado pela GE Healthcare Bio-Sciences, XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) - Caxambu/MG - 17 a 20 de maio de 2004.

- Ettan and You - Straight to results, seminário realizado pela GE Healthcare Bio-Sciences, XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) - Caxambu/MG - 17 a 20 de maio de 2004.

- Code Link - Gene Expression Studies Toll, Commited with results!, seminário realizado pela GE Healthcare Bio-Sciences, XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) - Caxambu/MG - 17 a 20 de maio de 2004.

- XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) - Caxambú/MG - 17 a 20 de maio de 2004.

- Curso & IV Simpósio Temático de “Terapias Celulares: Aspectos Básicos e resultados Clínicos” – Rio de Janeiro/RJ – 01 a 05 de setembro de 2003.
- Workshop "Post-Genomics Technologies", realizado pela Amersham Biosciences do Brasil, durante a XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) - Caxambu/MG. Ministrado em 18 de maio de 2003, com duração de 3 horas.

- XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) - Caxambú/MG - 17 a 20 de maio de 2003.
- Workshop “Engenharia de Tecidos: Mucosa Oral e Imunohistoquímica”, ministrado pela Profª. Drª. Christina Maeda Takyia (UFRJ), realizado na Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, no dia 12 de novembro de 2002.
- X Semana da Biologia – UNESP/Bauru – 04 a 08 de novembro de 2002.
- 2º Jornada de Farmácia e Bioquímica da Universidade Paulista/Bauru – 25 a 28 de setembro de 2002.
- Conferência Internacional: Estandarización y caracterización de una línea de hámster (*Mesocricetus auratus*) con convulsiones audiógenas como modelo animal de epilepsia refleja, palestra ministrada pela Profa. Dra. María Dolores Estilita López García (Professora Titular do Departamento de Biologia Celular e Patologia da Faculdade de Medicina, Universidade de Salamanca/Espanha e Pesquisadora do Instituto de Neuciências de Castilla y León), realizada no Salão Nobre da Faculdade de Medicina – UNESP/Botucatu - em 22 de agosto de 2002.
- Conferência Internacional: Células-Tronco na Regeneração Nervosa, ministrada pelo Prof. Dr. Stefano Geuna (Departamento de Ciências Biológicas – Universidade de Turin/Itália) realizada em 15 de agosto de 2002, Salão Nobre Faculdade de Odontologia de Bauru - USP/Bauru.
- XV Jornada Odontológica de Bauru – Prof. Dr. Luiz Pegoraro -USP/Bauru – 14 a 17 de maio de 2002.

- IX Semana da Biologia - UNESP/Bauru – 05 a 09 de novembro de 2001.

- XIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP – UNESP/Bauru – 22 a 25 de novembro de 2001.

- XII Encontro Regional de Química da Sociedade Brasileira de Química, XXXI Semana de Química e Workshop on Chemistry and Biochemistry of the Nitric Oxide – UNESP/Araraquara – 21 a 26 de outubro de 2001.

- 12º Encontro de Bió Encontro Nacional de°logos do CRBio-1 e 3 Biólogos do Cfbio – UFMS/Campo Grande - 9 à 12 de abril de 2001.

- VIII Semana da Biologia – UNESP/Bauru – 23 a 27 de outubro de 2000.

- IV CAEB – Congresso Aberto aos Estudantes de Biologia – UNICAMP/Campinas – 11 a 15 de novembro de 1999.

- VII Semana da Biologia – UNESP/Bauru – 08 à 12 de novembro de 1999.

Premiações

- **Honra ao Mérito** pela apresentação do trabalho "Avaliação Espaço-Temporal da Expressão das Metaloproteinases 2 e 9 Durante a Palatogênese" de autoria de *Demarchi, A. C. C. O., Zambuzzi, W. F., Paiva, K. B., Accorsi-Mendonça T; Souza, A. P., Sogayar, M. C., Granjeiro, J. M.* - na **XIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE)**, 25 a 28 de agosto de 2004, Águas de Lindóia/SP.

- **Honra ao Mérito** a *Paiva KBS; Zambuzzi WF; Oliveira, R.C.; Escolástico, E.C. e Granjeiro JM* na obtenção do 1º lugar, pela apresentação do trabalho: *Biossegurança: Precauções Contra a Contaminação no Ambiente Clínico Odontológico* – categoria graduação – na **XV Jornada Odontológica de Bauru – Prof. Dr. Luiz Pegoraro – USP/Bauru**, no dia 15 de maio de 2002.

- O trabalho *Desenvolvimento de um Aparato para a Geração de Atmosfera Padrão para a Coleta de Compostos Voláteis* apresentado por *Paiva KBS e Menezes, M.L* foi eleito como **melhor painel** apresentado na seção de Química Analítica, do dia 22 de outubro de 2001, realizado durante o **XIII Encontro Regional de Química da Sociedade Brasileira de Química, XXXI Semana de Química e Workshop on Chemistry and Biochemistry of the Nitric Oxide - UNESP/Araraquara.**

Orientações e Colaborações

- Colaboradora do **Trabalho de Conclusão de Curso** (2004) do aluno Gustavo Nalin Zanelatto, curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências, UNESP/Bauru, orientado pelo Prof. Dr. José Mauro Granjeiro e intitulado de *"Expressão das MMPs -2 e -9 durante a amelogênese em incisivos de camundongos"*.
- Colaboradora do aluno Willian Fernando Zambuzzi de **Iniciação Científica Fapesp** (proc. n. 02/03928-0) (2003), orientado pelo Prof. Dr. José Mauro Granjeiro, Faculdade de Odontologia de Bauru, USP e intitulado de *"Avaliação da expressão de MMPs 2 e 9 na organogênese de ossos longos de camundongos".*

Atividades Didáticas

Ensino Fundamental

- Mini-curso *"Educação Ambiental"* (8 horas) lecionado a turma da 6º série no Colégio Municipal Mercedes Bueno, Bauru.

Ensino Médio

- Aulas de *"Introdução á Ecologia"* para a turma do 1º ano (4 horas) e *"Poluição"* para a turma do 3º ano (4 horas). Ambos no Colégio Técnico Industrial (CTI) – UNESP/Bauru, no ano de 2001.

Ensino Superior

- Treinamento em *"Cultura Celular - Teoria e Prática"* (10 horas/semana) para a turma de pós-graduandos (mestrandos e doutorandos) em Biologia Oral, Endodontia e Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, nas dependências do Laboratório de Bioengenharia, Materiais e Mineralização Biológica (LBMM), do período de 03/2004 a 07/2004, supervisionado pelo Prof. Dr. José Mauro Granjeiro.

- Monitoria na disciplina de Bioquímica (4 horas/semana) para o curso de graduação em fonoaudiologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, nas dependências da Faculdade de Odontologia de Bauru, do período de 03/2004 a

07/2004, supervisionado pelo Prof. Dr. José Mauro Granjeiro e pela Profa. Dra. Marília A. R. Buzalaf.

Cursos e Mini-Cursos

- Curso *"Extracellular Matrix and Bone Regenaration"*, ministrado pelo Prof. Dr. José Mauro Granjeiro (Faculdade de Odontologia de Bauru - USP), durante o III International Sumposium on Extracellular Matrix e VIII Simpósio Brasileiro sobre Matriz Extracelular (SIMEC), com duração de 12 h, de 28 a 30 de setembro de 2004.

- 18º Curso *"Introdutório a Microscopia Eletrônica de Transmissão"*, ministrado pelo Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queirós - USP), com duração de 16h, de 5 a 9 junho de 2004.

- Curso *"Introdutório a Microscopia Eletrônica de Varredura"*, ministrado pelo Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queirós - USP), com duração de16h, de 2 a 12 de fevereiro de 2004.

- Mini-curso *"Biologia Molecular e Engenharia de Tecidos na Odontologia Clínica"*, ministrado pelo Prof. Dr. Jacques E. Nör (University of Michigan School of Dentistry), realizado pela Comissão de Pós Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, com duração de 8 horas, 15 de julho de 2003.

- Mini-curso *"Flying Proteins"*, realizado pela Amersham Biosciences do Brasil, durante a XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia

Molecular (SBBq) - Caxambú/MG. Ministrado em 19 de maio de 2003, com duração de 2 horas.

- Mini-curso *"Bioinformática"* ministrado pelo Prof. Dr. Aguinaldo Robinson Souza (UNESP/Bauru), com duração de 8 horas – UNESP/Bauru – 05 e 06 de novembro de 2002.

- Mini-curso *"Fundamentos em Etnobotânica"* ministrado pelo Prof. Dr. Ari Hidalvo de Freitas (UNESP/Rio Claro), com duração de 8 horas - UNESP/Bauru - 06 e 07 de novembro de 2001.

- Mini-curso *"Cromatografia Líquida de Alto Desempenho"* ministrado pela Dra. Deolinda I. Martins (Perkin Elmer), com duração de 6 horas - UNESP/Araraquara – 22 e 23 de outubro de 2001.

- Mini-curso *"Cromatografia"* ministrado pelo Prof. Dr. Mário Sérgio Galeani (UNESP/Bauru), com duração de 8 horas - UNESP/Bauru – 25 e 26 de outubro de 2000.

- Mini-curso *"Terapia Gênica"* ministrada pelos Profs. Drs. Armando Ventura e Sérgio Ulhoa Dani (Universidade de São Paulo), com duração de 6 horas – UNICAMP – 12 e 13 de novembro de 1999.

Idiomas

- Inglês: nível intermediário.

Curso realizado no Yázigi Internexus (Bauru/SP) e Cultura Inglesa (São Paulo/SP).

- Francês: nível avançado.

Curso realizado na Alliance Française (Bauru/SP) e na Université Claude Bernard (Lyon/França).

Resumos da Tese apresentados em Congressos Científicos

TEMPORAL AND SPATIAL ANALYSIS OF GELATINASES DISTRIBUTION DURING ENDOCHONDRAL OSSIFICATION IN MICE

Paiva, K.B.S.; Zambuzzi, W.F.; Accorsi-Mendonça, T.; Demarchi, A.C.C.O.; Zanelatto, G.N.; Lara, V.S.; and Granjeiro, J.M. Depto Ciências Biológicas - FOB/USP

Background: Constant remodeling of extracellular matrix is a hallmark during embryogenesis and tissue repair. Matrix metalloproteinases (MMP) play a key role in this process and in bone matrix degradation.

Objective: Analyze the spatial-temporal distribution of MMP-2 and -9 during endochondral ossification in mice. Methods: Femurs were collected from mouse fetuses at embryonic day (E) 13 through 20 and at 1 day postnatal (PN1). The tissues were fixed in 10% buffered formalin (pH 7.2), and embedded in paraffin wax. Sections (5 µm thickness) were stained with Massons Trichrome. Immunohistochemistry, using polyclonal antibodies against MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B), was performed using the StreptABComplex/HRP Duet kit, with biotinylated secondary antibody and a chromogenic substrate mixture. Sections were counterstained with Harris s haematoxylin. Results: At E13, both gelatinases (MMP-2 and -9) were identified in mesenchymal cells near hypertrophic chondrocytes, but only MMP-9 was also detected near the periosteum. Intense immunostaining of the hypertrophic cartilage was observed at E14 for MMP-2 and -9. At E15, the bone shape and the bone marrow were already clearly defined and both gelatinases was observed not only for the growth plate for osteoblasts, osteoclasts and hypertrophic chondrocytes. From E16 through E20, MMP-2 expression on the growth plate decreased in contrast to MMP-9, in contrast to MMP-9. On the other hand, periosteal osteoblasts expressed both gelatinases during lateral growth of membranous ossification.

MMP-2 was detected in both the proliferative and the resting zones. In later periods (PN1), immunostaining for MMP-2 and -9 clearly decreased, being present only at the proliferative zone and in hypertrophic chondrocytes. Conclusions: The involvement of MMP-2 and MMP-9 in osteogenesis is more far-reaching than merely vascular invasion. This work shows that gelatinases expression is strictly controlled both spatially and temporally during ossification. These enzymes actively participate in osteogenesis, mainly at the hypertrophic cartilage/osteoblasts interface.

Financial Support: FAPESP, CNPq, Capes, PRP-USP, FOB.

Trabalho apresentado na forma de pôster a **XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBQ)**, 17 a 22 de maio de 2004, Caxambú/MG.

EXPRESSION OF METALLOPROTEINASES-2 AND –9 DURING AMELOGENESIS.

KBS Paiva[1], WF Zambuzzi[2], GN Zanelatto[2], ACCO Demarchi[1], T Accorsi-Mendonça[2], MC Sogayar[3] and JM Granjeiro[2]. [1]Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas; [2]Faculdade de Odontologia de Bauru, USP; [3]Instituto de Química - USP, São Paulo-SP, Brasil.

Proteinases play important roles during dental enamel formation, namely: processing and degradation of enamel proteins. Matrix metalloproteinases (MMP), which are zinc-dependent endopeptidases, play a pivotal role in extracellular matrix (ECM) turnover. During embryogenesis and organogenesis MMP-2 and -9 are involved in physiological tissue remodeling events. Our goal is to evaluate the expression pattern of MMP-2 and -9 during amelogenesis in continuously growing incisor of rats. Hemi-mandibles (n=5) were collected from 50 days-old rats. Samples were fixed in 10% buffered formalin (pH 7.2), demineralized and embedded in paraffin. Sections (5 µm thickness) were stained with Masson's Trichrome. Immunohistochemistry, using polyclonal antibodies against MMP-2 and -9, was performed using the StreptABComplex/HRP Duet kit, with biotinylated secondary antibody and a chromogenic substrate mixture. The sections were counterstained with Harry's haematoxylin. Immunohistochemistry of demineralized material provided evidence for stronger MMP-2 staining in maturating ameloblastos than in secretory phase ones, in contrast to data reported by Goldberg [1]. Immunostaining for MMP-2 was also observed in odontoblasts, enamel organ, and in cells of the pappilary layer. MMP-9 was detected in secretory ameloblasts (Tomi's process), and odontoblasts. Our results support the notion that MMP-2 and -9 are differentially expressed during amelogenesis, playing an active role during ECM remodeling.

Supported by: FAPESP, CNPq, CAPES, PRP-USP and FOB.

References: [1] Goldberg M et al. (2003) Connect Tissue Res 44(3-4):143-53.

Keywords: metalloproteinase, extracellular matrix, amelogenesis.

Trabalho apresentado na forma de pôster ao **3º International Symposium on Extracellular Matrix e 8º Simpósio Brasileiro sobre Matriz Extracelular (SIMEC)**, 27 a 30 de setembro de 2004, Angra dos Reis/RJ.

EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEINASES 2 AND 9 AND RECK DURING AMELOGENESIS

K.B.S. Paiva[1], W.F. Zambuzzi[1], A.C.C.O. Demarchi[1], T. Accorsi-Mendonca[2], J.M. Granjeiro[3]

1 Department of Biochemistry, Biology Institute, State University of Campinas

2 Department of Endodontics, Bauru Dental School, University of Sao Paulo

3 Department of Molecular and Cellular Biology, Biology Institute, Fluminense Federal University

Proteinases play important roles during dental enamel formation, namely: processing and degradation of enamel proteins. Matrix metalloproteinases (MMP), which are zinc-dependent endopeptidases, play a pivotal role in extracellular matrix (ECM) turnover. Reck gene is widely expressed in normal human tissues, and is a membrane-anchored glycoprotein that regulate MMP activity. During embryogenesis and organogenesis MMP-2 and -9 are involved in physiological tissue remodeling events. Our goal is to evaluate the expression pattern of MMP-2, -9 and Reck during the secretory and maturation phases of amelogenesis in continuously growing incisor of rats. Hemi-mandibles (n=5) were collected from 50 days-old rats. Samples were fixed in 10% buffered formalin (pH 7.2), demineralized and embedded in paraffin wax. Sections (5 µm thickness) were stained with Masson's Trichrome. Immunohistochemistry, using polyclonal antibodies against MMP-2, -9 and Reck, was performed using the StreptABComplex/HRP duet kit, with biotinylated secondary antibody and a chromogenic substrate mixture. The sections were counterstained with Harris's haematoxylin. Immunohistochemistry of demineralized material provided evidence for stronger MMP-2 staining in enamel organ than in the cytoplasm of secretory ameloblasts, but diffuse immunostaining on ameloblasts at maturation stage. MMP-9 was detected in secretory ameloblasts (Tomes Process), in the

cytoplasm of ameloblasts at maturation stage, and enamel organ. Reck immunostaining was observed in the cytoplasm of odontoblasts, probably at Golgi complex, in maturation and secretory ameloblasts, odontoblasts, and enamel organ. Our results support the first evidence that MMP-2, -9 and Reck are differentially expressed during the phases of amelogenesis, playing an active role during ECM remodeling, and suggesting a regulation mechanism of Reck upon metalloproteinases activity.

Keywords: Reck, matrix metalloproteinases, extracellular matrix, amelogenesis.

Supported by: FAPESP, CNPq, CAPES, PRP-USP and FOB.

Trabalho apresentado na forma de pôster ao **Comparative Endocrinology of Calcium Regulation Workshop**, 25 de julho de 2005, Genebra/Suiça. ***Bone*** 36:S103-S479.

TEMPORAL AND SPATIAL MMP2, 9, TIMP1, 2, AND RECK PROTEIN LOCALIZATION DURING RAT INCISOR DEVELOPMENT.

*Accorsi-Mendonça, T.[1]; Paiva, K.B.S.[2]; Zambuzzi, W.F.[2]; Sogayar, M.C.[3]; Bleicher, F.[4]; Magloire, H.[4]; and Granjeiro, J.M.[5]. **1** Dept. of Endodontic, State University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil. **2** Depto of Biochemistry, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. **3** Laboratoire du Développement et Régénération des Tissues Dentaires, Faculté d'Odontologie de Lyon, Université Claude Bernard, Lyon, France. **4** Chemistry Institute , University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil. **5** Dept. of Molecular and Cellular Biology, Fluminense Federal University, Niteroi, RJ, Brazil.*

Our goal was to evaluate the expression pattern of MMPs and theirs inhibitors during amelogenesis in continuously growing rat incisors. Hemi-mandibles (n=5) were collected from 50 days-old rats. Samples were fixed in 10% buffered formalin, demineralized and embedded in paraffin wax. For immunohistochemistry (sections - 5 µm), we used polyclonal and biotinylated secondary antibodies, the StreptABComplex/HRP kit, and a chromogenic substrate mixture. At the secretory phase, MMPs and Reck were weakly immunostained in the infranuclear region of secretory ameloblasts (SA). MMP9 was also localized in stellate reticulum cells and diffuse Reck staining was found in SA´s cytoplasm. At the transition phase, staining for MMPs and Reck was more prominent in macrophages and/or in dendritics cells of the papillary layer and Reck was also immunopositive in the transition ameloblast. At early and late maturation phases, the profile found for MMPs and Reck was the same as the one found in the transition phase, but the immunostaining was less pronounced. The TIMPs were identified in maturation ameloblasts throughout the maturation phase, but were absent from the other cell types analyzed. We also observed that Reck and MMP9 were immuno-positive in the cytoplasm of odontoblasts, probably at the Golgi apparatus and/or the RER network. Our results suggest: 1) MMP2, 9, and Reck

are expressed by non-epithelial immunocompetents cells of the enamel organ; 2) Reck is expressed by ameloblasts and odontoblasts; 3) the MMPs, TIMPs, and Reck are differentially expressed during the different amelogenesis phases in rats, and are likely to play an active role during ECM remodeling.

Keywords: Reck, MMPs, TIMPs, Amelogenesis, Macrophages and Dendritic Cells.

Supported by: FAPESP, CNPq, CAPES, IFR, and INSERM.

Trabalho apresentado na forma de pôster a **XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBQ)**, 01 a 04 de julho de 2006, Águas de Lindóia/SP.

TEMPORAL AND SPATIAL MMP2, 9, TIMP1, 2, AND RECK LOCALIZATION DURING MOUSE ENDOCHONDRAL OSSIFICATION DEVELOPMENT.

*Paiva, K.B.S.[1]; Zambuzzi, W.F.[1]; Sogayar, M.C.[3]; Bleicher, F.[2]; Magloire, H.[2]; and Granjeiro, J.M.[4]. **1** Dept of Biochemistry, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil; **2** Institute of Chemistry, University of Sao Paulo, SP, Brazil; **3** Laboratoire du Développement et Régénération des Tissues Dentaires, Faculté d'Odontologie de Lyon, Université Claude Bernard, Lyon, France ; **4** Dept of Molecular and Cellular Biology, Fluminense Federal University, Niteroi, RJ, Brazil.*

Our objective was to analyse the spatial-temporal distribution of MMPs and theirs inhibitors, TIMP1, 2 and Reck, during mouse endochondral ossification. Femurs (n=5/period) were collected from foetuses (E13-E20) and 1 day postnatal (PN1) and processed to immunohistochemistry (IHQ) and gelatin zymography (GZ) analysis. For IHQ (sections - 5µm), we used polyclonal and biotinylated secondary antibodies, the StreptABComplex/HRP kit, a chromogenic substrate mixture. For GZ, the tissues were frozen at -80°C until the protein extraction and 10% SDS-PAGE containing 4% gelatin. During the chondrocyte differentiation phase (E13), the proliferative (PC) and prehyperthrophic (PHC) chondrocytes were immunopositives for the MMPs, Reck, and TIMPs. The hypertrophics chondrocytes (HC) on E14 showed stronger immunostaining for MMPs than Reck and TIMPs. At the early vascular and cellular invasion period (E15), MMPs were expressed by endothelial and mesenchymal cells (MC) localized in the inner layer of the perichondrium. PC and PHC were strongly immunoposite to Reck. No changes on TIMPs profile was observed on E15 and MC were strongly immunopositives for MMPs but weakly for TIMPs and Reck at the diaphysis. During the primary bone formation (E16) the HC and osteoblasts in the growth plate (GP) were immunopositives for MMPs, decreasing until PN1. However, the Reck and TIMPs immunostaining increased during the

same period. The GZ showed MMPs activities in all periods, being highest at E18. Our results support that Reck is expressed by osteogenic and chondrogenic cells and that MMP2, 9, TIMP1, 2, and Reck were differentially expressed during the endochondral ossification in mouse' femur, suggesting that they play an active role during ECM remodeling.

Keywords: Reck, MMPs, TIMPs, and Endochondral Ossification.

Financial Support: FAPESP, CNPq, Capes, INSERM, and IFR.

Trabalho apresentado na forma de pôster a **XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBQ)**, 01 a 04 de julho de 2006, Águas de Lindóia/SP.

GENE AND PROTEIN EXPRESSION OF MMPS, TIMPS, AND RECK DURING MOUSE CRANIOFACIAL DEVELOPMENT

*Paiva, K.B.S.[1]; Zambuzzi, W.F.[1]; Sogayar, M.C.[3]; Couble, M-C.[2]; Bleicher, F.[2]; Magloire, H.[2]; Granjeiro, J.M.[4]. **1** Department of Biochemistry, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil; **2** Institute of Chemistry, University of Sao Paulo, SP, Brazil; **3** Faculté d'Odontologie de Lyon, Université Claude Bernard, Lyon, France; **4** Department of Molecular and Cell Biology, Fluminense Federal University, Niteroi, RJ, Brazil.*

Our objective was to analyse the spatial-temporal distribution of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 and RECK, during mouse craniofacial development. Heads (n=5/period) were collected from foetuses (E13-E20) and 1 day postnatal (PN1) and processed to immunohistochemistry and *in situ* hybridization. During mandible and maxillae intramembranous ossification, osteoblasts were immunostained for MMPs (early stage), TIMPs (late stage) and RECK. In Meckel cartilage degradation, MMPs, RECK and TIMPs mRNA and protein were found in perichondrial cells. During odontogenesis, RECK was immunostained in migrating epithelial cells in bud stage, enamel inner epithelial cells in cap stage, and in ameloblasts and odontoblasts in bell stage. RECK mRNA was found difuse in all tooth germ in cap stage, more localizated in primary enamel knout in early bell stage, and in ameloblasts and odontoblasts in late bell stage. The alveolar bone was immunolabelled in all periods. Our results support that RECK is expressed by odontogenic, osteogenic and chondrogenic cells and MMPs, TIMPs, and RECK were differentially expressed during the mouse intramembranous ossification and odontogenesis, suggesting that they may play an active role in ECM remodeling control.

Keywords: MMP, TIMP, RECK, Intramembranous Ossification, Odontogenesis and Meckel Cartilage.

Financial Support: FAPESP, CNPq, CAPES, INSERM and IFR.

Trabalho apresentado na forma de pôster a **XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBQ)**, 21 a 25 de maio de 2007, Salvador/BA.

GENE TRANSCRIPTION AND TRANSLATION OF MMPS, TIMPS, AND RECK DURING MOUSE ENDOCHONDRAL OSSIFICATION

*Paiva, K.B.S.[1]; Zambuzzi, W.F.[1]; Couble M-L.[2], Bleicher, F.[2]; Magloire, H.[2]; Sogayar, M.C.[3]; Granjeiro, J.M.[4] **1** Dept Biochemistry, UNICAMP, Campinas, Brazil; **2** Institute of Chemistry, USP, Brazil; **3** Faculté d'Odontologie de Lyon, UCB, Lyon, France; **4** Dept Molecular and Cell Biology, UFF, Niteroi, Brazil.*

Our objective was to analyse the spatial-temporal distribution of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 and RECK, during mouse endochondral ossification. Femurs (n=5/period) were collected from foetuses and newborn and processed for immunohistochemistry, gelatin zymography, *in situ* hybridization and real-time PCR analysis. Chondrocytes were immunopositive for MMPs, RECK, and TIMPs during chondrocyte differentiation (E13). At the cartilaginous template (E14), the hypertrophic chondrocytes (HC) were immunostained for MMPs and RECK. RECK and TIMPs immunopositive cells were found in the perichondrium. At the vascular and cellular invasion (E15), MMPs, RECK and TIMPs were expressed by migrating cells from bone collar as well as by osteoclasts/chondroclasts close to the transverse septum. HC remained immunostained. From E16 to PN1, MMPs, TIMPs, and RECK were expressed by osteoblasts and HC in the growth plate and by cells in the perichondrium and periosteum. Zymographic analysis showed that MMPs were active during all periods, being highest at E19. The RECK mRNA pattern was similar to immunohistochemistry, detected during all periods, being highest at E20. Our results support that RECK is expressed by osteogenic and chondrogenic cells and that MMPs, TIMPs, and RECK are differentially expressed during mouse endochondral ossification.

Keywords: MMP, TIMP, RECK, and Endochondral Ossification.

Financial Support: FAPESP, CNPq, CAPES,FINEP, INSERM and IFR.

Trabalho apresentado na forma de pôster a **XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBQ)**, 21 a 25 de maio de 2007, Salvador/BA.