



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Natália Guimarães Kalatzis Sousa

**Cinética de expressão e localização do indutor de
metaloproteinases (EMMPRIN) durante o desenvolvimento de
lesão periapical induzida em camundongos**

Araraquara
2013



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Natália Guimarães Kalatzis Sousa

**Cinética de expressão e localização do indutor de
metaloproteinases (EMMPRIN) durante o desenvolvimento de
lesão periapical induzida em camundongos**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Faria

Araraquara
2013

Kalatzis Sousa, Natália Guimarães

Cinética de expressão e localização do indutor de metaloproteinases (EMMPRIN) durante o desenvolvimento de lesão periapical induzida em camundongos / Natália Guimarães Kalatzis Sousa.-- Araraquara: [s.n.], 2013.

66 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra Gisele Faria

1. Endodontia 2. Metaloproteinase 1 da matriz 3. Metaloproteinase
2 da matriz 4. Metaloproteinase 9 da matriz I. Título

NATÁLIA GUIMARÃES KALATZIS SOUSA

**CINÉTICA DE EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO DO INDUTOR DE
METALOPROTEINASES (EMMPRIN) DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE
LESÃO PERIAPICAL INDUZIDA EM CAMUNDONGOS**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Gisele Faria

2º Examinador: Prof. Dr. Marcos A. Rossi

3º Examinador: Prof Dr. Mário Tanomaru-Filho

Araraquara, 07 de março de 2013

Dados Curriculares

Natália Guimarães Kalatzis Sousa

NASCIMENTO: 27 de setembro de 1985, Brasília, Distrito Federal, Brasil

FILIAÇÃO: Jose Elias Palmeira de Sousa
Dimitra F. Kalatzis Sousa

2003 - 2007: Curso de Graduação em Odontologia
Universidade Católica de Brasília - UCB

2008 - 2010: Especialização em Endodontia
Universidade Católica de Brasília - UCB

2011 - 2013: Mestrado em Endodontia
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Dedico este trabalho

A **Deus** minha força, inspiração, alegria, esperança e razão do meu viver.

Aos meus pais e irmão pelo amor incondicional e apoio irrestrito.

Agradecimentos

Primeiramente a **Deus** por sua presença constante em minha vida, me abençoando, fortalecendo e capacitando.

Aos meus pais **José Elias Palmeira de Sousa** e **Dímitra F. Kalatzis Sousa** que com amor e dedicação sempre me apoiaram e incentivaram na concretização dos meus sonhos e objetivos.

Ao meu irmão **Guilherme Elias G. Kalatzis Sousa** pelo carinho, paciência e exemplo de determinação.

À minha orientadora **Profa. Dra. Gisele Faria** pela competência, determinação, dedicação e apoio constante.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do atual reitor **Dr. Júlio Cezar Durigan** e vice-reitora **Dra. Marilza Vieira Cunha Rudge**.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, na pessoa da atual diretora **Profa. Dra. Andréia Affonso Barreto Montandon** e da vice-diretora **Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato**.

Ao Coordenador do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista na pessoa do **Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho**, pela disponibilidade e colaboração.

Aos professores da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista **Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Vilella Berbert**, **Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho**, **Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru**, **Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho**, **Prof. Dr. Milton Carlos Kuga** e **Prof. Dr. Renato Toledo Leonardo**, pelo incentivo, experiência, auxílio e ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. Marcos Antonio Rossi** do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, por permitir o uso do laboratório de Cardiologia Celular e Molecular para realização dos experimentos.

Ao **Prof. Dr. João Santana da Silva** do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, por permitir o uso do laboratório de Imunoparasitologia para realização das reações de RT-PCR em tempo real.

Aos amigos e colegas de turma do curso de Mestrado **Camila Almeida Nascimento** e **Matheus Franco da Frota**, pelos momentos inesquecíveis, por todo apoio, companheirismo e amizade.

Aos alunos do Programa de Pós-graduação em Odontologia – área Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista **Adinael Trindade Junior**, **Ana Carolina Vencção**, **Camila Galetti Espir**, **Kátia Cristina Keine**, **Elisandra Márcia Rodrigues**, **Letícia Boldrin Mestieri**, **Mirian Grazielle Magro**, **Tiago Silva da Fonseca**, **Adriana Simionatto Guinesi**, **Alana Priscila Souza Aguiar**, **Ana Livia Gomes Cornélio** e **Paula Aparecida Nakazone**, **Raqueli Viapiana**, pelos momentos compartilhados e pela convivência agradável.

Aos pós-graduandos do programa de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo **Ana Caroline Silva de Freitas**, **Cibele Maria Prado**, **Érica Carolina Campos**, **Lygia Maria Mouri Malvestio**, **Mara Rúbia Nunes Celes**, **Patrícia Mara Ferezin** e **Valdecir Blefari**, por compartilharem experiências, conhecimentos e pelo convívio agradável.

Às amigas do Programa de Pós-graduação em Odontologia **Ariele Patrícia Rabello** e **Gisselle Moraima Chávez Andrade** e **Roberta Bosso**, pelo apoio, carinho e amizade.

Às minhas amigas do curso de especialização em Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Católica de Brasília **Luciana Aires Barbosa**, **Maria Arisleda Canuto Costa**, **Marília de Cassia Rodrigues**, **Norma Celeste Bandeira Braga** e **Valéria Moraes de Paiva**, pelo carinho, apoio e amizade.

À aluna da Genética **Amanda Freire de Assis**, pela atenção, presteza e contribuição durante o processo de desenho dos *primers*.

Ao aluno do Curso de Ciências Odontológicas Aplicadas na área de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo **Ronald Ordinola**

Zapata, pela atenção prestada e orientação na análise das microtomografias computadorizadas.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista **José Alexandre Garcia, Mara Cândida Munhoz do Amaral e Sérgio Luiz Gusmão Gimenes Romero**, pela dedicação e ampla disponibilidade.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista **Marinho, Vanderlei, Creuza, Conceição, Cida e Priscila**, pelo carinho e atenção.

À funcionária do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo **Cristiane Maria Milanezi**, pela assistência e atenção.

Às funcionárias do laboratório de Cardiologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo **Ligia Grecco Valeriano Baroza Santoro, Monica Azevedo de Abreu e Maria Elena Riul**, pela paciência, atenção, empenho e assistência.

Aos funcionários do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo **Ana Carolina Lourenço Vloni e Carlos Henrique de Carvalho Ribeiro**, pela prontidão e disponibilidade durante o período de pesquisa e pelo cuidado e atenção com os animais.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudos.

À equipe da empresa Clic Foto e Vídeo de Ribeirão Preto/SP pela habilidade e eficiência na montagem das “pranchas” de imagens.

A pessoa sábia está sempre ansiosa e pronta para aprender...

...Quem procura ter sabedoria ama a sua vida, e quem age com inteligência encontra a felicidade.

Provérbios 18.15 e 19.8

*Este trabalho foi estruturado de acordo com o Guia de Normalização de Trabalhos Acadêmicos da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara e seguiu o **FORMATO ALTERNATIVO** que consiste dos itens: introdução geral (trata-se de uma introdução com revisão de literatura), proposição, capítulos (escrito em formato de artigo) e considerações finais ou conclusão*

Kalatzis Sousa NG. Cinética de expressão e localização do indutor de metaloproteinases (EMMPRIN) durante o desenvolvimento de lesão periapical experimentalmente induzida em camundongos. [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

Resumo

Neste estudo foi avaliada a cinética de expressão, a localização do EMMPRIN e a correlação de sua expressão com a expressão das MMPs -1, -2 e -9 e com a perda óssea alveolar, durante o desenvolvimento da lesão periapical experimentalmente induzida em camundongos. Foram utilizados 40 camundongos wild-type (WT) da linhagem C57BL/6. As lesões periapicais foram induzidas nos 1^{os} molares inferiores e após os períodos experimentais de 7, 14, 21 e 42 dias, os animais foram mortos e as mandíbulas foram removidas. Como controles foram usados 1^{os} molares hígidos. A mensuração das lesões periapicais foi efetuada em microtomografia computadorizada. A expressão do RNA mensageiro (mRNA) do EMMPRIN, MMPs -1, -2, e -9 foi determinada por meio de RT-PCR em tempo real. A presença, a localização e a expressão do EMMPRIN e das MMPs nas lesões periapicais foram avaliadas por imunohistoquímica. Os dados foram analisados por meio dos testes ANOVA, Bonferroni e correlação de Spearman com nível de significância de 5%. Os resultados mostraram que a área da lesão periapical aumentou significativamente dos 7 para os 14 dias (83%) e a partir de então houve estabilização. No grupo controle, o EMMPRIN foi expresso fortemente nas células da camada odontoblástica da polpa dentária. Nos períodos de 7, 14, 21 e 42 dias, foram observadas imunomarcações intensas para o EMMPRIN, MMPs -1, -2 e -9 na região adjacente ao forame apical, onde havia infiltrado inflamatório denso e ocasionalmente em outras regiões da lesão periapical. O EMMPRIN, MMP-1, -2 e -9 apresentaram forte expressão em células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares e marcação discreta em fibroblastos. A imunoexpressão do EMMPRIN na região periapical foi maior nos períodos de 7, 14, 21 e 42 dias comparado ao controle. A expressão do gene EMMPRIN apresentou-se maior no grupo controle em relação aos 7, 14, 21 e 42 dias. A expressão do gene MMP-1 aumentou aos 7 dias e manteve-se elevada até os 42 dias. Os níveis de mRNA das MMP -2 e -9 aumentaram significativamente aos 14 dias e retornaram a níveis semelhantes ao controle em 21 dias. A imunoexpressão do EMMPRIN apresentou correlação positiva com a expressão dos genes MMP-1, -2 e -9 e com o aumento da área da lesão periapical. Concluiu-se que, na lesão periapical, o EMMPRIN é expresso por fibroblastos e principalmente pelo infiltrado inflamatório localizado próximo ao forame apical e em regiões adjacentes a esse infiltrado. A sua imunoexpressão é elevada e se correlaciona positivamente com a expressão dos genes MMPs -1, -2, e 9 e com a perda óssea alveolar.

Palavras-chave*: Endodontia, Metaloproteinase 1 da matriz, Metaloproteinase 2 da matriz, Metaloproteinase 9 da matriz.

* Conforme Descritores em Ciências da Saúde - DeCS (Bireme)

Kalatzis Sousa NG. Kinetics of expression and location of metalloproteinase inducer (EMMPRIN) during the development of periapical lesions induced experimentally in mice [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

Abstract

This study evaluated the kinetics of expression and location of EMMPRIN and the correlation of its expression with expression of MMPs -1, -2 and -9 and with alveolar bone loss during the development of experimentally induced periapical lesions in mice. A total of 40 C57BL/6 wild-type mice (WT) were used. The periapical lesions were induced in first lower molars. After 7, 14, 21 and 42 days, the animals were killed and the mandibles were removed. Mice without pulp exposure served as controls. Measurement of periapical lesions was performed in micro-computed tomography. mRNA levels of EMMPRIN, MMPs-1, -2, and -9 were detected by real time RT-PCR. Presence, localization, and expression of EMMPRIN and MMPs were evaluated by immunohistochemistry. Data were analyzed using ANOVA, Bonferroni and Spearman correlation tests with significance level of 5%. The results showed that periapical lesion area was significantly increased from 7 to 14 days (83%) and thereafter become stable. In the control group, EMMPRIN was strongly expressed in odontoblastic layer of the dental pulp. At 7, 14, 21 and 42 days there was intense immunostaining for EMMPRIN, MMPs -1, -2 and -9 in the adjacent region of apical foramen, where there was dense inflammatory infiltrate. These proteins were expressed in other parts of the periapical lesion occasionally. EMMPRIN, MMP-1, -2 and -9 were intensely expressed in mononuclear and polymorphonuclear inflammatory cells and discretely expressed in fibroblasts. In the periapical region, the EMMPRIN immunostaining was higher at 7, 14, 21 and 42 days compared with control. The expression of EMMPRIN gene was higher in control group compared with 7, 14, 21 and 42 days. The expression of MMP-1 gene increased at 7 days and stays elevated until 42 days. The mRNA levels of MMP -2 and -9 increased significantly at 14 days and returned to control level at 21 and 42 days. The EMMPRIN immunostaining was positively correlated with expression of MMP-1, -2 and -9 genes and with increasing of periapical lesion area. It was concluded that EMMPRIN is expressed by fibroblasts and mainly by inflammatory infiltrate localization near of apical foramen and adjacent regions of this infiltrate in periapical lesion. The EMMPRIN immunostaining is elevated and correlates positively with the expression of MMPs-1, -2 and 9 genes and with alveolar bone loss during development of periapical lesions.

Keywords*: Endodontics, matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, matrix metalloproteinase 9.

Sumário

1 Introdução geral	14
2 Proposição	21
3 Capítulo	23
3.1 Resumo	24
3.2 Introdução	25
3.3 Material e métodos	27
3.4 Resultados	36
3.5 Discussão	46
3.6 Referências	49
4 Considerações finais	55
Referências	56

1 Introdução geral

1 Introdução Geral

A lesão periapical é causada pela infecção do sistema de canais radiculares (Riccuci, Siqueira⁵¹, 2010) e representa uma resposta do hospedeiro que envolve o recrutamento de células inflamatórias, geração de citocinas, de enzimas líticas e ativação de osteoclastos, o que leva à destruição dos tecidos duros e moles periapicais (Stashenko et al.⁵⁵⁻⁵⁶, 1994, 1998; Graves et al.²⁷, 2011).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) formam uma importante família de enzimas (endopeptidases) zinco-dependentes que são consideradas as mais importantes enzimas responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC). As MMPs degradam as macromoléculas da matriz, incluindo o colágeno, fibronectina, laminina, proteoglicans, entre outras (Woessner, Nagase⁶⁴, 2000).

Atualmente sabe-se que mais de 23 tipos diferentes de MMPs humanas foram identificadas (Visse, Nagase⁶⁰, 2003). As MMPs são encontradas, ancoradas à superfície celular ou secretadas e podem ser divididas em 6 grupos, de acordo com a especificidade do substrato. São elas: colagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas, MMPs de membrana, e outras como as metaloelastases, que não são classificadas nas categorias acima. As MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18 são classificadas como colagenases, sendo que a característica principal dessas enzimas encontra-se na sua capacidade de clivar colágeno tipo I, II e III (Visse, Nagase⁶⁰, 2003). Os colágenos do I e III representam os principais constituintes do osso alveolar e ligamento periodontal (Nanci, Bosshardt⁴⁷, 2006; Shapiro⁵², 2008). A MMP-2 e a MMP-9 são classificadas como gelatinases e degradam colágeno desnaturado, gelatinas (Allan et al.¹, 1995), colágeno tipo IV e V. A MMP-2 degrada também os colágeno tipo VII, X, XI e a MMP-9, o colágeno tipo III (Bauvois², 2012).

As MMPs estão em constante presença no tecido humano em pequena quantidade, porém quando ocorre uma inflamação, reparo tecidual ou câncer, elas apresentam aumento do

seu nível no local afetado (Birkedal-Hansen⁶, 1993; Coussens et al.¹⁵, 2002). As MMPs são produzidas por leucócitos polimorfonucleares, queratinócitos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e células mesenquimais que invadem os tecidos durante os eventos de remodelação in vivo (Martins et al.⁴², 2013). Essas células são capazes de responder a fatores de crescimento e citocinas, incluindo a IL-1, TNF- α , liberando as MMPs (Birkedal-Hansen⁶, 1993).

Essas enzimas ocupam um papel central em muitas condições fisiológicas como embriogênese, remodelamento tecidual e angiogênese, e em condições inflamatórias como artrite reumatóide, osteoartrite (Visse, Nagase⁶⁰, 2003), inflamação pulpar (Gusman et al.²⁹, 2002; Tsai et al.⁵⁸, 2005) doença periodontal (Dong et al.²¹, 2009; Liu et al.³⁷⁻³⁸, 2010) e lesão periapical (Corotti et al.¹⁴, 2009; Carneiro et al.¹², 2009; Matsui et al.⁴³, 2011; Dezerega et al.¹⁹, 2012).

Estudos têm mostrado que as MMPs apresentam um papel importante na patogênese da lesão periapical (Lin et al.³⁶, 2002; Shin et al.⁵³, 2002; Buzoglu et al.¹⁰, 2009; Corotti et al.¹⁴, 2009; Tsuji et al.⁵⁹, 2009; Matsui et al.⁴³, 2011; Menezes-Silva et al.⁴⁴, 2012), estando envolvidas na degradação da MEC (Corotti et al.¹⁴, 2009). Além disso, tem sido sugerido que a modalidade de tratamento endodôntico poderia interferir na expressão das MMPs (Paula-Silva et al.⁵⁰, 2010; Shin et al.⁵⁴, 2011) e que níveis elevados destas enzimas estão correlacionados com a ausência de reparação (Liu et al.³⁹, 2009; Paula-Silva et al.⁵⁰, 2010). Paula-Silva et al.⁵⁰ (2010) mostraram em dentes de cães com lesão periapical que os níveis de MMPs -1, -2, -8, -9 foram menores nos dentes tratados com hidróxido de cálcio em comparação aos dentes tratados em sessão única. Os dentes que não receberam tratamento apresentaram a maior expressão das MMPs.

A MMP-1, considerada uma enzima chave na iniciação da reabsorção óssea (Birkedal-Hansen⁵, 1993), apresenta expressão pronunciada em macrófagos e osteoblastos

que aumenta consistentemente conforme a expansão da lesão periapical em ratos (Lin et al.³⁶, 2002). Além disso, ela apresenta um papel importante na expansão de cistos radiculares. Marcação positiva para MMP-1 foi detectada na linha epitelial e subepitelial em fibroblastos, macrófagos, células endoteliais e osteoblastos/osteócitos, sendo que a marcação mais forte foi observada nas áreas subepiteliais com inflamação proeminente de cistos radiculares de dentes de humanos (Lin et al.³⁵, 1997).

Durante o desenvolvimento de lesões periapicais em ratos, as MMP-2 e MMP-9 apresentam expressão aumentada nos períodos de 7, 14 e 21 dias, estando provavelmente envolvidas na degradação da matriz extracelular na fase inicial do desenvolvimento de lesões periapicais (Corotti et al.¹⁴, 2009). As MMP-2 e -9 também são detectadas no exsudato intracanal de dentes com abscessos periapicais agudos. Entretanto, em abscessos periapicais crônicos somente a MMP-9 foi detectada (Buzoglu et al.¹⁰, 2009). A MMP-2 e MMP-9 também são expressas em granulomas e cistos periapicais (Carneiro et al.¹², 2009; de Paula-Silva et al.¹⁶, 2009; Dezerega et al.¹⁹, 2012) e estão presentes, em níveis aumentados, no fluido gengival crevicular de dentes com lesões periapicais crônicas (Belmar et al.⁴, 2008; Dezerega et al.¹⁷, 2012).

Níveis elevados de MMP no fluido intracanal e no fluido crevicular gengival de dentes com necrose pulpar apresentaram redução expressiva após o tratamento endodôntico, sugerindo que a análise de MMPs nestes fluidos poderia ser usada para monitorar o sucesso do tratamento de canal radicular de dentes com lesão periapical (Wahlgren et al.⁶¹, 2002; Shin et al.⁵⁴, 2011). De acordo com Dezerega et al.¹⁷ (2012) esse tipo de análise poderia constituir em uma ferramenta de diagnóstico para avaliação do sucesso do tratamento endodôntico, uma vez que apenas a avaliação clínico-radiográfica não é eficaz e a avaliação histológica é impraticável em humanos.

Outras MMPs, como MMP-8, MMP-13 (Matsui et al.⁴³, 2011), MMP-7, MMP-10 e MMP-24 (de Paula-Silva et al.¹⁶, 2009), também têm sido detectadas em lesões periapicais.

Além da produção de MMPs estar sob o controle de vários mecanismos regulatórios, como os inibidores teciduais de MMPs (TIMPs: tissue inhibitor of metalloproteinase) (Birkedal-Hansen⁵, 1993), citocinas e fatores de crescimento (Birkedal-Hansen et al.⁷, 1993; Beklen et al.³, 2007), ela também é regulada pelo indutor de metaloproteinase da matriz (EMMPRIN) (Biswas et al.⁸, 1995; Cao et al.¹¹, 2007; Donadio et al.²⁰, 2008; Omi et al.⁴⁹, 2012).

O EMMPRIN, também conhecido como CD147 ou basigina, é uma glicoproteína, membro da família de imunoglobulinas, ligada à membrana altamente glicosilada (Biswas et al.⁸, 1995). Foi identificado originalmente na superfície de células tumorais, e sua expressão pode induzir a progressão e invasão do tumor pelo aumento da produção e da liberação de MMPs por fibroblastos e células endoteliais (Nabeshima et al.⁴⁶, 2006; Muramatsu et al.⁴⁵, 2003).

O EMMPRIN pode estimular a produção de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-14, MMP-15, entre outras (Nabeshima et al.⁴⁶, 2006; Cao et al.¹¹, 2007; Donadio et al.²⁰, 2008; Braundmeier et al.⁹, 2012; Grass et al.²⁶, 2012; Omi et al.⁴⁹, 2012; Yang et al.⁶⁵, 2012). No entanto, não apresenta efeito nos TIMPs (Guo et al.²⁸, 1997). Desta forma, o EMMPRIN, como um indutor de MMPs, participa da degradação dos componentes da matriz extracelular (Kataoka et al.³³, 1993; Gabison et al.²⁵, 2005) e consequentemente do processo de reabsorção óssea (Liu et al.³⁸, 2010; Wang et al.⁶², 2011).

Ele está presente em uma ampla variedade de tecidos e é expresso por várias células normais, inflamatórias e neoplásicas (Kasinrerk et al.³², 1992; Biswas et al.⁸, 1995; Decastro et al.¹⁷, 1996; Marmorstein et al.⁴¹, 1998; Major et al.⁴⁰, 2002; Noguchi et al.⁴⁸, 2003). A habilidade do EMMPRIN em estimular a produção de MMPs sugere que esta

molécula pode ser responsável por vários processos teciduais fisiológicos e patológicos (Guo et al.²⁸, 1997; Major et al.⁴⁰, 2002; Noguchi et al.⁴⁸, 2003; Gabison et al.²⁵, 2005; Jouneau et al.³⁰, 2011; Kanyenda et al.³¹, 2011; Wang et al.⁶³, 2012). Entretanto, a produção aumentada do EMMPRIN ocorre especialmente em tumores, artrite reumatoide, inflamação dos olhos e dos pulmões, doença de Alzheimer e em periodontite (Decastro et al.¹⁷, 1996; Konttinen et al.³⁴, 2000; Emingil et al.²³, 2006; Cao et al.¹¹, 2007; Emingil et al.²², 2008; Dong et al.²¹, 2009; Liu et al.³⁷⁻³⁸, 2010; Feldman et al.²⁴, 2011; Jouneau et al.³⁰, 2011; Kanyenda et al.³¹, 2011; Wang et al.⁶³, 2012; Yang et al.⁶⁵, 2012)

O EMMPRIN está envolvido na patogênese da doença periodontal (Emingil et al.²²⁻²³, 2006, 2008; Dong et al.²¹, 2009; Liu et al.³⁸, 2010; Feldman et al.²⁴, 2011) sendo encontrado em níveis elevados nos tecidos periodontais inflamados (Dong et al.²¹, 2009; Liu et al.³⁷⁻³⁸, 2010) e no fluido gengival crevicular (Emingil et al.²²⁻²³, 2006, 2008) de dentes com periodontite.

A expressão do EMMPRIN na doença periodontal é inflamação-dependente (Liu et al.³⁸, 2010) e se correlaciona positivamente com a expressão de MMP-1 e MMP-2 (Dong et al.²¹, 2009) e com a perda de osso alveolar e degradação do colágeno da região interdental durante a periodontite experimental em ratos (Liu et al.³⁸, 2010). Os níveis de EMMPRIN no fluido crevicular também se correlacionam positivamente com a gravidade da doença periodontal; há maior nível de EMMPRIN na periodontite agressiva generalizada e na periodontite crônica do que nos casos de gengivite e de indivíduos sem a doença, indicando sua participação na regulação da progressão da doença periodontal (Emingil et al.²³, 2006).

Níveis elevados de EMMPRIN no fluido crevicular de indivíduos com periodontite crônica apresentaram redução após raspagem e alisamento radicular associado com o uso oral de doxiciclina, sugerindo que a análise do EMMPRIN neste fluido poderia ser

usada como parâmetro adicional para monitorar o sucesso do tratamento periodontal (Emingil et al.²², 2008).

No entanto, a presença do EMMPRIN, sua expressão e sua correlação com a expressão das MMPs e com a destruição tecidual na lesão periapical ainda são desconhecidos. Dessa forma, um estudo detalhado da cinética da expressão do EMMPRIN durante o desenvolvimento da lesão é importante para o entendimento do seu papel na patogênese da lesão periapical.

2 Proposição

2 Proposição

O objetivo deste estudo foi avaliar a cinética de expressão, a localização do EMMPRIN e a correlação de sua expressão com a expressão das MMPs -1, -2 e -9 e com a perda óssea alveolar, durante o desenvolvimento da lesão periapical experimentalmente induzida em camundongos.

**Associação do indutor de metaloproteinases (EMMPRIN) com a expressão
de metaloproteinases -1, -2 e -9 e perda óssea alveolar durante o
desenvolvimento da lesão periapical ***

3 Capítulo

*Este capítulo está escrito na forma de artigo que será submetido para avaliação no periódico *Archives of Oral Biology*.

3.1 Resumo

Objetivo: Avaliar a localização, a cinética de expressão do EMMPRIN e a correlação de sua expressão com a expressão das MMPs -1, -2 e -9 e com a perda óssea alveolar durante o desenvolvimento da lesão periapical induzida em camundongos.

Métodos: Lesões periapicais foram induzidas em primeiros molares inferiores de camundongos e após os períodos de 7, 14, 21 e 42 dias os animais foram mortos e as mandíbulas removidas. A mensuração das lesões periapicais foi efetuada em microtomografia computadorizada. As expressões de RNA mensageiro do EMMPRIN, MMPs -1, -2, e -9 foram determinadas por meio de RT-PCR em tempo real. A presença, a localização e a expressão do EMMPRIN e das MMPs foram avaliadas por imunohistoquímica.

Resultados: A lesão periapical aumentou significativamente dos 7 para os 14 dias e se estabilizou. No grupo controle, o EMMPRIN foi expresso fortemente nas células da camada odontoblástica da polpa dentária e ocasionalmente em fibroblastos do ligamento periodontal. Nos períodos de 7, 14, 21 e 42 dias, foram observadas imunexpressão intensas para o EMMPRIN, MMPs -1, -2 e -9 na região adjacente ao forame apical, e ocasionalmente em outras regiões da lesão periapical. A imunexpressão do EMMPRIN na região periapical foi maior nos períodos de 7, 14, 21 e 42 dias comparado ao controle. A expressão do gene EMMPRIN apresentou-se maior no grupo controle em relação aos 7, 14, 21 e 42 dias. Houve correlação positiva da imunexpressão do EMMPRIN com a expressão dos genes MMP-1, -2 e -9 e com o aumento da lesão periapical.

Conclusão: Na lesão periapical o EMMPRIN é expresso por fibroblastos e principalmente pelo infiltrado inflamatório próximo ao forame apical; sua imunexpressão é elevada e se correlaciona positivamente com a expressão dos genes MMPs -1, -2, e 9 e com a perda óssea alveolar durante o desenvolvimento da lesão periapical.

Palavras-chave: Endodontia, Lesão periapical, Metaloproteinases, CD147.

3.2 Introdução

Lesão periapical é causada pela interação dos fatores microbianos e de defesa do hospedeiro na interface entre o canal radicular e o ligamento periodontal (Nair¹, 2004). Essa interação resulta na geração de citocinas e de enzimas líticas, no recrutamento de células inflamatórias e na ativação de osteoclastos (Stashenko et al.²⁻³, 1994, 1998) provocando uma inflamação local e destruição de tecidos mineralizados e não mineralizados periapicais (Nair¹, 2004), incluindo colágeno e outros componentes da matriz extracelular (Hannas et al.⁴, 2007).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas (endopeptidases) zinco-dependentes, principais responsáveis pela degradação das macromoléculas da matriz extracelular (Verma, Hansch⁵, 2007). Atualmente são conhecidas mais de 23 tipos de MMPs que são divididas em seis grupos: collagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, MMPs de membrana, e outras (Visse, Nagase⁶, 2003).

Vários membros da família de MMPs, incluindo MMP-1, -2, -3, -8, -9 e -13, estão envolvidos na patogênese da lesão periapical (Corotti et al.⁷, 2009; Paula-Silva et al.⁸, 2011; Matsui et al.⁹, 2011; Menezes-Silva et al.¹⁰, 2012).

A MMP-1 tem sido considerada uma enzima chave na iniciação da reabsorção óssea (Sasaki et al.¹¹, 2007). As MMP-2 e -9 estão envolvidas na degradação da matriz extracelular principalmente nas fases ativa do desenvolvimento de lesões periapicais (Corotti et al.⁷, 2009).

A produção das MMPs é regulada por citocinas, fatores de crescimento (Verma, Hansch⁵, 2007), inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) (Ertugrul, et al.¹², 2013), bem como pelo indutor de MMPs - EMMPRIN. Também conhecido como CD147 ou basigina, o

EMMPRIN é uma glicoproteína, membro da família de imunoglobulinas, ligada à membrana altamente glicosilada (Biswas et al.¹³, 1995). Ele está presente em uma ampla variedade de tecidos e é espesso por células normais, inflamatórias e neoplásicas (Omi et al.¹⁴, 2012; Yang et al.¹⁵, 2012; Dang et al.¹⁶, 2013).

O EMMPRIN pode estimular a produção de MMPs -1, -2, -3, -7, -9, -13, entre outras (Omi et al.¹⁴, 2012; Yang et al.¹⁷, 2013) e por isso participa da atividade colagenolítica (Kataoka et al.¹⁸, 1993) em processos fisiológicos e patológicos (Omi et al.¹⁴, 2012; Yang et al.¹⁵, 2012; Dang et al.¹⁶, 2013), inclusive na doença periodontal (Dong et al.¹⁹, 2009; Liu et al.²⁰, 2010; Yang et al.¹⁷, 2013; Wang et al.²¹, 2013). No entanto, participação do EMMPRIN no desenvolvimento da lesão periapical ainda é desconhecida.

Com o objetivo de compreender melhor os mecanismos moleculares e celulares que regulam o início e a progressão da lesão periapical, a proposição do presente estudo foi avaliar a localização, a cinética de expressão do EMMPRIN e a correlação de sua expressão com a expressão das MMPs -1, -2 e -9 e com a perda óssea alveolar durante o desenvolvimento da lesão periapical induzida em camundongos.

3.3 Material e métodos

Animais

Os protocolos experimentais desse trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP (protocolo CEUA n° 08/2011).

Foram utilizados 40 camundongos *wild-type* (WT) da linhagem C57BL/6, machos (de 6 a 8 semanas de idade, pesando em média 23 gramas), provenientes do Biotério Central da FMRP-USP (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo). Os camundongos foram mantidos em gaiolas de polipropileno e tampas de aço inoxidável perfurado, de 15 x 20 cm (4 a 6 animais por gaiola), forradas com cama de maravalha, em temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa do ar ($55\pm 10\%$) constantes, em um ciclo de claro-escuro de 12:12 horas, com dieta padrão de laboratório e livre acesso à água.

Indução das lesões periapicais

As lesões periapicais foram induzidas nos primeiros molares inferiores, de ambos os lados, dos camundongos. Para a realização dos procedimentos operatórios os animais foram anestesiados via intramuscular com ketamina (Ketamina 10%, Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP), na dosagem de 150mg/Kg de peso, e xilazina (Dopaser, Laboratórios Calier, SA, Barcelona, Espanha), na dosagem de 7,5mg/Kg de peso, na coxa traseira. Em seguida, os camundongos foram devidamente posicionados em mesa cirúrgica específica para a realização de procedimentos odontológicos, permitindo sua imobilização e manutenção da boca aberta, para acesso aos molares inferiores (Fig. 1).

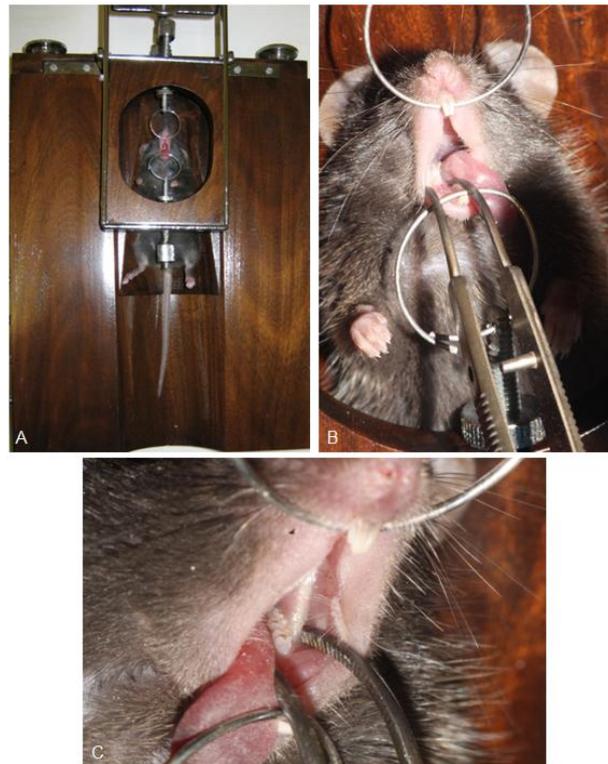


Figura 1 - (A) Posicionamento do camundongo na mesa cirúrgica específica para procedimentos odontológicos. (B) Visualização dos molares inferiores do lado direito. (C) Visualização dos molares inferiores do lado esquerdo.

A abertura coronária foi realizada na face oclusal dos primeiros molares inferiores de ambos os lados, com broca esférica de aço inoxidável (n° 1/4 - KG Sorensen Ind. Com. Ltda., Barueri, SP), montada em motor elétrico (Dentec 405 N; Dentec Ind. Com. Ltda, SP). Em seguida, os canais radiculares foram localizados e explorados com uma lima do tipo Kerr 10 (Les Fils d'Auguste Maillefer S/A, Suíça). Os canais radiculares permaneceram abertos para a contaminação, durante todo o período experimental. Primeiros molares inferiores hígidos de animais, nos quais as lesões periapicais não foram induzidas, foram utilizados como controle. Após os períodos experimentais de 7, 14, 21 e 42 dias, 5 animais de cada grupo foram escolhidos aleatoriamente e mortos em câmara de CO₂. Para o grupo controle foram mortos 5 animais nos quais não foi efetuada a abertura coronária. As mandíbulas foram

removidas com tesoura cirúrgica, dissecadas com auxílio de alicate e fixadas por imersão em formol tamponado a 10% por 24 horas em temperatura ambiente.

Microtomografia computadorizada

Após a fixação, cada mandíbula foi separada em duas hemimandíbulas totalizando 10 hemimandíbulas para cada período experimental (7, 14, 21 e 42 dias) e 10 para o grupo controle. As hemimandíbulas foram envolvidas em papel umedecido com água, posicionadas horizontalmente sobre um suporte e inseridas na bandeja porta-amostra do microtomógrafo (SkyScan 1176 *in vivo*, Skyscan, Kontich, Bélgica). O escaneamento das amostras foi efetuado com o programa SkyScan 1176 (Skyscan) usando os parâmetros de aquisição das imagens em quantidade total de 3 quadros (*frames*), fonte de alta tensão de 80Kv, potência de 300 μ A e filtro de 0,5mm de alumínio. Foram adquiridos aproximadamente, 150 cortes bidimensionais de 17,4 μ m de espessura, no plano sagital, de toda a extensão da mandíbula. No programa CTAn v.1.11.8 (Skyscan) foram selecionadas os cortes que mostravam simultaneamente o canal radicular e o forame apical da raiz distal para a mensuração da área da lesão periapical em mm². Aproximadamente 10 cortes microtomográficos por dente foram avaliados e a maior área da lesão foi considerada como valor final para cada amostra. Todas as medidas foram realizadas por um único examinador treinado que não sabia a identificação os grupos avaliados e as mensurações foram efetuadas duas vezes em tempos diferentes.

Processamento histotécnico

As hemimandíbulas foram descalcificadas em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 4,13%, em pH 7-7,4, a 6°C trocada semanalmente durante 30 dias. O grau de descalcificação das estruturas mineralizadas foi avaliado por meio da penetração mecânica de uma agulha visando à verificação da sua consistência. Após a descalcificação, as peças foram submetidas à técnica histológica de rotina, sendo lavadas em água corrente por 24 horas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico (80%, 95% por 30 minutos cada e 100% em quatro trocas de 1 hora cada), diafanizadas em xilol (com 3 banhos de 30 minutos cada) e incluídas em parafina. Os blocos com os dentes foram cortados longitudinalmente em micrótomo na direção mesio-distal, sendo simultaneamente visualizados em microscópio de luz convencional, para seleção dos cortes que englobavam as estruturas de interesse. Cortes seriados de 5µm de espessura foram obtidos de toda extensão da lesão periapical.

Avaliação histopatológica

Cortes representativos de cada grupo foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para a análise descritiva do tecido pulpar e das regiões apical e periapical. Os demais cortes foram submetidos à imunohistoquímica para a identificação de MMP-1, -2, -9 e EMMPRIN. Todas as análises foram realizadas por um único examinador experiente, usando apenas cortes que mostravam simultaneamente os terços coronário, médio e apical da raiz, o forame apical e osso alveolar. Os cortes foram avaliados e fotografados utilizando microscópio de luz convencional (Leica DMR, Leica Microsystem Wetzlar GmbH; Wetzlar, Alemanha) em conjunto com o programa Leica Qwin v.3.2.1 (Leica Imaging Systems Ltd;

Cambridge, Inglaterra), videocamera Leica (DFC 300FX; Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Suíça) e um computador acoplado.

Análise imunohistoquímica

As reações de imunohistoquímica foram realizadas utilizando a técnica de imunoperoxidase. Cortes histológicos representativos de cada espécime foram desparafinizados e hidratados, sendo que os epítomos antigênicos foram recuperados utilizando tripsina a 0,25% durante 5 minutos. Os cortes foram lavados 3 vezes com PBS por 5 minutos cada lavagem. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio a 3% por 20 minutos e o soro normal de cavalo na diluição de 1:50 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA) foi utilizado para o bloqueio de sítios inespecíficos de acordo com o recomendado. Em seguida, os cortes foram incubados *overnight* na temperatura de 4°C com os seguintes anticorpos primários diluídos em albumina de soro bovino a 1% (BSA): anti-MMP-1 (polyclonal rabbit antibody, Abbiotec, CA, EUA, diluído 1:100); anti-MMP-2 (monoclonal mouse antibody, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EUA; diluído 1:100); anti-MMP-9 (polyclonal goat antibody; Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EUA; diluído 1:100); anti-EMMPRIN (polyclonal goat antibody; Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EUA; diluído 1:100). Após o período determinado, os cortes foram lavados em PBS e incubados com anticorpo secundário biotilato (anti-rabbit IgG ou anti-goat IgG ou anti-mouse IgG) (Vector Laboratories Inc.; diluído 1:200), por 1 hora em temperatura ambiente. Após as lavagens com PBS, foi colocado o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC Kit 4000, Vecstain; Vector Laboratories Inc.) por 30 minutos em temperatura ambiente e os cortes foram lavados novamente com PBS. Em seguida, foi realizada a reação com solução de diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, EUA) e H₂O₂ a 0,03% em PBS por 1 minuto. Por fim, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris por 6

segundos e lavados com água amoniacal, diafanizados, desidratados e montados na lamínula com Permunt (Fisher Scientific, New Jersey, NJ, EUA). Controles negativos foram obtidos pela omissão do anticorpo primário. A avaliação do EMMPRIN e das MMPs foi feita qualitativamente considerando a presença/ausência e localização da imunomarcação.

As células imunomarcadas pelo EMMPRIN também foram analisadas semi-quantitativamente por um único examinador treinado que não sabia a identificação dos grupos. Três campos com magnificação de 400x, ao redor do ápice radicular foram selecionados em três orientações incluindo o eixo longitudinal do canal radicular através do forame apical e 45° em relação ao eixo longitudinal, para o lado direito e esquerdo (de Paula-Silva et al.²², 2009). A imunexpressão do EMMPRIN foi analisada por meio de escores de 0-4 baseados na porcentagem de células marcadas positivamente em cada campo: 0 = 0-10%; 1 = 10-24%; 2 = 25-49%; 3 = 50-74%; 4 = > ou = a 75% (adaptado de Fukuoka et al.²³, 2012).

RT-PCR em tempo real

A técnica do RT-PCR em tempo real foi empregada para quantificar a expressão do mRNA do EMMPRIN e das MMPs -1, -2 e -9. Foram empregados 5 primeiros molares inferiores para cada período experimental (7, 14, 21 e 42 dias) e grupo controle. Após a morte dos animais em câmara de CO₂, a mandíbula foi removida com tesoura cirúrgica, colocada em placa de Petri *RNase e DNase-free*, disposta sob gelo, e dissecada com auxílio de alicate cirúrgico. Em seguida, utilizando um alicate para osso, foi colhida a região correspondente ao primeiro molar inferior (dente e osso alveolar). Os espécimes foram colocados em tubos plásticos *RNase e DNase-free* e congelados a -80°C até o momento da extração do RNA.

Extração do RNA total e confecção do DNA complementar (cDNA)

Para extração do RNA, foi utilizado o método que combina o uso do trizol seguido da utilização parcial do Kit de extração Illustra RNAspin Mini (GE Healthcare,

Alemanha). Inicialmente os espécimes foram pulverizados (tritutados) em grau e pistilo, juntamente com o nitrogênio líquido e colocados em um tubo plástico contendo 200µL de Trizol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). Em seguida, foi acrescentado 200µL de clorofórmio (Merck, Frankfurt, Alemanha). As amostras foram então, misturadas por agitação manual durante 15 segundos e centrifugadas a 12.000xg, por 15 minutos a 4°C, com o objetivo de separar a solução em 3 fases distintas: fase aquosa superior (RNA), fase intermediária (restos de células e proteínas desnaturadas) e fase inferior (Trizol e clorofórmio). A fase aquosa superior foi processada usando o Kit de extração RNAspin Mini, e o RNA foi isolado de acordo com as normas do fabricante. Após a extração foram determinadas a quantidade e pureza do RNA empregando um espectrofotômetro (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000, Wilmington, DE, EUA).

O RNA purificado foi submetido à confecção do cDNA empregando o Kit ImPron II Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, WI, EUA). O cDNA foi sintetizado utilizando 1µg de RNA extraído, através de uma reação contendo 1µL de *Primer (oligo dT)* e H₂O suficiente para volume total de 12,3µL. A reação foi incubada a 70°C por 5 minutos em termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, EUA). A seguir, foi adicionado um mix contendo 4µL de tampão, 1,2µL MgCl₂, 1,0µL PCR mix, 0,5µL Recombinant RNasin[®], 1µL da enzima Transcriptase Reversa Go Script e água *nuclease free*, se necessário, para o volume total de 7,7µL. A reação foi então prosseguida com incubação a 25°C por 5 minutos, seguido de 42°C por 1 hora e inativação a 70°C por 15 minutos. O cDNA confeccionado foi diluído, adicionando H₂O destilada esterilizada suficiente para o volume total de 120µL após a reação.

Detecção e quantificação do EMMPRIN, MMP-1, -2 e -9

A reação RT-PCR em tempo real foi realizada com 7,65µL de SYBR Green (Go Taq[®] qPCR - Master Mix, Promega Corporation, Madison, WI, EUA), 0,5µL dos *primers*

MMP-1, -2, e -9 e EMMPRIN (*forward* e *reverse*) a 10 μ M, 5 μ L do cDNA sintetizado a partir de 1 μ g de RNA extraído e H₂O destilada esterilizada suficiente para volume final de 15 μ L. A reação foi submetida ao aparelho Step One Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que compreende de 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C, e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C. Nas reações SYBR Green, um ciclo final de 20 minutos com temperatura crescente de 60 a 95°C foi empregado para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram normalizados com β -actina e analisados com base no valor de Ct (cycle threshold) ou linha de corte. O resultado foi calculado com a fórmula $\Delta Ct = Ct$ gene estudado – Ct β -actina; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ amostra – ΔCt amostra calibradora, sendo que esta foi definida como a média de ΔCt de cada amostra. O número de vezes de expressão diferencial no mRNA comparado com o controle foi definido pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, de acordo com o “User’s Bulletin #2 (P/N 4303859)” da empresa fabricante do aparelho (Applied Biosystem).

Como controle adicional das reações de RT-PCR em tempo real, foram utilizadas amostras cujo cDNA foi confeccionado na ausência de Transcriptase Reversa (falso cDNA), com a finalidade de verificar se não ocorrerá ampliação de DNA genômico nas amostras “reais” ao invés da expressão gênica em decorrência dos estímulos estudados.

Os *primers* (β -actina, EMMPRIN, MMP-1, MMP-2 e MMP-9) que foram utilizados na reação RT-PCR em tempo real foram desenhados usando o programa *Primer3* com sequência de nucleotídeos presentes no banco de dados GenBank e estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 - Relação dos *primers* e sequências utilizadas

Primers	Sequência	
β-actina	<i>foward</i>	'5 AACGAGCGGTTCCGATG '3
	<i>reverse</i>	'5 GGATTCCATACCCAAGAAGGA '3
EMMPRIN	<i>foward</i>	'5 CCTGCATCTTCCTTCCTGAG '3
	<i>reverse</i>	'5 GACCAGTTTCGCAAGCTCTC '3
MMP-1	<i>foward</i>	'5 GCCCTGATGTTTCCCATCTA '3
	<i>reverse</i>	'5 ATGCTTAGGGTTGGGGTCTT '3
MMP-2	<i>foward</i>	'5 ACCCAGATGTGGCCA ACTAC '3
	<i>reverse</i>	'5 AAAGCATCATCCACGGTTTC '3
MMP-9	<i>foward</i>	'5 CAGCCGACTTTTGTGGTCTT '3
	<i>reverse</i>	'5 GCTTCTCTCCCATCATCTGG '3

Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do programa estatístico Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA.), com nível de significância de 5%. Foram empregados análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Bonferroni. Também foi efetuado teste de correlação de Spearman entre a imunexpressão do EMMPRIN e a expressão de mRNA das MMPs -1, -2 e -9, entre a imunexpressão do EMMPRIN e a área da lesão periapical e entre expressão de mRNA das MMPs e a área da lesão periapical. A correlação foi considerada moderada para $r > 0,4$ e forte para $r > 0,7$. Os valores foram descritos como média e desvio padrão da média.

3.4 Resultados

Morfometria microtomográfica da lesão periapical

Para visualização da cinética de desenvolvimento da lesão periapical os resultados estão apresentados em valores absolutos da área do espaço periapical nos tempos estudados e em porcentagem do aumento deste espaço nos intervalos de tempo 0-7, 7-14, 14-21 e 21-42 dias (Fig. 2). Na raiz distal do grupo controle foi observada integridade da lâmina dura, com ausência de reabsorção óssea periapical e espessura normal do espaço do ligamento periodontal. Não houve perda óssea estatisticamente significativa aos 7 dias ($p>0,05$). A área da lesão periapical aumentou significativamente dos 7 para os 14 dias ($p<0,0001$) e a partir de então houve estabilização, sem aumento significativo nos períodos de 21 e 42 dias ($p>0,05$). O aumento médio da área da lesão periapical em porcentagem foi de 34, 83, 1 e 18% nos períodos de 0-7, 7-14, 14-21 e 21-42 dias, respectivamente.

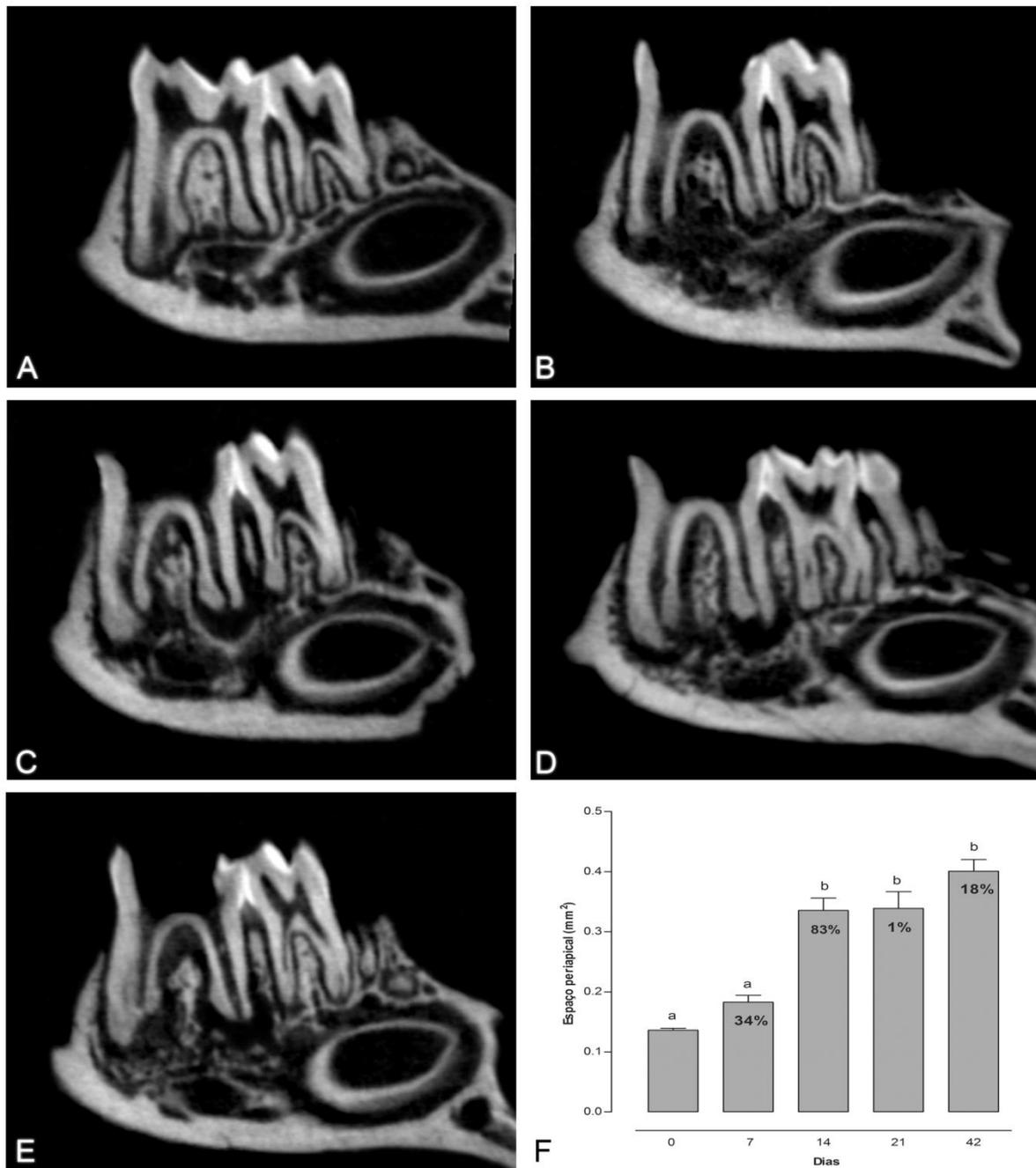


Figura 2 - Imagens em 2 dimensões (2D) de microtomografias computadorizadas representativas de molares inferiores do grupo controle - 0 dia (A) e 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 42 (E) dias após a abertura coronária e contaminação dos canais radiculares. (F) Quantificação do espaço periodontal periapical. No grupo controle observa-se integridade da lâmina dura, espaço do ligamento periodontal e osso alveolar normais. Nos períodos de 14, 21 e 42 dias observa-se perda do osso alveolar e aumento da área da lesão periapical. A comparação do espaço periapical mostra que a área da lesão aumentou significativamente de 7 para 14 dias. As porcentagens dentro das barras representam o aumento da área da lesão periapical, em porcentagem, nos períodos de 0-7; 7-14; 14-21; 21-42 dias. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos.

Avaliação histopatológica

As raízes distais dos primeiros molares inferiores hígidos (grupo controle) apresentaram características de normalidade, com tecido pulpar e ligamento periodontal íntegros e ausência de reabsorção cementária e de osso alveolar. Aos 7 dias após a abertura coronária e contaminação do canal radicular, verificou-se necrose de toda a polpa. O espaço do ligamento periodontal estava levemente aumentado com células inflamatórias ocasionais. O cimento e o osso alveolar apresentavam-se normais. Aos 14, 21 e 42 dias observou-se espaço do ligamento periapical com aumento acentuado e presença de infiltrado inflamatório denso composto de células mononucleares e polimorfonucleares distribuídas por toda a região da lesão. A lesão periapical caracterizou-se, nestes períodos, desestruturação do ligamento periodontal, reabsorção do osso alveolar e áreas de reabsorção cementária (Fig. 3).

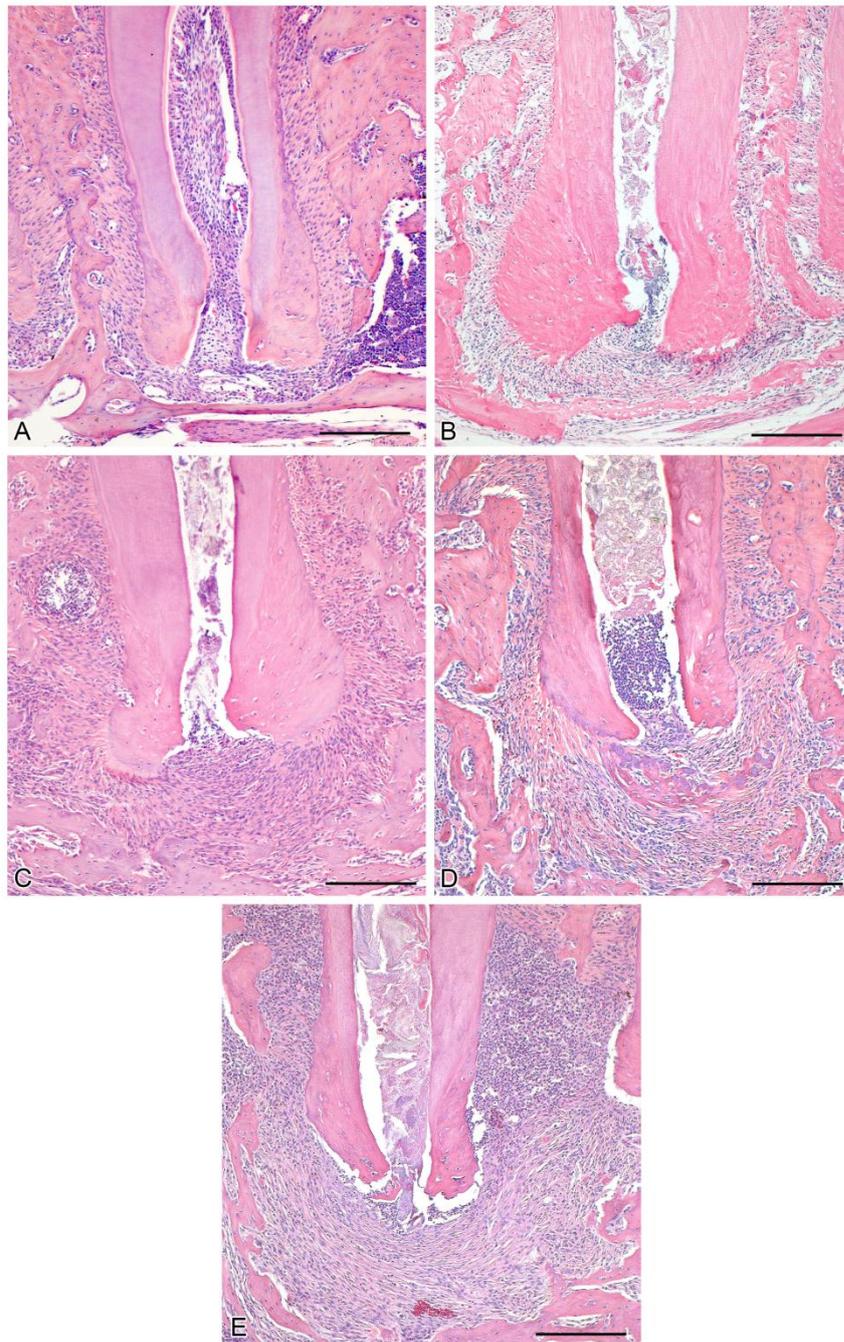


Figura 3 - Imagens histológicas representativas da raiz distal de 1^{os} molares inferiores do grupo controle - 0 dia (A) e 7 (B), 14 (C), 21 (D), e 42 (E) dias após a abertura coronária e contaminação dos canais radiculares. No grupo controle observa-se polpa normal revestida por camada odontoblástica e pré-dentina; ligamento periodontal e osso alveolar íntegros. No período de 7 dias observa-se necrose de toda a polpa, ligamento periodontal levemente espessado com células inflamatórias ocasionais, osso e cimento íntegros. Aos 14, 21 e 42 dias nota-se espaço do ligamento aumentado com infiltrado inflamatório denso distribuído por toda a região da lesão e reabsorção do cimento e osso alveolar. HE; Barra = 200 μ m

Análise imunohistoquímica da expressão de EMMPRIN, MMPs-1, -2 e -9

No grupo controle foi observada marcação discreta e ocasional do EMMPRIN, MMP-1, -2 e -9 em fibroblastos do ligamento periodontal. O EMMPRIN foi expresso fortemente nas células da camada odontoblástica da polpa dentária e a MMP-1 teve marcação moderada nessas células. A MMP-2 foi expressa intensamente também em vasos sanguíneos (Fig. 4).

Nos períodos de 7, 14, 21 e 42 dias após a abertura coronária e contaminação dos canais radiculares, imunomarcação intensa para o EMMPRIN, MMPs -1, -2 e -9 foi observada principalmente na região adjacente ao forame apical e ocasionalmente em outras regiões da lesão periapical. Houve marcação intensa do EMMPRIN, MMP-1, -2 e -9 no infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear e marcação discreta em fibroblastos. As células do infiltrado foram reconhecidas como macrófagos, linfócitos ou neutrófilos com base na forma da célula, forma do núcleo e tamanho (Fig. 4). Células sugestivas de osteoblastos e osteoclastos apresentaram expressão discreta para o EMMPRIN e para MMP-1. No entanto, houve dificuldade na identificação dessas células e de cementoblastos devido ao intenso processo inflamatório, com presença de fatores de crescimento que podem alterar a morfologia celular.

A imunoexpressão do EMMPRIN na lesão periapical foi elevada nos períodos de 7, 14, 21 e 42 dias comparado ao controle ($p < 0,05$) conforme mostrado na figura 5.

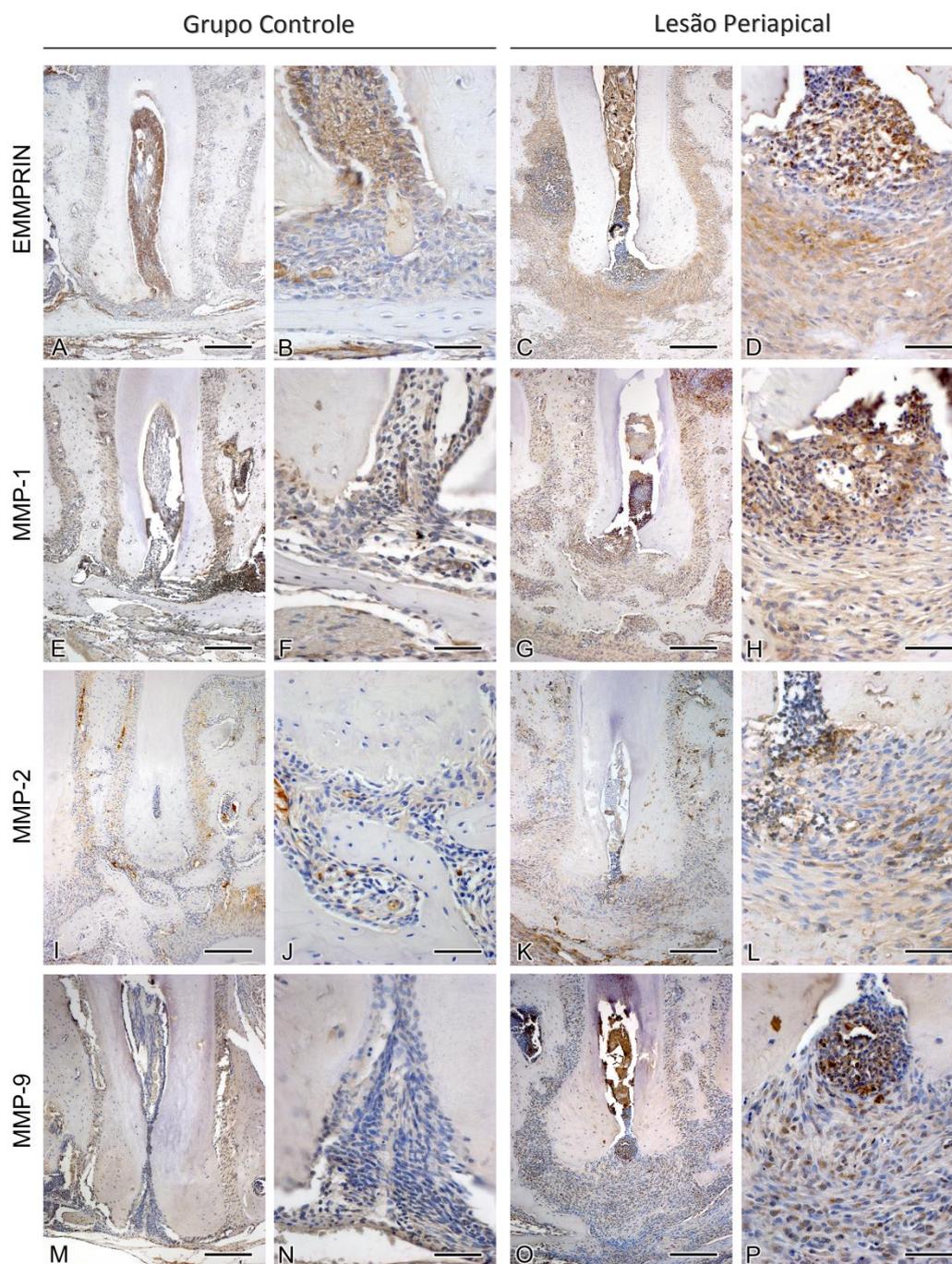


Figura 4 - Imagens representativas obtidas do grupo controle e representativas dos quatro períodos pós-indução da lesão periapical. No grupo controle observa-se uma discreta marcação do EMMPRIN (A e B), MMP-1 (E e F), MMP-2 (I e J) e MMP-9 (M e N) em fibroblastos do ligamento periodontal. Na polpa, os odontoblastos expressaram fortemente o EMMPRIN e moderadamente a MMP-1. A MMP-2 foi expressa em vasos sanguíneos. Nos períodos de 7, 14, 21 e 42 dias após os procedimentos de indução da lesão periapical, imunomarcação intensa para o EMMPRIN (C e D), MMPs -1 (G e H), MMP-2 (K e L) e MMP-9 (O e P) foram observadas principalmente na região adjacente ao forame apical e ocasionalmente em outras regiões da lesão periapical. O EMMPRIN, MMP-1, -2 e -9 apresentaram forte expressão em células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares e marcação discreta em fibroblastos. Barra: A, C, E, G, I, K, M, O = 200 μ m; B, D, F, H, J, L, N, P = 50 μ m.

Cinética da expressão do mRNA do EMMPRIN, MMP-1, -2 e -9

Como mostrado na figura 6, a expressão do gene EMMPRIN apresentou-se maior no grupo controle em relação aos 7, 14, 21 e 42 dias ($p < 0,05$), sendo que aos 42 dias sua expressão foi menor do que nos 7, 14 e 21 dias ($p < 0,05$). Durante o desenvolvimento da lesão periapical houve aumento dos níveis de mRNA de MMP-1, -2 e -9 comparado com o grupo controle. A expressão do gene MMP-1 aumentou aos 7 dias e manteve-se elevada, em relação ao controle ($p < 0,05$), em todos os períodos estudados de desenvolvimento da lesão periapical. Os genes MMPs -2 e -9 apresentaram a mesma cinética de expressão no desenvolvimento da lesão periapical; a expressão de ambos aumentou significativamente aos 14 dias ($p < 0,05$) e retornou a níveis semelhantes ao controle em 21 e 42 dias ($p > 0,05$).

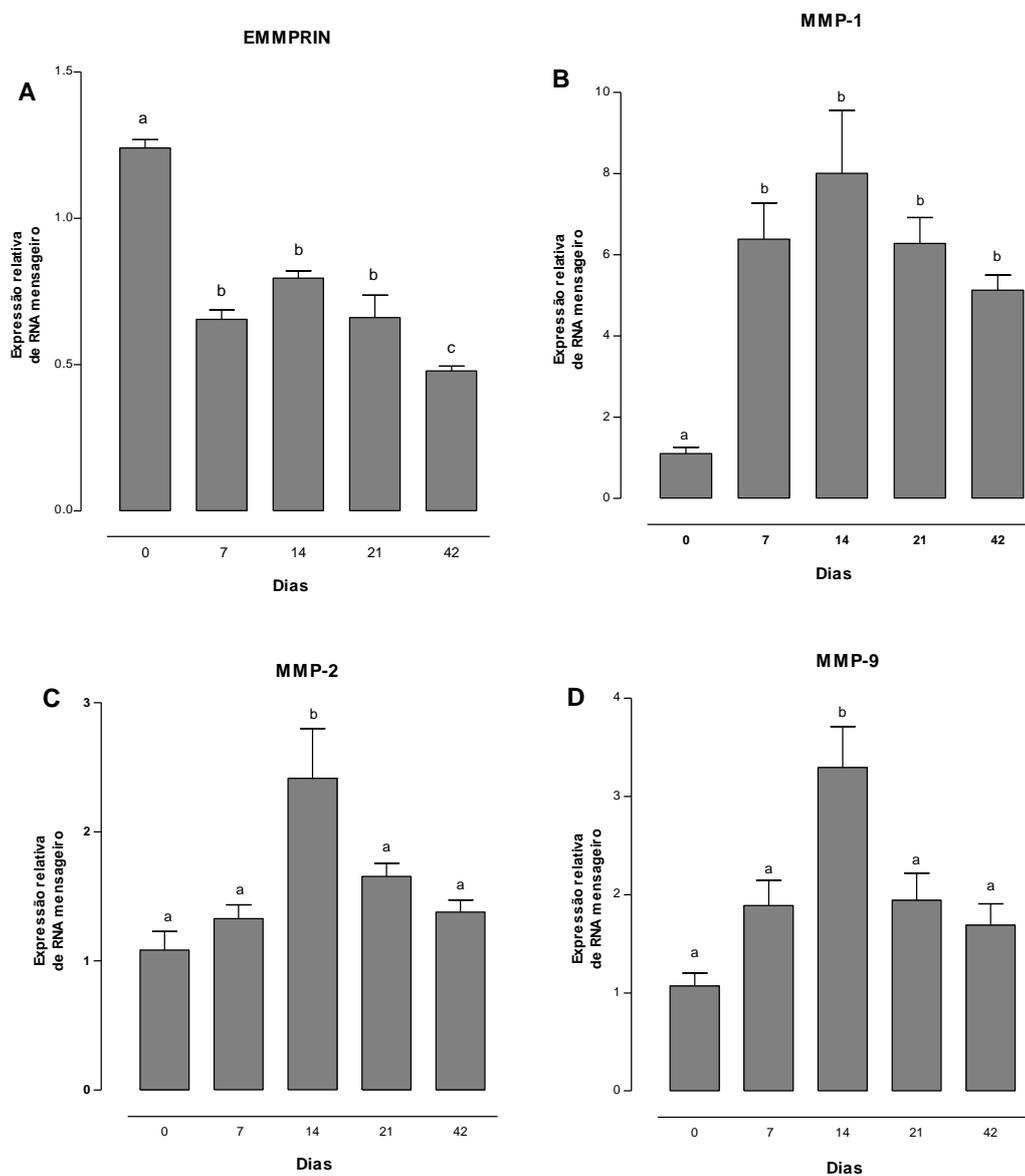


Figura 6 - Análise da expressão de mRNA dos genes EMMPRIN (A), MMP-1 (B), -2 (C) e -9 (D) nos dias 0, 7, 14, 21 e 42 após o procedimento de indução experimental da lesão periapical. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

Correlação da imunexpressão do EMMPRIN com a expressão dos genes MMPs -1, -2, e 9 e com a perda óssea alveolar

A imunexpressão do EMMPRIN teve uma correlação positiva moderada significativa com a expressão dos genes MMP-1 ($r=0,5$, $p=0,0011$), MMP-2 ($r=0,42$, $p=0,004$) e MMP-9 ($r=0,425$, $p=0,0049$) e com a área da lesão periapical representada em porcentagem de aumento nos intervalos de tempo estudados ($r=0,44$, $p=0,0023$).

As MMPs -1, -2 e -9 apresentaram correlação positiva moderada significativa com a área da lesão periapical ($r=0,601$, $p<0,0001$ para MMP-1; $r=0,594$, $p<0,0001$ para MMP-2; $r=0,647$, $p<0,0001$ para MMP-9).

3.5 Discussão

Este estudo mostrou pela primeira vez a localização e a cinética de expressão do EMMPRIN bem como sua correlação com a expressão das MMPs-1, -2, e -9, e com a reabsorção óssea periapical durante o desenvolvimento da lesão periapical experimentalmente induzida em camundongos.

A análise histopatológica e microtomográfica confirmaram a eficácia do protocolo experimental de abertura coronária e manutenção dos dentes abertos na indução de lesão periapical em camundongos (Silva et al.²⁴, 2011). Foram detectadas duas fases distintas: uma fase ativa, no período de 7 a 14 dias, na qual foi observado um aumento expressivo de 83% da área de lesão, seguida de uma fase crônica ou de estabilização no período de 14 a 42 dias, com pequenos aumentos não significativos da lesão (Silva et al.²⁵, 2012; Aranha et al.²⁶, 2012).

A imunoexpressão do EMMPRIN na região periapical foi maior nos dentes com lesão periapical do que nos dentes controle. Imunomarcção positiva intensa foi observada no infiltrado inflamatório adjacente ao forame apical em outras regiões inflamadas a lesão periapical, e também em fibroblastos e osteoblastos aos 7, 14, 21 e 42 dias após indução da lesão periapical.

No grupo controle o EMMPRIN foi expresso discreta e ocasionalmente em fibroblastos do ligamento periodontal, mas foi fortemente expresso na camada odontoblástica da polpa dentária (Yang et al.¹⁵, 2012). Por outro lado a expressão do gene EMMPRIN apresentou-se elevada no grupo controle em relação aos dentes com lesão periapical induzida nos períodos de 7, 14, 21 e 42 dias. Essa diferença de resultados pode ser explicada pelo fato de que não foi efetuada a remoção da polpa radicular dos dentes do grupo controle para a realização do RT-PCR em tempo real, o que provavelmente elevou a expressão do gene

EMMPRIN neste grupo. Já a análise da imunexpressão do EMMPRIN foi realizada na região periapical, excluindo a imunexpressão do mesmo na polpa radicular.

A expressão do EMMPRIN nos tecidos periapicais inflamados, por nós observada, está de acordo com estudos que mostram que o EMMPRIN é encontrado em níveis elevados nos tecidos periodontais inflamados (Dong et al.¹⁹, 2009; Liu et al.^{20,27}, 2010) e no fluido gengival crevicular de dentes com periodontite (Emingil et al.²⁸⁻²⁹, 2006, 2008). Além disso, terapias periodontais que resultam na melhora dos parâmetros clínicos estão associados com níveis reduzidos de EMMPRIN no fluido crevicular gengival (Emingil et al.²⁹, 2008).

A expressão do EMMPRIN em células inflamatórias é consistente com relatos de que o EMMPRIN é expresso por células t ativadas (Nabeshima et al.³⁰, 2004), macrófagos, monócitos (Major et al.³¹, 2002), neutrófilos (Wang et al.³², 2011) e por células inflamatórias em tecido gengival de indivíduos com periodontite (Dong et al.¹⁹, 2009; Liu et al.^{20,27}, 2010).

As MMPs-1, -2 e -9 foram expressas por células inflamatórias e por fibroblastos ao longo dos 42 dias após indução da lesão periapical nas mesmas regiões onde houve marcação positiva do EMMPRIN. A expressão dos genes MMPs -1, -2 e -9 apresentou correlação positiva com a porcentagem de aumento da área da lesão periapical nos períodos estudados.

Tem sido reconhecido que durante o desenvolvimento da lesão periapical, a degradação dos componentes da matriz extracelular ocorre, em parte, devido à ação de MMPs expressas por macrófagos, linfócitos, neutrófilos, fibroblastos e células endoteliais (Corotti et al.⁷, 2009). Além disso, tem sido sugerido que a modalidade de tratamento endodôntico poderia interferir na expressão das MMPs e que níveis elevados destas enzimas estão correlacionados com a ausência de reparação da lesão periapical (Paula-Silva et al.⁸, 2010).

A MMP-1 é considerada uma enzima chave na iniciação da reabsorção óssea (Sasaki et al.¹¹, 2007) uma vez que ela degrada o colágeno da camada não mineralizada que cobre superfície óssea permitindo a fixação dos osteoclastos no osso. (Holliday et al.³³, 1997; Sasaki et al.¹¹, 2007) Além disso, os fragmentos de colágeno gerados levam a ativação dos osteoclastos tanto no início quanto nas demais fases da reabsorção óssea (Holliday et al.³³, 1997; Sasaki et al.¹¹, 2007). A expressão do gene MMP-1 aumentou aos 7 dias e manteve-se estatisticamente elevada em relação ao controle durante os períodos de tempo estudados, o que sugere sua participação nas fases ativa e de estabilização da lesão periapical. Lin et al.³⁴ (2002) mostraram que a MMP-1 apresenta expressão pronunciada em macrófagos e osteoblastos que aumenta sequencialmente na fase ativa da lesão do dia 5 até o dia 20 após indução da lesão periapical em ratos. No entanto, a expressão da MMP-1 não foi avaliada por esses autores no período de estabilização da lesão. Além disso, a MMP-1 contribui para a expansão de cistos radiculares (Lin et al.³⁵, 1997)

A expressão dos genes MMP-2 e -9 aumentou de 7 para 14 dias, período em que houve aumento significativo da área da lesão, e diminuiu nos períodos de estabilização da lesão (de 14 a 42 dias) que corrobora com estudo anterior que mostra a maior expressão dessas MMPs na fase ativa de desenvolvimento das lesões periapicais em ratos e diminuição desta expressão durante a fase de estabilização da lesão em ratos (Corotti et al.⁷, 2009). As MMP-2 e -9 também são detectadas no exsudato intracanal de dentes com abscessos periapicais agudos (Buzoglu et al.³⁶, 2009), são expressas em granulomas e cistos periapicais (de Paula-Silva et al.³⁷, 2009) e estão presentes, em níveis aumentados, no fluido gengival crevicular de dentes com lesões periapicais crônicas (Belmar et al.³⁸, 2008).

Por meio do estímulo da expressão de MMPs e conseqüentemente da degradação da matriz extracelular, o EMMPRIN está envolvido na propriedade invasiva de tumores malignos (Omi et al.¹⁴, 2012) e no potencial invasivo de fibroblastos sinoviais na cartilagem e

na destruição óssea na artrite reumatoide (Wang et al.³², 2011) entre outros processos patológicos e fisiológicos (Omi et al.¹⁴, 2012; Yang et al.¹⁵, 2012; Dang et al.¹⁶, 2013). Para o melhor de nosso conhecimento, neste estudo foi mostrado pela primeira vez que a cinética da imunexpressão do EMMPRIN apresenta correlação positiva com a expressão dos genes MMPs -1, -2, e 9 e com a porcentagem da perda óssea alveolar durante o desenvolvimento da lesão periapical. Estes resultados são concordantes com estudos que mostraram que a imunexpressão do EMMPRIN se correlaciona positivamente com a expressão de MMP-1 e -2 (Dong et al.¹⁹, 2009) e com a perda de osso alveolar e degradação do colágeno da região interdental na doença periodontal (Liu et al.²⁰, 2010).

Os resultados obtidos sugerem que o EMMPRIN pode estar envolvido na regulação da expressão das MMP-1, -2 e -9 e conseqüentemente na destruição tecidual durante o desenvolvimento da lesão periapical. No entanto, outros estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos na expressão do EMMPRIN e a sua significância na patogênese da lesão periapical.

Pode se concluir que, na lesão periapical, o EMMPRIN é expresso por fibroblastos e principalmente pelo infiltrado inflamatório da região adjacente ao forame apical e em regiões adjacentes a esse infiltrado. A sua imunexpressão é elevada e se correlaciona positivamente com a expressão dos genes MMPs -1, -2, e 9 e com a perda óssea alveolar durante o desenvolvimento da lesão periapical.

3.6 Referências

1. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15(6):348-81.

2. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9(4):498-521.
3. Stashenko P, Wang CY, Tani-Ishii N, Yu SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78(4):494-502.
4. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 2007;65(1):1-13.
5. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem* 2007;15(6):2223-68.
6. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92(8):827-39.
7. Corotti MV, Zambuzzi WF, Paiva KB, Menezes R, Pinto LC, Lara VS, et al. Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development. *Arch Oral Biol* 2009;54(8):764-71.
8. Paula-Silva FW, da Silva LA, Kapila YL. Matrix metalloproteinase expression in teeth with apical periodontitis is differentially modulated by the modality of root canal treatment. *J Endod* 2010;36(2):231-7.
9. Matsui H, Yamasaki M, Nakata K, Amano K, Nakamura H. Expression of MMP-8 and MMP-13 in the development of periradicular lesions. *Int Endod J* 2011;44(8):739-45.
10. Menezes-Silva R, Khaliq S, Deeley K, Letra A, Vieira AR. Genetic susceptibility to periapical disease: conditional contribution of MMP2 and MMP3 genes to the development of periapical lesions and healing response. *J Endod* 2012;38(5):604-7.

11. Sasaki K, Takagi M, Konttinen YT, Sasaki A, Tamaki Y, Ogino T, et al. Upregulation of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and its activator MMP-3 of human osteoblast by uniaxial cyclic stimulation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007;80(2):491-8.
12. Ertugrul AS, Dursun R, Dundar N, Avunduk MC, Hakki SS. MMP-1, MMP-9, and TIMP-1 levels in oral lichen planus patients with gingivitis or periodontitis. *Arch Oral Biol* 2013;58(7):843-52.
13. Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H, et al. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res* 1995;55(2):434-9.
14. Omi Y, Shibata N, Okamoto T, Obara T, Kobayashi M. The role of CD147 in the invasiveness of follicular thyroid carcinoma cells. *Thyroid* 2012;22(4):383-94.
15. Yang SY, Park BI, Kim HJ, Kang JH, Jung NR, Byun JD, et al. Differential expression of cyclophilin A and EMMPRIN in developing molars of rats. *Anat Rec (Hoboken)* 2012;295(1):150-9.
16. Dang Y, Li W, Tran V, Khalil RA. EMMPRIN-mediated induction of uterine and vascular matrix metalloproteinases during pregnancy and in response to estrogen and progesterone. *Biochem Pharmacol* 2013;86(6):734-47.
17. Yang D, Wang J, Ni J, Shang S, Liu L, Xiang J, et al. Temporal expression of metalloproteinase-8 and -13 and their relationships with extracellular matrix metalloproteinase inducer in the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 2013;48(4):411-9.
18. Kataoka H, DeCastro R, Zucker S, Biswas C. Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase. *Cancer Res* 1993;53(13):3154-8.

19. Dong W, Xiang J, Li C, Cao Z, Huang Z. Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer is associated with matrix metalloproteinase-1 and -2 in gingival tissues from patients with periodontitis. *J Periodontol Res* 2009;44(1):125-32.
20. Liu L, Li C, Cai X, Xiang J, Cao Z, Dong W. The temporal expression and localization of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) during the development of periodontitis in an animal model. *J Periodontol Res* 2010;45(4):541-9.
21. Wang J, Yang D, Li C, Shang S, Xiang J. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer glycosylation and caveolin-1 in healthy and inflamed human gingiva. *J Periodontol Res* 2013. doi: 10.1111/jre. 12095.
22. de Paula-Silva FW, Wu MK, Leonardo MR, da Silva LA, Wesselink PR. Accuracy of periapical radiography and cone-beam computed tomography scans in diagnosing apical periodontitis using histopathological findings as a gold standard. *J Endod* 2009;35(7):1009-12.
23. Fukuoka M, Hamasaki M, Koga K, Hayashi H, Aoki M, Kawarabayashi T, et al. Expression patterns of emmprin and monocarboxylate transporter-1 in ovarian epithelial tumors. *Virchows Arch* 2012;461(4):457-66.
24. Silva MJ, Sousa LM, Lara VP, Cardoso FP, Junior GM, Totola AH, et al. The role of iNOS and PHOX in periapical bone resorption. *J Dent Res* 2011;90(4):495-500.
25. Silva MJ, Kajiya M, AlShwaimi E, Sasaki H, Hong J, Ok P, et al. Bacteria-reactive immune response may induce RANKL-expressing T cells in the mouse periapical bone loss lesion. *J Endod* 2012;38(3):346-50.
26. Aranha AM, Repeke CE, Garlet TP, Vieira AE, Campanelli AP, Trombone AP, et al. Evidence supporting a protective role for Th9 and Th22 cytokines in human and experimental periapical lesions. *J Endod* 2013;39(1):83-7.

27. Liu L, Li C, Cai C, Xiang J, Cao Z. Cyclophilin A (CypA) is associated with the inflammatory infiltration and alveolar bone destruction in an experimental periodontitis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391(1):1000-6.
28. Emingil G, Tervahartiala T, Mantyla P, Maatta M, Sorsa T, Atilla G. Gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase (MMP)-7, extracellular MMP inducer, and tissue inhibitor of MMP-1 levels in periodontal disease. *J Periodontol* 2006;77(12):2040-50.
29. Emingil G, Atilla G, Sorsa T, Tervahartiala T. The effect of adjunctive subantimicrobial dose doxycycline therapy on GCF EMMPRIN levels in chronic periodontitis. *J Periodontol* 2008;79(3):469-76.
30. Nabeshima K, Suzumiya J, Nagano M, Ohshima K, Toole BP, Tamura K, et al. Emmprin, a cell surface inducer of matrix metalloproteinases (MMPs), is expressed in T-cell lymphomas. *J Pathol* 2004;202(3):341-51.
31. Major TC, Liang L, Lu X, Rosebury W, Bocan TM. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) is induced upon monocyte differentiation and is expressed in human atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(7):1200-7.
32. Wang CH, Dai JY, Wang L, Jia JF, Zheng ZH, Ding J, et al. Expression of CD147 (EMMPRIN) on neutrophils in rheumatoid arthritis enhances chemotaxis, matrix metalloproteinase production and invasiveness of synoviocytes. *J Cell Mol Med* 2011;15(4):850-60.
33. Holliday LS, Welgus HG, Fliszar CJ, Veith GM, Jeffrey JJ, Gluck SL. Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase. *J Biol Chem* 1997;272(35):22053-8.

34. Lin SK, Kok SH, Kuo MY, Wang TJ, Wang JT, Yeh FT, et al. Sequential expressions of MMP-1, TIMP-1, IL-6, and COX-2 genes in induced periapical lesions in rats. *Eur J Oral Sci* 2002;110(3):246-53.
35. Lin SK, Chiang CP, Hong CY, Lin CP, Lan WH, Hsieh CC, et al. Immunolocalization of interstitial collagenase (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in radicular cysts. *J Oral Pathol Med* 1997;26(10):458-63.
36. Buzoglu HD, Unal H, Ulger C, Mert S, Kucukyildirim S, Er N. The zymographic evaluation of gelatinase (MMP-2 and -9) levels in acute and chronic periapical abscesses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108(5):e121-6.
37. de Paula-Silva FW, D'Silva NJ, da Silva LA, Kapila YL. High matrix metalloproteinase activity is a hallmark of periapical granulomas. *J Endod* 2009;35(9):1234-42.
38. Belmar MJ, Pabst C, Martinez B, Hernandez M. Gelatinolytic activity in gingival crevicular fluid from teeth with periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105(6):801-6.

4 Considerações finais

Além de permitir uma análise da cinética da expressão do EMMPRIN durante o desenvolvimento da lesão, os resultados obtidos com este modelo experimental de indução de lesão periapical sugerem que o EMMPRIN, como um indutor de MMPs, pode estar relacionado ao desenvolvimento da lesão periapical.

No entanto, estudos adicionais são necessários para determinar o papel exato do EMMPRIN no desenvolvimento da lesão. Se for comprovada a relação entre EMMPRIN e lesão periapical, a análise dessa proteína no exudato periapical ou no fluido crevicular, poderia ser utilizada para auxiliar no diagnóstico e na seleção da técnica de tratamento.

Referências*

1. Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J* 1995; 309 (Pt 1): 299-306.
2. Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1825 (1): 29-36.
3. Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Gurgan C, Sorsa T, Kontinen YT. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J Dent Res*. 2007; 86 (4): 347-51.
4. Belmar MJ, Pabst C, Martinez B, Hernandez M. Gelatinolytic activity in gingival crevicular fluid from teeth with periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 105 (6): 801-6.
5. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol*. 1993; 64 (5 Suppl): 474-84.
6. Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res*. 1993; 28: 500-10.
7. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993; 4 (2): 197-250.
8. Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H, et al. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res*. 1995;55 (2): 434-9.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

9. Braundmeier AG, Dayger CA, Mehotra P, Belton RJ, Jr., Nowak RA. EMMPRIN is secreted by human uterine epithelial cells in microvesicles and stimulates metalloproteinase production by human uterine fibroblast cells. *Reprod Sci* 2012; 19 (12): 1292-301.
10. Buzoglu HD, Unal H, Ulger C, Mert S, Kucukyildirim S, Er N. The zymographic evaluation of gelatinase (MMP-2 and -9) levels in acute and chronic periapical abscesses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108 (5): e 121-6.
11. Cao Z, Xiang J, Li C. A potential role of EMMPRIN by regulating ECM degradation in periodontitis. *Med Hypotheses.* 2007; 69 (5): 1102-4.
12. Carneiro E, Menezes R, Garlet GP, Garcia RB, Bramante CM, Figueira R, et al. Expression analysis of matrix metalloproteinase-9 in epithelialized and nonepithelialized apical periodontitis lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 107 (1): 127-32.
13. Caudroy S, Polette M, Nawrocki-Raby B, Cao J, Toole BP, Zucker S, et al. EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells. *Clin Exp Metastasis.* 2002; 19 (8): 697-702.
14. Corotti MV, Zambuzzi WF, Paiva KB, Menezes R, Pinto LC, Lara VS, et al. Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development. *Arch Oral Biol.* 2009; 54 (8): 764-71.
15. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science.* 2002; 295 (5564): 2387-92.
16. de Paula-Silva FW, D'Silva NJ, da Silva LA, Kapila YL. High matrix metalloproteinase activity is a hallmark of periapical granulomas. *J Endod.* 2009; 35 (9): 1234-42.

17. DeCastro R, Zhang Y, Guo H, Kataoka H, Gordon MK, Toole B, et al. Human keratinocytes express EMMPRIN, an extracellular matrix metalloproteinase inducer. *J Invest Dermatol.* 1996; 106 (6): 1260-5.
18. Delaissé JM, Eeckhout Y, Neff L, François-Gillet C, Henriot P, Su Y, Vaes G, Baron R. (Pro)collagenase (matrix metalloproteinase-1) is present in rodent osteoclasts and in the underlying bone-resorbing compartment. *J Cell Sci.* 1993;106 (Pt 4): 1071-82.
19. Dezerega A, Madrid S, Mundi V, Valenzuela MA, Garrido M, Paredes R, et al. Pro-oxidant status and matrix metalloproteinases in apical lesions and gingival crevicular fluid as potential biomarkers for asymptomatic apical periodontitis and endodontic treatment response. *J Inflamm. (Lond)* 2012; 9 (1): 8.
20. Donadio AC, Remedi MM, Susperreguy S, Frede S, Gilardoni MB, Tang Y, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and matrix metalloproteinases (MMPs) as regulators of tumor-host interaction in a spontaneous metastasis model in rats. *Histochem Cell Biol.* 2008; 130 (6): 1155-64.
21. Dong W, Xiang J, Li C, Cao Z, Huang Z. Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer is associated with matrix metalloproteinase-1 and -2 in gingival tissues from patients with periodontitis. *J Periodontal Res.* 2009; 44 (1): 125-32.
22. Emingil G, Atilla G, Sorsa T, Tervahartiala T. The effect of adjunctive subantimicrobial dose doxycycline therapy on GCF EMMPRIN levels in chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2008; 79 (3): 469-76.
23. Emingil G, Tervahartiala T, Mantyla P, Maatta M, Sorsa T, Atilla G. Gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase (MMP)-7, extracellular MMP inducer, and tissue inhibitor of MMP-1 levels in periodontal disease. *J Periodontol.* 2006; 77 (12): 2040-50.

24. Feldman M, La VD, Lombardo Bedran TB, Palomari Spolidorio DM, Grenier D. Porphyromonas gingivalis-mediated shedding of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) by oral epithelial cells: a potential role in inflammatory periodontal disease. *Microbes Infect.* 2011; 13 (14-15): 1261-9.
25. Gabison EE, Hoang-Xuan T, Mauviel A, Menashi S. EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie.* 2005; 87 (3-4): 361-8.
26. Grass GD, Bratoeva M, Toole BP. Regulation of invadopodia formation and activity by CD147. *J Cell Sci.* 2012; 125 (Pt 3): 777-88.
27. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol.* 2011; 3: 1-15.
28. Guo H, Zucker S, Gordon MK, Toole BP, Biswas C. Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1997; 272 (1): 24-7.
29. Gusman H, Santana RB, Zehnder M. Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110 (5): 353-7.
30. Jouneau S, Khorasani N, P DES, Macedo P, Zhu J, Bhavsar PK, et al. EMMPRIN (CD147) regulation of MMP-9 in bronchial epithelial cells in COPD. *Respirology.* 2011; 16 (4): 705-12.
31. Kanyenda LJ, Verdile G, Boulos S, Krishnaswamy S, Taddei K, Meloni BP, et al. The dynamics of CD147 in Alzheimer's disease development and pathology. *J Alzheimers Dis.* 2011; 26 (4): 593-605.
32. Kasinrerck W, Fiebiger E, Stefanova I, Baumruker T, Knapp W, Stockinger H. Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species

- homologue of rat OX-47, mouse basigin, and chicken HT7 molecule. *J Immunol.* 1992; 149 (3): 847-54.
33. Kataoka H, DeCastro R, Zucker S, Biswas C. Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase. *Cancer Res.* 1993; 53 (13): 3154-8.
34. Konttinen YT, Li TF, Mandelin J, Liljeström M, Sorsa T, Santavirta S, et al. Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 2000; 43 (2): 275-80.
35. Lin SK, Chiang CP, Hong CY, Lin CP, Lan WH, Hsieh CC, Kuo MY. Immunolocalization of interstitial collagenase (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in radicular cysts. *J Oral Pathol Med.* 1997; 26 (10): 458-63.
36. Lin SK, Kok SH, Kuo MY, Wang TJ, Wang JT, Yeh FT, et al. Sequential expressions of MMP-1, TIMP-1, IL-6, and COX-2 genes in induced periapical lesions in rats. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110 (3): 246-53.
37. Liu L, Li C, Cai C, Xiang J, Cao Z. Cyclophilin A (CypA) is associated with the inflammatory infiltration and alveolar bone destruction in an experimental periodontitis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 391 (1): 1000-6.
38. Liu L, Li C, Cai X, Xiang J, Cao Z, Dong W. The temporal expression and localization of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) during the development of periodontitis in an animal model. *J Periodontal Res.* 2010; 45 (4): 541-9.
39. Liu Y, Min D, Bolton T, Nube V, Twigg SM, Yue DK, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. *Diabetes Care.* 2009; 32 (1): 117-9.

40. Major TC, Liang L, Lu X, Rosebury W, Bocan TM. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) is induced upon monocyte differentiation and is expressed in human atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22 (7): 1200-7.
41. Marmorstein AD, Gan YC, Bonilha VL, Finnemann SC, Csaky KG, Rodriguez-Boulan E. Apical polarity of N-CAM and EMMPRIN in retinal pigment epithelium resulting from suppression of basolateral signal recognition. *J Cell Biol.* 1998; 142 (3): 697-710.
42. Martins VL, Caley M, O'Toole EA. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell Tissue Res.* 2013; 351 (2): 255-68.
43. Matsui H, Yamasaki M, Nakata K, Amano K, Nakamura H. Expression of MMP-8 and MMP-13 in the development of periradicular lesions. *Int Endod J.* 2011; 44 (8): 739-45.
44. Menezes-Silva R, Khaliq S, Deeley K, Letra A, Vieira AR. Genetic susceptibility to periapical disease: conditional contribution of MMP2 and MMP3 genes to the development of periapical lesions and healing response. *J Endod.* 2012; 38 (5): 604-7.
45. Muramatsu T, Miyauchi T. Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol Histopathol.* 2003; 18 (3): 981-7.
46. Nabeshima K, Iwasaki H, Koga K, Hojo H, Suzumiya J, Kikuchi M. Emmprin (basigin/CD147): matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression. *Pathol Int.* 2006; 56 (7): 359-67.
47. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000.* 2006; 40: 11-28.
48. Noguchi Y, Sato T, Hirata M, Hara T, Ohama K, Ito A. Identification and characterization of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human

- endometrium during the menstrual cycle in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88 (12): 6063-72.
49. Omi Y, Shibata N, Okamoto T, Obara T, Kobayashi M. The role of CD147 in the invasiveness of follicular thyroid carcinoma cells. *Thyroid.* 2012; 22 (4): 383-94.
50. Paula-Silva FW, da Silva LA, Kapila YL. Matrix metalloproteinase expression in teeth with apical periodontitis is differentially modulated by the modality of root canal treatment. *J Endod.* 2010; 36 (2): 231-7.
51. Ricucci D, Siqueira JF Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod.* 2010; 36 (8): 1277-88.
52. Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. the role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater.* 2008; 15 (1): 53-76.
53. Shin SJ, Lee JI, Baek SH, Lim SS. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *J Endod.* 2002; 28 (4): 313-5.
54. Shin SJ, Lee W, Lee JI, Baek SH, Kum KY, Shon WJ, et al. Matrix metalloproteinase-8 and substance P levels in gingival crevicular fluid during endodontic treatment of painful, nonvital teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 112 (4): 548-54.
55. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9 (4): 498-521.
56. Stashenko P, Wang CY, Tani-Ishii N, Yu SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 78 (4): 494-502.
57. Tang Y, Kesavan P, Nakada MT, Yan L. Tumor-stroma interaction: positive feedback regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRIN. *Mol Cancer Res.* 2004; 2 (2): 73-80.

58. Tsai CH, Chen YJ, Huang FM, Su YF, Chang YC. The upregulation of matrix metalloproteinase-9 in inflamed human dental pulps. *J Endod.* 2005; 31 (12): 860-2.
59. Tsuji M, Yamasaki M, Amano K, Matsui H, Morimoto T, Nakamura H. Histochemical localization of neutral proteases released during development of rat periradicular lesion. *Arch Oral Biol.* 2009; 54 (12): 1128-35.
60. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003; 92 (8): 827-39.
61. Wahlgren J, Salo T, Teronen O, Luoto H, Sorsa T, Tjaderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpal and periapical inflammation and periapical root-canal exudates. *Int Endod J.* 2002; 35 (11): 897-904.
62. Wang CH, Dai JY, Wang L, Jia JF, Zheng ZH, Ding J, Chen ZN, Zhu P. Expression of CD147 (EMMPRIN) on neutrophils in rheumatoid arthritis enhances chemotaxis, matrix metalloproteinase production and invasiveness of synoviocytes. *J Cell Mol Med.* 2011; 15 (4): 850-60.
63. Wang CH, Yao H, Chen LN, Jia JF, Wang L, Dai JY, et al. CD147 induces angiogenesis through a vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible transcription factor 1alpha-mediated pathway in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2012; 64 (6): 1818-27.
64. Woessner JF, Nagase H. Matrix metalloproteinases and TIMPs. Oxford, UK: Oxford University Press; 2000.
65. Yang X, Zhang P, Ma Q, Kong L, Li Y, Liu B, et al. EMMPRIN silencing inhibits proliferation and perineural invasion of human salivary adenoid cystic carcinoma cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther.* 2012; 13 (2): 85-91.

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 07 de março de 2013

Natália Guimarães Kalatzis Sousa