



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

SABRINA GARCIA DE AQUINO

Expressão de MMP-13 e ativação de vias de sinalização intracelular
em dois modelos de doença periodontal induzida
experimentalmente em ratos

ARARAQUARA

2008



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

SABRINA GARCIA DE AQUINO

Expressão de MMP-13 e ativação de vias de sinalização intracelular
em dois modelos de doença periodontal induzida
experimentalmente em ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Periodontia

Orientador: *Prof. Dr. Carlos Rossa Junior*

Co-orientador: *Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli*

ARARAQUARA

2008

Aquino, Sabrina Garcia de.

Expressão de MMP-13 e ativação de vias de sinalização intracelular em dois modelos de doença periodontal induzida experimentalmente em ratos / Sabrina Garcia de Aquino. – Araraquara: [s.n.], 2008.

114 f. ; 30 cm.

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

Orientador : Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

1. Metaloproteinase 13 da matriz
 2. Sistema de sinalização das MAP quinases
 3. Fatores de transcrição
 4. Doenças periodontais
 5. Ratos
- I. Título

SABRINA GARCIA DE AQUINO

**EXPRESSÃO DE MMP-13 E ATIVAÇÃO DE VIAS DE SINALIZAÇÃO
INTRACELULAR EM DOIS MODELOS DE DOENÇA PERIODONTAL
INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE EM RATOS**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

2º Examinador: Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio

3º Examinador: Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach

Araraquara, 17 de março de 2008.

DADOS CURRICULARES

SABRINA GARCIA DE AQUINO

NASCIMENTO: *17.07.1980 – São Paulo/SP*

FILIAÇÃO: Gentil Carneiro de Aquino Junior
Antonia Garcia de Aquino

2000 - 2005: Curso de Graduação
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

2006: Curso de Pós – Graduação em Periodontia
Nível: Mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Dedicatória

A Deus

Sempre presente, seja nos momentos de dificuldade e tristeza, bem como nos de alegria e conquistas como este, iluminando o meu caminho para que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais

Apesar da distância e de meus momentos de ausência, vocês sempre estiveram ao meu lado. A princípio, questionaram minha escolha, mas depois, percebendo a importância que esta conquista significaria para mim, me apoiaram e incentivaram. Sem as oportunidades que vocês me proporcionaram, desde sempre, nada disso seria possível. Amo vocês.

Aos amigos e familiares

Àqueles que, seja perto ou distante, verdadeiramente torceram por mim durante todo esse tempo, me incentivando a continuar, dando conselhos e também broncas quando preciso. Compartilho com vocês esse grande momento.

Ao Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

Sem a sua competência, que alia inteligência e profissionalismo, sua dedicação e paciência (às vezes repentinamente perturbada), nada disso seria possível. Posso dizer com muito orgulho que você, Carlinhos, foi meu orientador no verdadeiro sentido da palavra. É privilégio de poucos deter características tão especiais e fundamentais para se ter caráter: sinceridade e senso de justiça e você é uma dessas pessoas. Obrigada por tudo.

Agradecimentos

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

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, nas pessoas de sua Diretora, Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, e Vice-Diretor, Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla.

Ao Prof. Joni, pela atenção e disponibilidade dedicada nessa etapa final. Obrigada por aceitar esse desafio dentre muitos que virão pela frente.

A todos os docentes do Curso de Pós-Graduação e aos docentes da Disciplina de Periodontia: Prof. Carlinhos, Adriana, Silvana, Egbert, Elcio, José Eduardo e Joni, pela formação e orientação.

À minha turma do curso de Pós-Graduação: Aline, Andrés, Marina, Nana, Roberta, Rodrigo, Romeu, Rubens, Wagner e Yeon. Apesar da correria e desencontros devido aos nossos trabalhos, compartilhamos momentos especiais de aprendizado e descontração durante o curso.

Aos demais companheiros do curso de Pós-Graduação que percorreram comigo esse caminho, compreendendo as nossas aflições de iniciantes e muitas vezes trocando experiências e nos orientando.

A todos os funcionários da Faculdade, em especial:

- da Disciplina de Periodontia, entre estes: Claudinha, Regina Lúcia, D. Maria do Rosário, Zezé, Thelma, Sueli e Toninho, pela compreensão e prestatividade

- da Biblioteca, entre estes: Adriano, Ceres, Eliane, Maria Helena e Sílvia pela colaboração.

- da Seção de Pós-Graduação, Alexandre, Flávia, Mara e Rosângela, pela paciência e cooperação.

- à Edineide e José Antonio, pela disponibilidade e ajuda.

Às queridas Claudinha e Regina Lúcia, pela competência no trabalho, cooperação e paciência. Considero vocês pessoas muito especiais.

À nossa equipe de trabalho: Carlinhos, Fabio, Morgana, Juliete e professores colaboradores: Dagmar e Luis Spolidório, pela ajuda e cooperação na realização deste trabalho

À CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro, sem o qual não poderia realizar este trabalho

A todos os meus companheiros de laboratório, alguns sempre presentes durante essa importante caminhada: Fabio, Morgana, Rafaela, Tete, João e Rafael, pelas várias horas de convivência, onde tive muito trabalho e pude contar com vocês, além dos momentos de brincadeira que dividimos, fazendo com que nossos dias inteiros no laboratório se tornassem um divertido aprendizado

Às amigas e companheiras Morgana e Rafaela, obrigada por tudo: pelas risadas, companheirismo, conselhos e ajuda em todos os sentidos. Contem sempre com a minha humilde amizade e admiração

Às minhas companheiras de república, que se tornaram parte da minha família, pessoas muito queridas que, durante esse meu atribulado caminho, estiveram sempre presentes: incentivando, ajudando, compreendendo a minha correria, me aconselhando e ouvindo. Vocês foram muito importantes nessa minha caminhada e cada uma merece um agradecimento especial.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	8
Resumo.....	9
Abstract.....	11
Introdução.....	13
Proposição.....	28
Capítulo 1.....	30
Capítulo 2.....	55
Metodologia.....	81
Discussão.....	92
Conclusão.....	102
Referências.....	104
Anexos.....	113

Lista de abreviaturas

AP1: activating protein-1

ARE: AU-rich elements

C/EBP: CAAT/enhancer-binding protein

COX-2: cyclooxygenase-2

CREB: cAMP response element-binding

ELK 1: ETS-domain protein-1 ou ETS-like protein-1

ERK-1 e -2: extracellular-regulated kinases 1 e 2

ECM: extracellular matrix

GCF: gingival crevicular fluid

IL1- α : interleukin 1- α

IL1- β : interleukin 1- β

IL6: interleukin 6

I κ B: inhibitor of kappa B

JAK/STAT: Janus kinase/ signal transducers and activators of transcription

JNK: c-Jun N-terminal kinase

MAPK: mitogen-activated protein kinase

Mkk3/6: mitogen-activated protein kinase kinase 3/6

MMP: matrix metalloproteinase

NO: nitric oxide

NF- κ B: nuclear factor kappa B

OSE-2: osteoblast-specific transcription factor Cbfa1

OsM: oncostatin-M

PGE₂: prostaglandin E₂

PI3 kinase: phosphatidylinositol 3-kinase

Runx-2: runt-related transcription factor 2

TGF- β : transforming growth factor β

TIMPs: tissue inhibitors of MMPs

TNF- α : tumor necrosis factor α

Aquino SG. Expressão de MMP-13 e ativação de vias de sinalização intracelular em dois modelos de doença periodontal induzida experimentalmente em ratos [dissertação mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

Resumo

A progressão da doença periodontal é marcada pela excessiva produção de citocinas que, por sua vez, promove o aumento de outros mediadores inflamatórios, entre os quais, de metaloproteinases de matriz (MMPs). MMP-13 é uma colagenase de regulação complexa que tem sido relacionada à degradação da matriz extracelular (ECM) e à reabsorção óssea em diversas condições inflamatórias, incluindo doença periodontal e artrite reumatóide. A regulação da expressão gênica requer a ativação de várias vias de sinalização através da interação de receptores celulares específicos a estímulos externos, como antígenos bacterianos e citocinas derivadas do hospedeiro. A complexidade da rede de citocinas estabelecida durante a progressão da doença periodontal depende das vias de sinalização ativadas, as quais são influenciadas pela natureza do estímulo extracelular. Considerando o papel fundamental das vias de sinalização no controle da expressão gênica de citocinas e a relevante atividade de MMP-13 na doença periodontal, este estudo avaliou a expressão de MMP-13 e as vias de sinalização ativadas durante o curso de dois modelos de doença periodontal induzida experimentalmente. A expressão de MMP-13 nos níveis de RNA mensageiro (mRNA) e proteína foram avaliados por RT-PCR e Western Blot, respectivamente. A cinética de ativação das vias de sinalização intracelular relacionadas à expressão de mediadores inflamatórios também foi verificada por Western Blot. Estes achados foram relacionados à severidade da reação inflamatória determinada por estereometria. Dois modelos experimentais foram usados: injeção de LPS e colocação de ligadura. Injeções de LPS de *Escherichia coli* foram realizadas na região palatina de molares superiores 2 vezes por semana (30 µg por aplicação). Ligaduras foram colocadas na região cervical dos primeiros molares inferiores. O grupo controle recebeu injeções de PBS (veículo) na gengiva palatina dos primeiros molares superiores, enquanto

ligaduras não foram colocadas nos molares inferiores. Amostras foram coletadas 5, 15 e 30 dias após a indução da doença periodontal e processadas para extração de RNA total e proteína, assim como rotineiramente processadas para análise histológica/estereométrica. Um aumento significativo da severidade da inflamação foi observado em ambos os modelos já no período de 5 dias. Entretanto, o modelo de ligadura mostrou uma diminuição da intensidade da inflamação aos 30 dias, que não foi observada no modelo de injeção de LPS. O perfil de expressão dos níveis de mRNA de MMP-13, assim como a cinética das vias de sinalização ativadas durante o curso da doença periodontal foram distintos segundo o modelo experimental mas, em geral, acompanharam a severidade do processo inflamatório. De forma interessante, não houve correlação entre os níveis protéicos e de mRNA de MMP-13 em ambos os modelos, sugerindo uma regulação pós-transcricional da expressão de MMP-13 *in vivo*. Além disso, p38 e ERK MAPkinases, assim como NF-κB foram ativadas nos dois modelos de doença periodontal, embora com cinética distinta; enquanto ativação de STAT3 e STAT5 foi verificada apenas no modelo de ligadura. Estes achados sugerem uma ativação diferencial de receptores celulares em cada forma de indução da doença periodontal, o que determina diferenças temporais e qualitativas nas redes de sinalização intracelular ativadas e influencia a regulação da expressão gênica de MMP-13 em cada modelo experimental.

Palavras-chave: Metaloproteinase 13 da matriz; sistema de sinalização das MAP Quinases; fatores de transcrição; doenças periodontais; ratos.

Aquino SG. MMP-13 expression and signaling pathways activated in two models of experimentally-induced periodontal disease in rats [dissertação mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

Abstract

The hallmark of destructive periodontal disease progression is the overproduction of cytokines which promotes the increased expression of other inflammatory mediators such as, MMPs. MMP-13 is a collagenase of complex gene regulation that has been implicated on ECM degradation and bone resorption in several inflammatory conditions, including periodontal disease and rheumatoid arthritis. Regulation of gene expression requires the activation of several signaling pathways through receptor-ligand binding of external stimuli represented by bacterial antigens and/or host-derived cytokines. The complexity of the cytokine network established during periodontal disease progression results from the signaling pathways activated, which are determined by the nature of external stimuli. Thus, considering the fundamental role of signaling pathways on regulation of cytokine gene expression and the relevant role of MMP-13 in periodontal disease, this study evaluated the expression of MMP-13 and the signaling pathways activated during the course of two experimentally-induced periodontal disease models. Expression of MMP-13 at mRNA and protein levels was evaluated by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western Blot, respectively. The activation kinetics of some signaling pathways that are related to the expression of inflammatory mediators was also verified by Western Blot. The two experimental models used were: LPS injections and placement of ligatures. Bi-weekly injections of *Escherichia coli* LPS were done into the palatal aspect of upper molars (30 µg per injection). Ligatures were placed at the cervical portion of both lower first molars. The control animals received injections of PBS vehicle on the palatal gingiva of upper molars, whereas no ligatures were placed on the lower molars. Samples were collected 5, 15 and 30 days after beginning of periodontal disease induction and processed for extraction of total RNA and protein, as well as routinely processed for histology/estereometry. A significant increase on the severity of inflammation was observed in both experimental models already at

the 5-day period. However, the ligature model presented a significant decrease on the intensity of inflammation at the 30-day period, which was not observed with the LPS injection model. MMP-13 expression profile, as well as the kinetic of signaling pathways activated during periodontal disease were somewhat different according to each experimental model, however paralleled the severity of inflammation. Interestingly, there was no transcription-translation coupling for MMP-13 in both models, suggesting a post-transcriptional regulation of MMP-13 expression *in vivo*. Moreover, p38 and ERK MAPkinases, as well as NF- κ B were activated in both periodontal disease models, however with different kinetics, whereas activation of STAT3 and STAT5 was verified only on the ligature model. These findings suggest a differential activation of cellular receptors in each model of experimentally-induced periodontal disease, which results in temporal and qualitative differences on the signaling network and influences MMP-13 gene regulation in each experimental model.

Keywords: Matrix metalloproteinase 13; MAPKinases signaling system; transcription factors; periodontal diseases; rats.

Introdução

Atualmente é bem estabelecido que a resposta inflamatória/imune tem papel fundamental na manutenção de uma condição fisiológica ou no estabelecimento e progressão de processos patológicos de caráter auto-imune, inflamatório ou infeccioso, como as doenças periodontais. A determinação do estado de normalidade ou de doença depende da atividade de potentes mediadores de comunicação celular: as citocinas³⁰.

As citocinas, por sua vez, são polipeptídeos produzidos e secretados frente à presença do microrganismo ou outros antígenos desencadeando respostas celulares diversas que medeiam e regulam processos fisiológicos importantes, como o desenvolvimento de células hematopoiéticas, das reações imunes e inflamatórias¹⁹. No entanto, quando sintetizadas em níveis elevados, as citocinas modificam o padrão de resposta celular, participando substancialmente no desenvolvimento de patologias de caráter inflamatório crônico, como é o caso das doenças periodontais²⁰.

As doenças periodontais são infecções nas quais os microrganismos Gram-negativos têm papel fundamental^{17,37,68} e sua progressão é decorrente de um desequilíbrio no processo dinâmico saúde-doença entre a microbiota periodontopatogênica do biofilme dental e a resposta do hospedeiro frente à agressão¹⁹. Esta pode ocorrer diretamente, por meio da liberação de toxinas e produtos do metabolismo microbiano, ou de forma indireta através da indução de uma resposta inflamatória/imune do hospedeiro, com a produção e liberação de diversos mediadores e subsequente dano tecidual⁶⁸.

Assim, a resposta imune/inflamatória tem um papel fundamental na doença periodontal, já que a extensão e grau de destruição tecidual são determinados, sobretudo, pelo balanço entre os níveis de citocinas pró e

antiinflamatórias e seus antagonistas⁵⁰, o que classifica a doença periodontal como uma infecção mediada e modulada pelo hospedeiro, com aspectos histológicos e imunológicos semelhantes a outras alterações de caráter inflamatório crônico, como a artrite reumatóide^{6,22}.

Sendo o padrão de resposta inflamatória/imune regulado pelas citocinas, existem abundantes evidências de alterações na expressão destas moléculas imunorreguladoras, com elevados níveis de TNF- α (*tumor necrosis factor α*), IL-1 β (*interleukin-1 beta*), IL-6 (*interleukin-6*) e PGE₂ (*prostaglandin E₂*) encontrados em sítios doentes em comparação aos presentes em condições de saúde clínica^{10,14,16,19,72}.

Esse desequilíbrio pode então resultar em destruição dos tecidos periodontais mineralizados e/ou não-mineralizados por efeitos diretos destas citocinas ou indiretos, por meio da indução (autócrina ou parácrina) da expressão de outros mediadores biológicos por células inflamatórias e residentes, como, por exemplo, as metaloproteinases de matriz (*matrix metalloproteinases* ou MMPs)²¹.

MMPs constituem uma família de proteases neutras dependentes de íons metálicos (Cálcio e Zinco), fundamentais na degradação da matriz extracelular (*extracellular matrix* ou ECM), um dos principais eventos em diversos processos fisiológicos e patológicos⁸¹. Entre os 25 membros já identificados, 24 estão presentes no genoma de mamíferos e mais especificamente, 22 em humanos⁷⁰. Apesar de geneticamente distintas, estas endoproteases possuem características bioquímicas e estruturais semelhantes, como a presença de pelo menos 2 domínios conservados: o pró-domínio e o domínio catalítico, sendo este o segmento ativo que apresenta o íon Zinco em sua estrutura, necessário para a conversão da forma latente/ pró-enzima para a

forma ativa/catalítica, mediante interação com resíduos de cisteína do pró-domínio e sua conseqüente ruptura⁵¹.

Além do fundamental papel em processos de remodelação de ECM, atualmente se reconhece a atuação das MMPs na modulação da resposta imunológica, regulando a atividade ou inibição de outras proteases e inibidores, além de proteínas não pertencentes à matriz como citocinas, quimiocinas, receptores, peptídeos antimicrobianos e também a função e liberação de fatores de crescimento^{12, 40, 57}.

Considerando as características estruturais e funcionais, estas foram classificadas de acordo com a especificidade de substrato em: colagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, MMPs de membrana e outras^{5,13}. A subfamília das colagenases é composta por 3 membros que apresentam variações de atividade catalítica segundo o tipo de colágeno: MMP-1 (colagenase 1 ou intersticial) degrada principalmente colágeno tipo III; MMP-8 (colagenase 2 ou derivada de neutrófilos) atua mais sobre colágeno tipo I e MMP-13 (colagenase 3) é uma potente enzima colagenolítica e gelatinolítica, com capacidade de digerir colágeno tipo II com uma eficiência 6 a 10 vezes maior que os tipos I e III e apresenta uma atividade de gelatinase 40 vezes mais forte que MMP-1 e MMP-8²⁹.

Em condições fisiológicas, o nível de expressão de MMPs é baixo e compatível com uma remodelação da ECM, com a participação dessas endoproteases em eventos importantes como: embriogênese, reparo ósseo normal, ovulação e cicatrização⁸¹. No entanto, níveis elevados são verificados em patologias caracterizadas pela degradação de cartilagem e tecido conjuntivo⁴³. Nestes eventos, as colagenases parecem ter uma fundamental participação, não apenas pela grande proporção de colágeno intersticial

(principal substrato) presente, mas, sobretudo, pela exclusiva habilidade destas enzimas em iniciar a clivagem da tripla hélice de colágeno, disponibilizando esse substrato para posterior degradação por outras MMPs⁷⁹. Assim, não só a especificidade de substrato, como também o padrão de expressão das MMPs varia, sendo a MMP-13 a collagenase com padrão de substrato mais amplo, incluindo colágenos tipo: I, II, III, IV, X, XIV, tenascina, fibronectina e agrecan (proteoglicana mais abundante na cartilagem articular)²⁸. Além disso, é importante destacar que a MMP-13 apresenta a expressão mais estritamente regulada^{58,71}.

Esta protease foi originalmente descoberta em uma biblioteca de cDNA de carcinoma de mama humano¹³ e atualmente está associada a diversos processos patológicos, incluindo carcinoma de células escamosas, osteoartrite, artrite reumatóide, metástase tumoral em tecido ósseo, doenças cardiovasculares⁴ e doenças periodontais²⁵. Nestas desordens, além da degradação da ECM e reabsorção óssea, observa-se uma reação inflamatória - imune, com altos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Visto que a expressão gênica de MMPs é regulada por diversos mediadores inflamatórios, como as citocinas e prostaglandinas⁵⁰ estes, então, são capazes de induzir a produção de MMPs por diferentes tipos de células residentes e inflamatórias. Assim, a expressão de MMP-13 por condrócitos articulares é induzida por IL-1 (principal citocina envolvida na patogênese da artrite)^{1,35,41}, TNF- α ³⁶ e também por oncostatina M (*oncostatin M* ou OsM) associada ou não a outras citocinas pró - inflamatórias¹¹. Já em células endoteliais, o óxido nítrico (*nitric oxide* ou NO) atua na regulação da expressão de MMP-13 em nível transcricional⁸⁴. Em fibroblastos de ratos, foi observado um aumento da expressão desta collagenase após tratamento com IL-6, por ação na região AP-1 (*activating*

protein-1) do promotor proximal do gene da MMP-13⁶⁹. Citocinas associadas à reabsorção óssea como: PGE₂, IL1-β e TNF-α, também elevaram os níveis de RNA mensageiro (mRNA) de MMP-13, MMP-3, MMP-9 e de inibidores teciduais de metaloproteinases (*tissue inhibitors of MMPs* ou TIMPs) 1 e 3 em cultura de osteoblastos^{75,78}.

Os TIMPs são um grupo de 4 reguladores funcionais endógenos com reconhecido potencial de inibição da atividade de MMPs⁴. O balanço entre a atividade destes inibidores naturais e de MMPs determina o grau de degradação da ECM. No entanto, uma variedade de mediadores bioquímicos influencia nesse equilíbrio: fatores de crescimento, hormônios, produtos oncogênicos e os níveis de citocinas pró – e antiinflamatórias⁷⁵.

Especificamente nas lesões periodontais, são observados elevados níveis de citocinas como: IL-1β, IL-6, TNF-α e PGE₂^{33,59}. Diversos estudos *in vitro* utilizando fibroblastos do ligamento periodontal foram realizados, com o intuito de investigar o efeito de diferentes mediadores inflamatórios na expressão de MMP-13^{34,46,58,63}. O uso de deste tipo celular é justificado pela sua prevalência no ligamento periodontal e por apresentar características fenotípicas de osteoblasto, sendo então fundamental na manutenção e remodelação tecidual e também em processos patológicos de degradação da ECM²³. Estímulo com TGFβ-1 sobre fibroblastos gengivais humanos induziu a expressão de MMP-13, verificada em níveis de mRNA e protéico^{34,58}. O grupo de Nishikawa et al.⁴⁶, avaliou o efeito de TNF-α sobre a expressão de MMP-13 em nível de mRNA por RT-PCR, demonstrando um aumento tempo e dose-dependente desta colagenase em fibroblastos do ligamento periodontal humano, evento sobre o qual PGE₂ apresentou uma regulação negativa, ou seja, em presença de PGE₂, ocorre uma diminuição dos níveis de MMP-13

induzidos por TNF- α . Neste trabalho, foi ainda verificado que a expressão de PGE₂ é dependente de COX-2 (*cyclooxygenase-2*), resultado confirmado por Noguchi et al.⁴⁷, assim como o efeito inibitório de PGE₂ sobre a expressão de MMP-13 induzida por IL1- α , sugerindo a participação indireta de PGE₂ na regulação da degradação da ECM, via modulação da expressão de MMP-13, na lesão periodontal.

Além disso, diversos estudos in vivo confirmam a presença e atividade de MMP-13 nos tecidos periodontais, seja em eventos fisiológicos de remodelação óssea e da ECM^{58,73}, assim como no quadro inflamatório crônico das doenças periodontais^{24-25,74}. Ravanti et al.⁵⁸, mostraram a participação desta protease na cicatrização normal de feridas de tecido gengival humano, localizando sua expressão por imunohistoquímica. MMP-13 também foi verificada por Takahashi et al.⁷³, durante a movimentação dental ativa em ratos, por hibridização in situ e RT-PCR. Este estudo mostrou a expressão de MMP-13, sobretudo no lado de compressão, associado à reabsorção óssea, por osteócitos e células do ligamento periodontal próximas à linha de reabsorção, mostrando mais uma vez o importante papel desta collagenase na remodelação tecidual.

Devido à atividade proteolítica destrutiva, que é associada a elevados níveis de expressão de MMP-13, sua expressão em amostras de tecido periodontal e no fluido crevicular gengival (*gingival crevicular fluid* ou GCF) de pacientes portadores de doença periodontal, também foi estudada^{24-25,74}. Nestes trabalhos, amostras de GCF foram utilizadas para análise das diferentes formas moleculares de MMP-13: ativa (48 kDa) e pró-ativa (60 kDa)⁷⁵, bem como de outras MMPs por *Western blot*. Já as amostras de tecido gengival eram processadas para a técnica de hibridização in situ e/ou

imunohistoquímica para localização da expressão. Tervahartiala et al.⁷⁴ verificaram a presença de altos níveis de MMP-13 no epitélio sulcular e em fibroblastos e macrófagos dos tecidos com periodontite em comparação às amostras teciduais sadias, resultados semelhantes aos obtidos pelo grupo de Kiili et al.²⁵, embora este não tenha observado marcação imunohistoquímica em fibroblastos. Neste trabalho, ainda, avaliou-se a expressão de MMP-13 no GCF após raspagem e alisamento radicular. Apesar de uma redução com o tratamento mecânico, a expressão de MMP-13 permaneceu em níveis consideráveis, sugerindo a participação desta protease também na fase de reparo/cicatrização tecidual. Variações na proporção das formas moleculares pró-ativa e ativa de MMP-13 foram encontradas nos resultados de *Western blot* destes estudos. A forma ativa de MMP-13 foi a mais prevalente no GCF dos pacientes com doença periodontal, embora as formas pró-ativa (60 kDa) e complexa (>100 kDa) também pudessem ser detectadas.

Os níveis de cada forma molecular e, portanto, a atividade catalítica das MMPs, pode ser regulado pelos níveis de citocinas⁵⁰, como também pela interação destas endoproteases com seus inibidores naturais (TIMPs)²⁵. Além disso, um grande número de inibidores sintéticos de MMPs tem sido avaliado para aplicações terapêuticas em diversas patologias, com alguns sendo, inclusive, testados em ensaios clínicos no tratamento da artrite reumatóide e câncer⁴², porém apresentando pequena eficácia. Esta falha é atribuída à falta de seletividade/especificidade destes inibidores⁴⁴, podendo desencadear efeitos colaterais severos como a síndrome músculo-esquelética, com o enrijecimento de articulações em consequência da interferência com a remodelação normal da ECM⁶⁰. Assim, inibidores menos potentes, como os à base de tetraciclina, estão sendo vistos como uma alternativa mais segura, pois

reduzem apenas os níveis patológicos de MMPs⁵⁶. Somado à ausência de especificidade, o conhecimento ainda limitado das funções das MMPs, tanto em condições fisiológicas como em patologias, pode influenciar negativamente na obtenção de um inibidor satisfatório⁶⁰. Portanto, o melhor entendimento do padrão de expressão e dos mecanismos moleculares de regulação da expressão de MMP-13, pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas direcionadas à inibição desta colagenase.

No entanto, é importante ressaltar que, em níveis adequados, a atividade da MMP-13 é necessária em determinados eventos, como desenvolvimento ósseo-endocondral, papel demonstrado em camundongos deficientes para MMP-13 por Kosaki et al.³¹. Através da análise de fratura produzida na tíbia desses animais, pôde se observar que a falta de MMP-13 promove um atraso no processo de reparo, com aumento da zona hipertrófica de cartilagem e retardo na reabsorção desta, pelo impedimento de penetração de condroclastos e capilares na cartilagem. O ensaio de angiogênese *in vitro* em *pellet* de cultura de condrócitos demonstrou a importância da MMP-13 na maturação dessas células e na indução vascular, outros eventos fundamentais para o reparo tecidual.

Em relação à expressão e regulação de MMP-13, existem evidências indicando uma variação significativa segundo o tipo celular, como demonstrado por Uchida et al.⁷⁵. Neste trabalho, o efeito de diferentes mediadores biológicos associados à reabsorção óssea sobre a expressão de MMPs e TIMPs, foi investigado em 3 diferentes grupos de células osteoblásticas de camundongos: linhagem MC3T3-E1 e culturas primárias de osteoblastos e de células da calvária de camundongo. Em relação ao controle, todos os fatores utilizados

aumentaram a expressão de MMP-13 nas três culturas, mas com padrões de indução distintos entre as diferentes linhagens.

A natureza do estímulo extracelular também exerce influência na expressão e regulação da MMP-13⁸³. Com o intuito de mimetizar a força fisiológica externa que localmente guia o processo de remodelação óssea, processo que requer degradação de ECM com participação de MMP-13, Yang et al.⁸³ realizaram a aplicação de força mecânica sobre células osteoblásticas MC3T3-E1 aderidas em membrana flexível de colágeno e verificaram uma indução da expressão e atividade de MMP-13.

Além disso, diversos mecanismos moleculares podem estar envolvidos na regulação da expressão de MMP-13. Mecanismos pós-transcricionais de regulação de expressão gênica relacionam-se com a modulação da estabilidade do mRNA, que pode ocorrer por meio da interação de uma proteína ao RNA no citosol em segmentos (*motifs*) das regiões 5' e 3' não-traduzidas, como as regiões ricas em adenosina-uridina (*AU-rich elements ou ARE*). Rydzziel et al.⁶⁵, por exemplo, demonstraram que o aumento dos níveis de mRNA de MMP-13 induzido por cortisol em osteoblastos é decorrente da estabilização do transcrito mediada por regiões ARE da porção 3' não traduzida de MMP-13.

Mecanismos transcricionais também participam efetivamente da regulação da MMP-13, através da ativação diferencial de diversos fatores de transcrição^{41,63,67,78}. A ativação de NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), por exemplo, está associada a diversas condições inflamatórias crônicas, como aterosclerose, artrite reumatóide e as doenças periodontais⁴⁵. Basicamente, esta ativação (dependente de um estímulo externo que é internalizado e transmitido por alterações conformacionais de proteínas citoplasmáticas

ativadas em direção ao núcleo), é decorrente da dissociação entre a subunidade reguladora I κ B (*inhibitor of kappa B*) e NF- κ B (promovida por fosforilação) e permite a translocação deste fator de transcrição para o núcleo, seguida da interação com as sequências de DNA apropriadas no promotor do gene alvo, iniciando a transcrição. Importantes mediadores inflamatórios requerem a ativação de NF- κ B para sua expressão gênica, como as citocinas: IL-1, IL-6 e TNF- α , além de MMP-1 e MMP-13⁷⁹. Em relação à MMP-13, trabalhos *in vitro* demonstram a participação de NF- κ B na regulação de sua expressão^{35-36,79}. Liacini et al.³⁵⁻³⁶, por exemplo, demonstraram através do uso de inibidor específico para NF- κ B, o envolvimento deste fator de transcrição na expressão de MMP-13 induzida por IL-1 e TNF- α em condrócitos articulares de humanos. Além disso, o bloqueio direto da via de NF- κ B em células articulares tem sido sugerido como terapia viável na redução da transcrição de MMPs na artrite⁷⁹. Dessa forma, a investigação da ação de NF- κ B sobre a expressão de MMP-13 em um modelo *in vivo* de doença periodontal, que apresenta fisiopatologia semelhante à artrite, pode ser interessante.

Vários sítios potenciais de ligação de fatores de transcrição, incluindo AP-1, PEA3, SP1, Runx2, p53, NF- κ B, OSE-2, C/EBP, CREB e Elk-1 são encontrados no promotor proximal do gene da MMP-13^{54,67,76,82}. No entanto, a ativação de fatores de transcrição específicos depende diretamente do estímulo extracelular e das vias de sinalização intracelular utilizadas. Nesse sentido, diversos estudos sobre regulação da expressão de MMP-13 realizados em condrócitos articulares demonstram que o estímulo por diferentes citocinas pró-inflamatórias como IL-1, TNF- α e OsM, por exemplo, promovem o recrutamento de fatores de transcrição específicos, como: NF κ B, AP-1, Runx-2, dependendo das vias de sinalização implicadas preferencialmente, segundo o

tipo celular^{11,35,41}. Estas vias de sinalização intracelular são constituídas por grupos de proteínas que, após a transdução do sinal para o interior celular, participam de uma cascata de eventos de fosforilação, que culminam na ativação de fatores de transcrição, promovendo assim a expressão de determinado gene⁷⁹. Especificamente na regulação da expressão de MMP-13, diversos estudos demonstram o envolvimento de diferentes cascatas de proteínas kinase ativadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinases*, ou MAPK) como a família de serina-threonina kinases: ERK-1 e -2 (*extracellular-regulated kinases*)^{11,36,83}; JNK (*c-Jun N-terminal kinase*)^{36,41}, e p38^{34,36,58,62-63}.

ERK-1/2 são kinases ativadas primariamente por mitógenos e fatores de crescimento, enquanto considera-se que fatores indutores de estresse e citocinas pró-inflamatórias sejam os principais ativadores de JNKs e p38 kinases^{52,79}, o que é suportado pela demonstração de que a ativação da via MKK3-p38, (*mitogen-activated protein kinase kinase 3-p38*) promove a transcrição de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6, PGE₂⁵². No entanto, existem evidências de ativação cruzada e interações em diversos níveis entre as principais vias das MAPKinases, incluindo ERK e p38^{55,80}.

Diversos trabalhos *in vitro* têm sido realizados em fibroblastos do ligamento periodontal, investigando o papel das MAPKinases na indução de genes ligados à resposta inflamatória por diferentes estímulos^{52,58,62-63}.

Um destes estudos avaliou o papel das MAPKinases na expressão e regulação de MMP-13 em fibroblastos do ligamento periodontal em resposta a estímulos inflamatórios⁶³. Foi constatado que a p38 MAPKinase está envolvida na regulação negativa da expressão de MMP-13 induzida por IL-1 β e TNF- α , tanto a nível de mRNA quanto de proteína. Este processo envolve mecanismos transcricionais e ocorreu mesmo com a inibição de MKK3/6 (*mitogen-activated*

protein kinase kinase 3/6), ativadores da p38 MAPKinase na cascata de sinalização intracelular. No entanto, após estímulo dessa mesma linhagem celular com LPS bacteriano, a expressão gênica de MMP-13 foi regulada positivamente (isto é, inibição da via de sinalização resultou em redução da expressão gênica) tanto por p38 quanto por ERK MAPKinases⁶². Existem ainda outros estudos enfatizando o crucial papel de p38 MAPKinase na expressão de MMP-13 (induzida por TGF- β) em fibroblastos gengivais e de pele, com uma menor atuação de ERK-1/2⁵⁸. Por outro lado, em condrócitos articulares, a expressão de MMP-13 é mediada sobretudo por interação entre outras vias de sinalização que não a de p38¹¹.

Dessa forma, uma mesma via de sinalização intracelular pode ser ativada por diferentes estímulos e dependendo destes, promover uma regulação diferencial da MMP-13. Um mecanismo possível é a existência de ramificações e interações entre estas vias de sinalização, o que pode resultar na ativação diferencial de fatores de transcrição, repressores da transcrição ou outros reguladores negativos os quais modularão a expressão gênica de MMP-13. Isto também pode ocorrer de forma indireta, com a indução de genes de resposta precoce (por exemplo, PGE₂) após o estímulo, os quais irão modular a expressão de MMP-13⁶³.

Estudo recente de El Mabrouk et al.¹¹ em cultura primária de condrócitos obtida de pacientes com artrite, demonstrou a participação não só das MAPKinases na expressão de MMP-13 induzida por OsM, mas sua interação com as vias JAK-STAT (*Janus kinase-signal transducers and activators of transcription*) e PI3 kinase (*phosphatidylinositol 3-kinase*), sugerindo a inibição de moléculas da cascata intracelular como alternativa terapêutica. Nesse sentido, diversas formas de intervenção sobre a rede de citocinas têm sido

exploradas, incluindo o uso de receptores solúveis, assim como de anticorpos (como anticorpos anti-TNF- α no tratamento de artrite reumatóide¹⁸ e de inibidores de vias de sinalização intracelular no tratamento de câncer⁷. Para isso, o conhecimento dos mecanismos de modulação da expressão gênica nos diferentes níveis é fundamental.

Com relação à MMP-13, os relatos da literatura evidenciam que sua regulação é complexa e muitos pontos ainda necessitam ser elucidados, entre eles, o papel das MAPKinases e outras vias de sinalização intracelulares, bem como a participação de mecanismos transcricionais e pós-transcricionais de regulação, eventos que estão sumarizados na Figura 1.

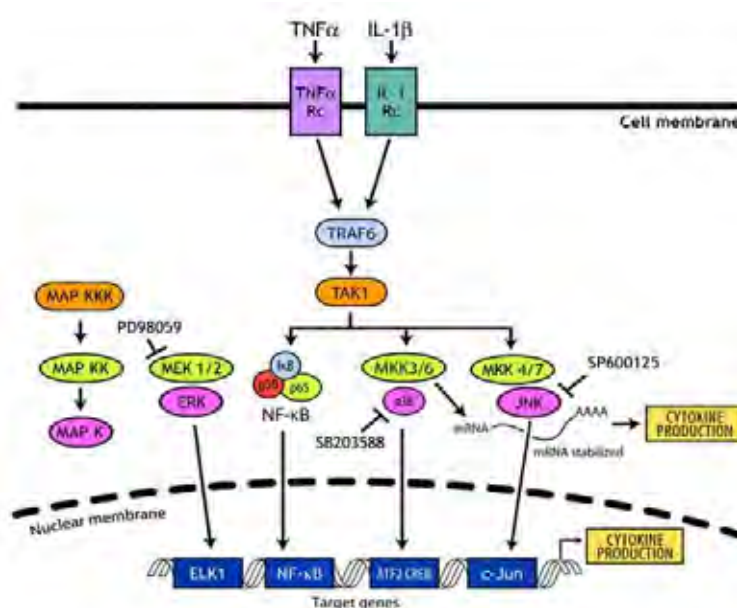


FIGURA 1 – Esquema ilustrativo indicando como estímulos extracelulares distintos podem ativar as mesmas vias de sinalização intracelular, levando à ativação diferencial de fatores de transcrição, afetando assim a expressão dos genes-alvo por mecanismos transcricionais. Deve-se considerar também a existência de mecanismos pós-transcricionais de regulação, mediados por proteínas capazes de se ligar ao mRNA, modulando a expressão gênica ao afetar a meia-vida do mRNA no citoplasma celular. Há, ainda, a possibilidade de regulação indireta por meio da modulação da expressão de outros genes pelos mesmos estímulos extracelulares, bem como de interação entre as vias de sinalização intracelulares. É preciso considerar ainda que a regulação gênica da MMP-13 pode variar segundo o tipo celular considerado.

Assim, uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação da expressão de MMP-13 durante a patogênese da doença periodontal, também pode ser interessante para o entendimento de outras

alterações com mecanismos patogênicos semelhantes, como a artrite reumatóide, para o estudo de forma abrangente da resposta inflamatória/imune, como também ter importantes implicações terapêuticas. O estudo em especial do papel das vias de sinalização intracelular envolvidas, pode gerar novas estratégias com objetivo de inibir/minimizar o dano tecidual, baseadas no uso de compostos bioquímicos que possam interferir nos mecanismos de regulação da expressão gênica em nível molecular, na tentativa de modular assim a resposta inflamatória.

Proposição

Considerando a relevância da MMP-13 na patogênese das doenças periodontais, este estudo teve como objetivos:

1 - Avaliar a expressão de MMP-13 em dois modelos de doença periodontal induzida por ligadura ou injeção de LPS em roedores.

2 - Determinar a ativação das vias de sinalização intracelular associadas à inflamação e correlacionar esta informação com a atividade de diferentes fatores de transcrição relevantes para a expressão de MMP-13 em tecidos periodontais patologicamente comprometidos de ratos.

CAPÍTULO 1

Objetivo específico: Avaliar a expressão de MMP-13 em tecidos periodontais patologicamente comprometidos em dois modelos de doença periodontal induzida por ligadura ou injeção de LPS em roedores

Hipótese: A expressão de MMP-13 é aumentada durante a doença periodontal. Contudo, os níveis variam segundo o tipo celular (células epiteliais, fibroblastos gengivais, células do ligamento periodontal, osteoblastos, osteoclastos, células inflamatórias) e natureza do estímulo extracelular.

Abordagem: A expressão gênica de MMP-13 durante a doença periodontal foi avaliada in vivo nos níveis de mRNA e proteína em amostras preparadas por homogenados teciduais por meio de RT-PCR e *Western Blot*, respectivamente. Além disso, a expressão de MMP-13 foi correlacionada com os níveis de inflamação tecidual avaliados por estereometria para as 2 formas de indução experimental da doença periodontal.

Differential regulation of MMP-13 expression in two models of experimentally-induced periodontal disease*

Sabrina Garcia de Aquino, DDS[†], Morgana Rodrigues Guimaraes, DDS[†], Juliete Francisco da Silva*, Dagmar Ruth Stach-Machado, PhD^{*} Luís Carlos Spolidorio DDS, PhD^{**}, Carlos Rossa, Jr., DDS, PhD^{*†}

[†]Department of Diagnosis and Surgery, ^{**}Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry at Araraquara, State University of Sao Paulo (UNESP), Araraquara, SP, Brazil.

*Department of Microbiology and Immunology, Biology Institute, State University at Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Running title: Differential regulation of MMP-13 expression

Key-words: MMP-13, collagenase, periodontal disease, experimental models

Corresponding author:

Carlos Rossa Jr, D.D.S, Ph.D.

Department of Diagnosis and Surgery

School of Dentistry at Araraquara - State University of Sao Paulo (UNESP)

Rua Humaita, 1680

Araraquara, SP 14801-903 Brazil

Tel. (55-16) 3301-6375 Fax. (55-16) 3301-6369

E-mail: crossajr@foar.unesp.br

* Artigo a ser submetido para publicação

Abstract

Objective: Evaluate the expression of MMP-13 during the course of two models experimentally-induced periodontal disease.

Background: MMP-13 is a collagenase with complex regulation that is associated with various diseases characterized by destruction of mineralized and non-mineralized connective tissues, including periodontitis.

Methods: Expression of MMP-13 at mRNA and protein levels was studied during the course of experimentally-induced periodontal disease by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western Blotting, respectively. Two experimental models were used: LPS injections and ligature placement. 30 µg of a PBS solution of LPS from *Escherichia coli* was injected twice a week into the palatal aspect of upper molars. Ligatures were placed at the gingival margin around lower first molars. A sham-operated group received injections of PBS vehicle on the palatal gingivae of upper first molars whereas no ligatures were placed on the lower molars. Samples were collected 5, 15 and 30 days after initiation of periodontal disease and processed for extraction of total RNA and protein, as well as routinely processed for histology/stereometry.

Results: Both experimental models produced a significant increase on the inflammatory infiltrate that paralleled elevated levels of MMP-13 mRNA and protein at 5 and 15 days. The LPS model was associated with a sustained level of inflammation and increased MMP-13 mRNA throughout the 30 days, whereas the ligature model showed a decrease on the severity of inflammation and MMP-13 mRNA at the 30-day period. Interestingly, MMP-13 protein levels were diametrically contrary to the mRNA levels, suggesting that post-transcriptional regulatory mechanisms may play a role on MMP-13 regulation *in vivo*. Moreover, these mechanisms may be different and specific to each experimental model.

Conclusion: MMP-13 expression during LPS- and ligature-induced experimental periodontal disease follows the increase on severity of inflammation at the earliest periods. At 30 days, there is a decrease on the severity of inflammation on the ligature model, and post-transcriptional mechanisms may play a role in modulating MMP-13 protein availability.

Introduction

The profile of cytokines expressed in the course the host immune response has a fundamental role in the maintenance of homeostasis as well as in the initiation and progression of a multitude of pathological processes, including those related with self-immunity, infections and chronic inflammatory diseases, such as periodontal diseases[1, 2]. In chronic inflammatory diseases, the interplay between cytokines and their antagonists will ultimately determine the severity and extent of tissue destruction[3, 4], which may occur either as a direct effect of increased level of cytokines, or as an indirect consequence of cytokine expression[4]. Various biological mediators that are related with mineralized and non-mineralized tissue destruction can be induced by increased levels of cytokines, including matrix metalloproteases (MMPs). MMPs are a family of neutral proteases Zn/Ca-dependent with an essential role in extracellular matrix (ECM) turnover and degradation, one of the most important events in many physiological and pathological processes[5]. Indeed, excessive MMP levels are observed in pathologies related to cartilage and connective tissue degradation, such as rheumatoid arthritis and periodontal diseases[6]. The connective tissue affected in these diseases is characterized by a high content of interstitial collagen, suggesting a fundamental role for the collagenase subfamily of MMPs, which includes MMP-1, MMP-2 and MMP-13. This important role of collagenases is based on the exclusive ability of these enzymes to initiate the cleavage of the triple helical structure of collagen[7]. Among the collagenases, MMP-13 or collagenase-3 has the widest substrate pattern and presents the most strictly regulated expression[8, 9]. MMP-13 was first described on a human breast carcinoma cDNA library[10] and has been related to a number of pathological processes, including squamous cell carcinomas, tumor metastasis, cardiovascular diseases[11], osteoarthritis, rheumatoid arthritis and periodontal diseases[12]. MMP-13 gene expression is induced in various inflammatory and resident cell types, such as chondrocytes[13-17], endothelial cells[18], osteoblasts[19], and fibroblasts[20] by many inflammatory mediators, including inflammatory cytokines, prostaglandins (PGs)[3] and bacterial LPS.

Increased levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and PGE2 levels are observed in periodontal disease[21-27], which is a mixed and complex infection, with plenty of bacterial antigens in the dental biofilm, including LPS. *In vitro* studies have shown that inflammatory cytokines induced MMP-13 expression by resident cells from the

periodontium[5, 9, 28, 29]. Also, *in vivo* studies have confirmed both the presence and activity of MMP-13 in periodontal tissues during physiological events related to bone and ECM turnover[30], as well as increased expression of MMP-13 in chronic inflammatory periodontal diseases[12, 31, 32]. Evaluation of MMP-13 expression in tissue samples and gingival crevicular fluid (GCF) from periodontal disease patients shows high levels in sulcular epithelium, fibroblasts, and macrophages, in comparison to healthy tissue samples [31]. MMP-13 presence has been associated with alveolar bone resorption[33, 34]. Nevertheless, suitable MMP-13 levels are required for some physiological events, such as endochondral bone development[35], as well as in embryogenesis, normal bone repair, ovulation and healing[36]. Specifically in periodontal disease, MMP-13 role in tissue repair and healing was suggested by the considerable levels of MMP-13 verified even after non-surgical periodontal treatment[12]. Moreover, literature reports on different pathological conditions indicate a complex and differential MMP-13 expression and regulation, depending on cell type[37] and extracellular stimuli[5, 38, 39]. Thus, a better understanding of MMP-13 expression pattern and regulation using a periodontal disease model might lead to alternative therapies aiming at inhibiting and/or minimizing tissue destruction that may be valuable for other pathologies as well.

Animal model studies have provided significant information on the pathogenesis of periodontal diseases[40, 41]. Two experimental models of periodontal disease have been used more commonly: injection of bacterial lipopolysaccharide (LPS) directly on the gingival tissue; and the placement of a cotton ligature on the cervical portion of posterior teeth. In rodents, both models have been shown to induce inflammation on the connective tissue and alveolar bone resorption [42-45]. Even though the LPS injection model has been shown, both *in vitro* and *in vivo*, to initiate chronic inflammation in the connective tissue by inducing expression of various inflammatory mediators, including MMP-13[39], and ultimately result in alveolar bone loss[45-47], the ligature-induced model of experimental periodontitis is considered by some to be the most similar to periodontitis in humans mainly because of the participation of live microorganisms with diverse virulent factors other than LPS, known as *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). The greater diversity of antigens in the ligature model may result in a more complex response by the host, since it may trigger various receptors in different cell types, which may have an effect on the cytokine and inflammatory mediators network. Thus, considering the relevant role suggested for MMP-13 in periodontal

diseases and its differential regulation according to cell type and nature of extracellular stimuli, this report evaluated the kinetics of MMP-13 expression in these two murine models of experimentally-induced periodontal disease. The severity of the inflammation on periodontal tissues during progression of periodontal disease in each experimental model was also assessed.

Materials and methods

Experimental design

A total of 30 male adult Wistar rats (*Rattus Norvegicus albinus*) were maintained under specific pathogen-free conditions with food and distilled water ad libitum. The animals were weighed weekly to ensure proper growth and nutrition. The rats were divided into two groups: A - Sham-control (n=6) were anesthetized but no ligatures were placed on the lower molars and only the same volume of vehicle (PBS, pH 7.4) was injected on the palatal aspect of upper molars. B - Experimental group (n=24) in which the two models of experimental periodontal disease were implemented: ligature placement on lower first molars and LPS injections on the palatal aspect of the upper molars. The experimental protocol was approved by the Ethical Committee on Animal Experimentation of the Biology Institute at the University at Campinas (IB-UNICAMP) and performed in accordance with the guidelines from the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA).

General anesthesia was induced with intraperitoneal injections of ketamine and xylazine chloridrate at 0.08 mL/100g body weight and 0.04 mL/100g body weight, respectively. Cotton threads were tied around the right and left lower 1st molars. For LPS-injection model, 3 µl of a 10 mg/mL solution of *Escherichia coli* LPS (strain 055:B5 - Sigma Chem Co., St. Louis, MO, USA) in PBS was injected into the palatal gingiva using a Hamilton micro-syringe (Agilent). The injections were done between the upper 1st and 2nd molars bilaterally twice a week for 30 days with previous sedation of the animals. Before the induction of periodontal disease, two animals from negative control group were killed by carbon dioxide asphyxiation after being sedated. 5, 15, and 30 days after the initiation of experimental periodontal disease, 02 animals of the control group and 08 animals of the experimental group were killed.

The maxillary and mandibular jaws were hemisected, and some of the block sections including 1st and 2nd molars with their surrounding tissues were submitted to

routine histological processing to be used in the stereometry evaluation, whereas other blocks were used for the extraction of total RNA and protein. For stereometry, 1 block including the upper and 1 block including the lower molars of the control group was analyzed per period, whereas 3 blocks of the upper and 3 blocks of the lower molars were analyzed per period for the experimental group. These tissue blocks were immersed directly in 10% buffered formalin fixative solution for 48 h and decalcified in tetrasodium-EDTA aqueous solution (0.5 M, pH 7.4) during 2-3 months, under agitation at room temperature. Each specimen consisted of a section containing the 1st and 2nd molars and their surrounding alveolar process and were included in paraffin blocks. Serial 4 μ M sections were obtained in the bucco-lingual direction and stained with hematoxylin-eosin (HE).

Stereometry

The inflammatory parameters were quantified, according to the score of PMN/mononuclear cell inflammation described by Liu et al.[48]: 0, no inflammatory cells; 1, slight inflammation (a few inflammatory cells); 2, moderate inflammation (remarkable inflammatory cells scattered throughout the connective tissue above the bone crest); 3, severe inflammation (predominance of inflammatory cells). The analysis was conducted by a single examiner that was blind to the experimental groups using an optical microscope (Diastar Cambridge) set at 200 X magnification. Semi-serial sections of 4 μ M were obtained from the tissue blocks on a buccal-lingual orientation. A total of 3 sections were evaluated per tooth. Each of these 3 sections was spaced 100 μ M from each other, in order to be representative of 300 μ M extension from the middle of the mesial root towards the distal aspect of the first molars. Each histological section was divided into thirds that received individual scores. An imaginary lower limit was represented by a horizontal line drawn at the top of the bone crest, and the soft tissue above this line was divided into the following thirds: 1 - near to the tooth; 2 - the middle portion; 3 - near the oral epithelium (Figure 2). In the slides of the lower molars (ligature model), both buccal and lingual aspects were examined, whereas on slides from the upper molars (LPS model) only the palatal aspect was analyzed. The scores for each model (control, LPS or ligatures) and area (mesial, mid, distal) were averaged for each period. All evaluations were repeated three times independently by the single examiner to assess the consistency on scoring criteria.

Semi-quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from tissue samples using Trizol reagent according to the manufacturer's instructions. The quantity and purity of total RNA were determined on a Biomate 3 (Thermo Electron Corporation) spectrophotometer by the 260 nM and 260/280 nM ratio readings, respectively. Complementary DNA was synthesized by reverse transcription of 800 ng of total RNA using 2.5 μ M Oligo (dT) 12-18 primers and 1.25 U/ μ L Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in the presence of 3 mM MgCl₂, 2 mM dNTPs and 0.8 U/ μ L of RNase inhibitor, according to the manufacturer's protocol (Improm II – Promega). The PCR reaction was performed in a MyCycler (Bio-Rad) thermocycler using 2 μ L of the RT reaction product on a 25 μ L total volume PCR reaction mix (GoTaq Flexi, Promega) that contained: nuclease free water, PCR buffer, Taq DNA polymerase, 0.8 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂ for GAPDH and 2.5mM MgCl₂ for MMP-13, in the presence of 100 pmol/ μ L of each gene's primers (50 pmol/ μ L of sense and antisense primers) for both genes. Optimized cycling conditions used for MMP-13 was: initial denaturation at 95°C for 2 min and 35 cycles of: 95°C for 1 min, 60°C for 1 min, 72°C for 2 min, followed by a final extension step at 72°C for 10 min . For GAPDH primers the cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 2 min and 25 cycles of: 95°C for 1 min, 52°C for 1 min, 72°C for 1 min and a final extension step at 72°C for 10 min. The PCR primer sequences and PCR conditions are shown in Table 1. The PCR products were resolved by electrophoresis on 1.5% (w/v) agarose gels containing ethidium bromide (0.5 μ g/mL) to visualize the PCR products. The amplified DNA bands were analyzed densitometrically after digital imaging capture (Image Quant 100 - GE Healthcare), using Image J 1.32j software (National Institute of Health, USA – <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The density of the bands corresponding to MMP-13 mRNA in each sample was normalized to the density of the band representing the housekeeping gene GAPDH and expressed as fold change over unstimulated control.

Table 1 –Primer pairs and cycling conditions.

Gene	Primers (5' – 3') Sense (S) and antisense (AS)	Accession#	Ta (°C)	Amplicon	Cycles
<i>GAPDH</i>	CACCATGGAGAAGGCCGGGG – S GACGGACACATTGGGGGTAG – AS	BC083065	52	418 bp	25
<i>MMP13</i>	GGTCCCAAACGAACTTAACTTACA – S CCTTGAACGTCATCATCAGGAAGC - AS	NM008607	60	445 bp	35

Western Blot

Total proteins were extracted from gingival tissue samples using a detergent-based extraction buffer (T-PER, Tissue Protein Extraction Reagent - Pierce) containing a protease inhibitor cocktail (Protein Stabilizing Cocktail – Santa Cruz Biotechnology) according to manufacturer's instructions (Pierce Biotechnology). The tissue samples were macerated in the buffer (50 μ L / mg of tissue) and centrifuged for 5 min at 13,000 RPM at 4°C. The supernatant was collected and subsequently concentrated with centrifuge filter devices (Microcon YM-10 - Millipore Corp) at 14,000g for 25 min at room temperature. The concentrated supernatants were quantified using a Bradford protein quantification system (Bio-Rad) and 40 μ g of total protein were added to a SDS sample buffer containing 2% SDS, DTT as a reducing agent, glycerol and bromophenol blue dye (Cell Signaling), heated-denatured at 97° C for 5 min and chilled on ice of 5 min before loading on 10% SDS-polyacrylamide gels.

Electrophoresis on discontinuous acrylamide gels were carried out at 100 V for 90 min and subsequently electro-transferred to 0.2 μ M nitrocellulose membranes using 300 mA constant current for 1 hour. The membranes were blocked for 1h in Tris-buffered saline containing 5% non-fat dry milk and 0.1% Tween-20 and subsequently washed for 5 min (3 times) with TBS-0.1% Tween at room temperature. The membranes were then incubated with primary antibody overnight at 4°C (1:50 dilution in PBS - Ab3 LIPCO II D1 – Lab Vision Neomarkers). Membranes were washed in TBS-T buffer for 5 minutes (3 times) and incubated with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (1:1000 dilution in the blocking buffer) for 1 hour at room temperature, washed again with TBS-T buffer (5 min, 3 times). Detection of MMP-13 bands was carried out on radiographic film by using a chemiluminescence system (Lumi-Glo, Cell Signaling).

Results

LPS model induced sustained inflammatory changes, whereas ligature-induced periodontitis presented a decrease on severity of inflammation after 30 days

H/E stained sections were analyzed and revealed differences on the localization of the inflammatory infiltrate according to the experimental model: on LPS injection model, the inflammation was located on the vicinity of the alveolar bone crest; whereas

on the ligature model it was located subjacent to the gingival sulcus (Figure 1). Inflammation scores for each experimental model in each period were compared to control and to each other by non-parametric analysis of variance followed by Dunn multiple comparisons test (Figure 2). Interestingly, both experimental models presented the highest inflammatory score at the 5-day period, and the severity of inflammation was significantly higher in comparison to the control group throughout the 30-day experimental period. On the ligature model, a significant decrease on the severity of inflammation is observed at the 30-day period. Even though the scores for ligature model were somewhat higher than those of the LPS model at the 5 and 15-day periods, no decrease was observed in the LPS model at the 30-day period.

Differential LPS- and ligature-induced MMP-13 mRNA expression pattern is consistent with the inflammatory status

In comparison to the control group, MMP-13 expression had a significant increase already at the 5 days in LPS model, which was sustained during the remaining experimental periods (Figure 3). The ligature model showed an evident increase MMP-13 expression after 5 and 15 days, followed by a significant decrease on day 30. These results mirror those of the stereometry for the severity of the inflammation as presented before and indicate a strong correlation of the inflammatory status and the expression of MMP-13 at the mRNA level. It's well documented that the expression of MMP-13 is expressed at low levels in healthy periodontal tissues where this collagenase is related to the physiological turnover processes[9, 12, 30]. Our results are in accordance with these findings.

Lack of transcription-translation coupling on MMP-13 expression in experimental periodontal disease

In parallel to the severity of inflammation and expression of MMP-13 at the mRNA level, a significant increase on MMP-13 protein expression was observed in both LPS and ligature models already at day 5. However, in contrast to the stereometry and RT-PCR results, a significant decrease on MMP-13 protein at the 30-day period was noted on the LPS model (Figure 4), whereas in the ligature sites increased MMP-13 protein levels were sustained throughout the experimental period. Moreover, the highest levels of MMP-13 protein expression on ligature-induced periodontal disease were verified at the 30-day period. This was a surprising finding, since the 30-day period of

ligature sites was associated with the lowest levels of inflammation and MMP-13 mRNA for this model of experimentally-induced periodontal disease. The lack of transcription-translation coupling for MMP-13 expression suggests that post-transcriptional mechanisms may play important roles on the regulation of MMP-13 gene expression.

Discussion

Experimental animal models of periodontitis are widely used for a better understanding of periodontal disease pathogenesis[40, 41] and as a chronic inflammation model may provide information that is useful to other conditions, such as rheumatoid arthritis. Since the composition of periodontal tissues include various types of collagen and considering that MMP-13 has a wide substrate base, an increased production may play an important role in the breakdown of mineralized and non-mineralized connective tissue during periodontitis progression. This is supported by studies associating increased levels of MMP-13 with various pathologies that are characterized by destruction of bone, cartilage and non-mineralized connective tissues[33, 34]. Thus, MMP-13 can be considered an important biological mediator of host-response in inflammatory conditions, including periodontal disease, and the study of temporal pattern of MMP-13 expression during the pathogenesis of experimentally-induced periodontal disease can provide more information on the role of this collagenase that may be utilized to generate alternative therapeutic strategies based on the modulation of gene expression.

However, MMP-13 is a gene of complex regulation with reports indicating that both transcriptional and post-transcriptional mechanisms are involved; and it is also well documented that MMP-13 regulation depends on cellular type[37] and extracellular stimuli[5, 38, 39]. In this report we evaluated the kinetics of MMP-13 expression in the gingival tissues using the two most commonly used experimental models of periodontal disease: LPS injections and ligature placement. Both models have been used by a great number of studies and lead to the development of an inflammatory reaction and resorption of alveolar bone crest[45, 49-51], which are the main features of periodontal disease in humans. In the ligature model, accumulation of a complex biofilm of live microorganisms provides greater similarity with the periodontal disease in humans since various PAMPs are present, including toxins, enzymes, metabolic by-products,

zymosan, flagellin, CpG DNA, peptidoglycan and LPS; however there is also the component of mechanical trauma associated with the placement of these ligatures. In the LPS injection model there is more control over the intensity of the antigenic stimulation, which initially is also more specific, since it is restrict to the activation of TLR receptors. LPS can mediate tissue destruction by activating different cell types present in the periodontal tissues, including: fibroblasts, lymphocytes, osteoblasts[52] and also by stimulating osteoclastogenesis[45]. These initial effects of LPS result in a complex host response represented by the production and release of an array of inflammatory mediators by these activated cells[53], including PGs, cytokines and MMPs, as demonstrated in previous *in vitro* studies by our group[39, 54].

Our results indicate that a significant inflammatory reaction was induced in both models already 5 days after beginning of periodontal disease induction. The inflammatory response elicited in LPS and ligature models differed only at the end of the 30-day experimental period, when a significant decrease on the severity of inflammation was noted only in the ligature sites. Interestingly, the kinetics of MMP-13 expression at the mRNA level paralleled the severity of inflammation on both models, including the decrease on ligature sites at the 30-day period, suggesting that inflammatory cells could be the main source of MMP-13 mRNA in gingival tissues. This is further supported by the finding that no decrease on MMP-13 mRNA was observed with the LPS model, which was also characterized by sustained inflammation severity. The predominance of PMNs and low levels of plasma cells and leucocytes during periodontal disease development has been traditionally observed in rats[41], so these cells alongside with macrophages could be the main source of MMP-13 mRNA. We have previously shown that MMP-13 expression can be induced on periodontal tissue cells by proinflammatory cytokines[5], which have been found in increased levels in periodontally diseased sites[21-27]. Thus, the increased accumulation of inflammatory cells observed in both experimental models could be associated with the production of proinflammatory cytokines and, consequently, MMP-13 expression. Expression of MMP-13 mRNA in LPS model increased in a time-dependent manner in accordance with the sustained inflammation and greater density of inflammatory cells. These cells might have produced inflammatory cytokines in response to LPS, which may have resulted in autocrine and paracrine induction of MMP-13 in a cytokine network of increasing complexity over time.

However, it was unexpected to find that the MMP-13 protein levels did not accompany the mRNA levels. In spite of the reports indicating a role for post-transcriptional mechanisms on gene regulation of MMP-13 *in vitro*, we could not find any study reporting this finding *in vivo*. Interestingly, on ligature model samples, the protein levels of MMP-13 increased towards the end of the experimental period, whereas on LPS model samples the levels of MMP-13 protein were maximum at 5 days and decreased thereafter. This lack of transcription-translation coupling points to a significant role of post-transcriptional mechanisms during periodontal disease *in vivo*, as already demonstrated for rheumatoid arthritis[55]. Moreover, these mechanisms seemed to be reciprocal with the mRNA levels and also to depend on the model, since when MMP-13 mRNA was elevated at 30 days in the LPS model, protein levels were low, whereas when MMP-13 mRNA was decreased at 30 days in the ligature model, protein levels were elevated. So, on the LPS model a positive regulation of MMP-13 protein levels was associated with post-transcriptional mechanisms, whereas on the ligature model post-transcriptional mechanisms resulted in a negative regulation of MMP-13 protein levels. It will be interesting to find out if this differential regulation of MMP-13 protein levels according to the model of experimentally-induced periodontal disease results from the activation of different post-transcriptional mechanisms.

It is important to note that there are important differences both on the microbial species from which LPS was purified, as well as on the regimen of administration used on the studies that employed this model[44, 56]. Importantly, LPS from the periodontopathic microorganism *Porphyromonas gingivalis* is shown to activate TLR-2[57, 58], whereas LPS from most other species activate TLR-4. Also, even though our regimen was of two LPS injections/week, other authors used a regimen of three injections/week[56] or even a single injection[59], the total dosage of LPS/week was very high (60 µg/week) and resulted in significant inflammation and bone loss.

Another unexpected finding was that the ligature model did not result in inflammation of increasing severity; in fact it did not even induce a sustained severity of inflammation throughout the experimental period. It has been reported that ligature model promotes an inflammatory infiltrate, characterized by increased recruitment and activation of leukocytes, which ultimately results in periodontal tissue damage[41, 49, 50, 60]. Even though we did observe significant inflammation at 5 and 15 days, there was a decrease on the severity at 30 days, which hypothetically could be ascribed to a protective feature of periodontal tissues that receded apically from the aggression

located on the gingival margin, in an attempt escape from the aggression and recover the biological space. Moreover, the ligatures were placed around the cervical portion of the teeth, in contact with the gingival margin, but without pushing them subgingivally. Once placed, the ligatures were kept throughout the 30-day experimental period; however they were not pushed further apically even if the gingival margin had receded. Interestingly, the ligature model had the slightly higher scores for the severity of inflammation in comparison to LPS model on days 5 and 15 of the experimental period. At the earliest period this could be partly attributed to the mechanical trauma associated with the placing of ligatures, however at 15 days inflammation is most likely associated with the activation of different TLRs through the several PAMPs present in ligature microenvironment and of cytokine receptors by the cytokine network established. Besides the simultaneous activation of various receptors that may result in a more severe and complex inflammatory response, it is also been shown that some bacterial antigens act synergistically as shown by the concomitant application of LPS and bacterial proteases in the gingival sulcus of rats[47].

The complex interaction of bacterial antigens and host-derived cytokines that will ultimately establish the cytokine network requires the activation of several signaling pathways and various molecular mechanisms for gene regulation are likely to be involved[61]. The differential expression profile of MMP-13 found in the LPS and ligature experimental models could be related to the specificities of signaling pathways activated in each model, which is supported by previous evidence that regulation of MMP-13 depends on the nature of extracellular stimulation[5, 39]. We showed that MMP-13 expression at mRNA and protein levels was differentially regulated in LPS and ligature-induced models, moreover that post-transcriptional mechanisms are likely to be involved in gene regulation *in vivo*. Further studies are already under way to get a better insight into the molecular mechanisms responsible for MMP-13 expression and regulation during chronic inflammation.

Acknowledgements

The authors want to express their gratitude to for in this study. Grant support was provided by FAPESP grants #2005/04428-9 and #2006/07283-4 (CRJ).

References

1. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol* 2000 1997;14:33-53.
2. Graves DT. The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in periodontal disease progression. *Clin Infect Dis* 1999;28:482-90.
3. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 1991;26:230-42.
4. Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:12-20.
5. Rossa C, Jr., Liu M, Patil C, Kirkwood KL. MKK3/6-p38 MAPK negatively regulates murine MMP-13 gene expression induced by IL-1beta and TNF-alpha in immortalized periodontal ligament fibroblasts. *Matrix Biol* 2005;24:478-88.
6. Murphy G, Knauper V, Atkinson S, Butler G, English W, Hutton M, et al. Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res* 2002;4 Suppl 3:S39-49.
7. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res* 2002;4:157-64.
8. Stahle-Backdahl M, Sandstedt B, Bruce K, Lindahl A, Jimenez MG, Vega JA, et al. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 1997;76:717-28.
9. Ravanti L, Hakkinen L, Larjava H, Saarialho-Kere U, Foschi M, Han J, et al. Transforming growth factor-beta induces collagenase-3 expression by human gingival fibroblasts via p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1999;274:37292-300.
10. Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J, et al. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 1994;269:16766-73.
11. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002;115:3719-27.
12. Kiili M, Cox SW, Chen HY, Wahlgren J, Maisi P, Eley BM, et al. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. *J Clin Periodontol* 2002;29:224-32.
13. Mengshol JA, Vincenti MP, Brinckerhoff CE. IL-1 induces collagenase-3 (MMP-13) promoter activity in stably transfected chondrocytic cells: requirement for Runx-2 and activation by p38 MAPK and JNK pathways. *Nucleic Acids Res* 2001;29:4361-72.
14. Ahmed S, Rahman A, Hasnain A, Goldberg VM, Haqqi TM. Phenyl N-tert-butyl nitro compound down-regulates interleukin-1 beta-stimulated matrix metalloproteinase-13 gene expression in human chondrocytes: suppression of c-Jun NH2-terminal kinase, p38-mitogen-activated protein kinase and activating protein-1. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305:981-8.
15. Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Zafarullah M. Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biol* 2002;21:251-62.

16. Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M, et al. Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. *Exp Cell Res* 2003;288:208-17.
17. El Mabrouk M, Sylvester J, Zafarullah M. Signaling pathways implicated in oncostatin M-induced aggrecanase-1 and matrix metalloproteinase-13 expression in human articular chondrocytes. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:309-20.
18. Zaragoza C, Soria E, Lopez E, Browning D, Balbin M, Lopez-Otin C, et al. Activation of the mitogen activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 by the nitric oxide-cGMP-cGMP-dependent protein kinase axis regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in vascular endothelial cells. *Mol Pharmacol* 2002;62:927-35.
19. Varghese S, Canalis E. Transcriptional regulation of collagenase-3 by interleukin-1 alpha in osteoblasts. *J Cell Biochem* 2003;90:1007-14.
20. Solis-Herruzo JA, Rippe RA, Schrum LW, de La Torre P, Garcia I, Jeffrey JJ, et al. Interleukin-6 increases rat metalloproteinase-13 gene expression through stimulation of activator protein 1 transcription factor in cultured fibroblasts. *J Biol Chem* 1999;274:30919-26.
21. Gorska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2003;30:1046-52.
22. Ejeil AL, Gaultier F, Igondjo-Tchen S, Senni K, Pellat B, Godeau G, et al. Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression? *J Periodontol* 2003;74:196-201.
23. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol* 2000;71:1535-45.
24. Geivelis M, Turner DW, Pederson ED, Lamberts BL. Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *J Periodontol* 1993;64:980-3.
25. Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol* 1991;62:504-9.
26. Reddi K, Wilson M, Nair S, Poole S, Henderson B. Comparison of the pro-inflammatory cytokine-stimulating activity of the surface-associated proteins of periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res* 1996;31:120-30.
27. Lee HJ, Kang IK, Chung CP, Choi SM. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol* 1995;22:885-90.
28. Leivonen SK, Chantry A, Hakkinen L, Han J, Kahari VM. Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression in human gingival fibroblasts. Evidence for cross-talk between Smad3 and p38 signaling pathways. *J Biol Chem* 2002;277:46338-46.
29. Nishikawa M, Yamaguchi Y, Yoshitake K, Saeki Y. Effects of TNFalpha and prostaglandin E2 on the expression of MMPs in human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res* 2002;37:167-76.
30. Takahashi I, Nishimura M, Onodera K, Bae JW, Mitani H, Okazaki M, et al. Expression of MMP-8 and MMP-13 genes in the periodontal ligament during tooth movement in rats. *J Dent Res* 2003;82:646-51.

31. Tervahartiala T, Pirila E, Ceponis A, Maisi P, Salo T, Tuter G, et al. 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* 2000;79:1969-77.
32. Hernandez M, Valenzuela MA, Lopez-Otin C, Alvarez J, Lopez JM, Vernal R, et al. Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *J Periodontol* 2006;77:1863-70.
33. Ma J, Kitti U, Teronen O, Sorsa T, Husa V, Laine P, et al. Collagenases in different categories of peri-implant vertical bone loss. *J Dent Res* 2000;79:1870-3.
34. Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, et al. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology* 1998;139:1338-45.
35. Kosaki N, Takaishi H, Kamekura S, Kimura T, Okada Y, Minqi L, et al. Impaired bone fracture healing in matrix metalloproteinase-13 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:846-51.
36. Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J* 1991;5:2145-54.
37. Uchida M, Shima M, Shimoaka T, Fujieda A, Obara K, Suzuki H, et al. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) by bone resorptive factors in osteoblastic cells. *J Cell Physiol* 2000;185:207-14.
38. Yang CM, Chien CS, Yao CC, Hsiao LD, Huang YC, Wu CB. Mechanical strain induces collagenase-3 (MMP-13) expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2004;279:22158-65.
39. Rossa C, Jr., Liu M, Bronson P, Kirkwood KL. Transcriptional activation of MMP-13 by periodontal pathogenic LPS requires p38 MAP kinase. *J Endotoxin Res* 2007;13:85-93.
40. Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:17-34.
41. Page RC, Schroeder HE. Periodontitis in man and other animals : a comparative review. Basel ; New York: Karger; 1982.
42. Vardar S, Buduneli E, Baylas H, Berdeli AH, Buduneli N, Atilla G. Individual and combined effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor and omega-3 fatty acid on endotoxin-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2005;76:99-106.
43. Breivik T, Thrane PS, Gjermo P, Opstad PK, Pabst R, von Horsten S. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation by experimental periodontal disease in rats. *J Periodontal Res* 2001;36:295-300.
44. Llavaneras A, Ramamurthy NS, Heikkila P, Teronen O, Salo T, Rifkin BR, et al. A combination of a chemically modified doxycycline and a bisphosphonate synergistically inhibits endotoxin-induced periodontal breakdown in rats. *J Periodontol* 2001;72:1069-77.
45. Kirkwood KL, Li F, Rogers JE, Otremba J, Coatney DD, Kreider JM, et al. A p38alpha selective mitogen-activated protein kinase inhibitor prevents periodontal bone loss. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;320:56-63.
46. Garlet GP, Martins W, Jr., Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res* 2003;38:210-7.

47. Ekuni D, Yamamoto T, Yamanaka R, Tachibana K, Watanabe T. Proteases augment the effects of lipopolysaccharide in rat gingiva. *J Periodontol* 2003;38:591-6.
48. Liu R, Bal HS, Desta T, Krothapalli N, Alyassi M, Luan Q, et al. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Dent Res* 2006;85:510-4.
49. Guimaraes MR, Nassar PO, Andia DC, Nassar CA, Spolidorio DM, Rossa C, Jr., et al. Protective effects of Tacrolimus, a calcineurin inhibitor, in experimental periodontitis in rats. *Arch Oral Biol* 2007;52:882-8.
50. Nassar CA, Nassar PO, Abi Rached RS, Holzhausen M, Marcantonio E, Jr., Spolidorio LC. Effect of cyclosporin A on alveolar bone homeostasis in a rat periodontitis model. *J Periodontol* 2004;39:143-8.
51. Ramamurthy NS, Xu JW, Bird J, Baxter A, Bhogal R, Wills R, et al. Inhibition of alveolar bone loss by matrix metalloproteinase inhibitors in experimental periodontal disease. *J Periodontol* 2002;37:1-7.
52. Wilson M. Biological activities of lipopolysaccharides from oral bacteria and their relevance to the pathogenesis of chronic periodontitis. *Sci Prog* 1995;78 (Pt 1):19-34.
53. Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol* 2005;32 Suppl 6:57-71.
54. Patil C, Rossa C, Jr., Kirkwood KL. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide induces interleukin-6 expression through multiple mitogen-activated protein kinase pathways in periodontal ligament fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:392-8.
55. Suzuki E, Tsutsumi A, Sugihara M, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, et al. Expression of TNF-alpha, tristetraprolin, T-cell intracellular antigen-1 and Hu antigen R genes in synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med* 2006;18:273-8.
56. Rogers JE, Li F, Coatney DD, Rossa C, Bronson P, Krieder JM, et al. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2007;78:550-8.
57. Zhou Q, Amar S. Identification of signaling pathways in macrophage exposed to Porphyromonas gingivalis or to its purified cell wall components. *J Immunol* 2007;179:7777-90.
58. Nemoto E, Darveau RP, Foster BL, Nogueira-Filho GR, Somerman MJ. Regulation of cementoblast function by P. gingivalis lipopolysaccharide via TLR2. *J Dent Res* 2006;85:733-8.
59. Dumitrescu AL, Abd-El-Aleem S, Morales-Aza B, Donaldson LF. A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. *J Clin Periodontol* 2004;31:596-603.
60. Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. *Periodontol* 2000 2006;40:144-63.
61. Kabelitz D, Medzhitov R. Innate immunity--cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. *Curr Opin Immunol* 2007;19:1-3.

Figure Legends

Figure 1 – Representative images of each experimental period (5, 15 and 30 days) are shown according to the method of induction of experimental periodontal disease (LPS or ligatures). Transversal sections from maxilla and mandibula showed that LPS model induced sustained inflammatory changes, whereas ligature-induced periodontitis presented a decrease on severity of inflammation after 30 days (H/E; x200).

Figure 2 – **Stereometric analysis of the inflammatory changes associated with each model of experimentally-induced periodontal disease.** Severity of inflammation was evaluated in H/E stained sections using a score of the density of inflammatory cells. The sections were divided in thirds from the tooth surface to the oral epithelium, as indicated on the figure, and represent the following: 1-lateral to the tooth, 2-mid-portion between the tooth and the oral epithelium, 3-outer third, close to the oral epithelium. For the ligature model both vestibular and lingual aspects of the tooth were considered, whereas in the LPS model only the palatal aspect was analyzed. The results are shown on the vertical scatter plot graphs for the LPS and Ligature models, and indicate a significant decrease on the severity of inflammation at 30 days (* $p < 0.05$ and ! $p < 0.05$, Kruskal-Wallis followed by Dunn multiple comparisons test). The LPS model presented a sustained severity of inflammation. Sections from at least three animals per period and model were analyzed.

Figure 3 – **MMP-13 expression profile during the course of experimentally-induced periodontal disease.** RT-PCR shows that MMP-13 mRNA expression is differentially regulated according to the experimental model. MMP-13 expression induced by LPS (A) and ligature (B) models increases significantly already at 5 days, maintaining elevated levels in both models at 15 days. At 30 days, there is a significant decrease on MMP-13 mRNA only on ligature model sites. The gel images are representative of at least three independent samples per experimental period, and the bar graphs depict the results of the densitometric analysis. MMP-13 mRNA expression was normalized to the expression of the house-keeping gene GAPDH. The bars represent mean fold changes and the vertical lines the standard deviation of the mean fold change

in comparison to untreated control (* $p < 0.05$, One-sample t test). The ! indicates a significant difference ($p < 0.05$) from other experimental periods.

Figure 4 – MMP-13 protein expression does not agree with the mRNA levels. 40 μg of total protein were loaded on discontinuous SDS-acrylamide gels, electrophoretically separated and transferred to nitrocellulose membranes. Both pro-active (48kDa) and active (60 kDa) forms are visible on the images. Even though MMP-13 protein paralleled the mRNA levels at 5 and 15 days in the LPS (A) and ligature (B) models, at 30 days protein expression levels were diametrically opposite to mRNA levels in both models. This suggests participation of post-transcriptional mechanisms on MMP-13 gene regulation. The images are representative of the results obtained using samples from at least 4 different animals per period and experimental model. ! $p < 0.05$, One-sample t test. The * indicates a significant difference ($p < 0.05$, One-sample t test) from control group.

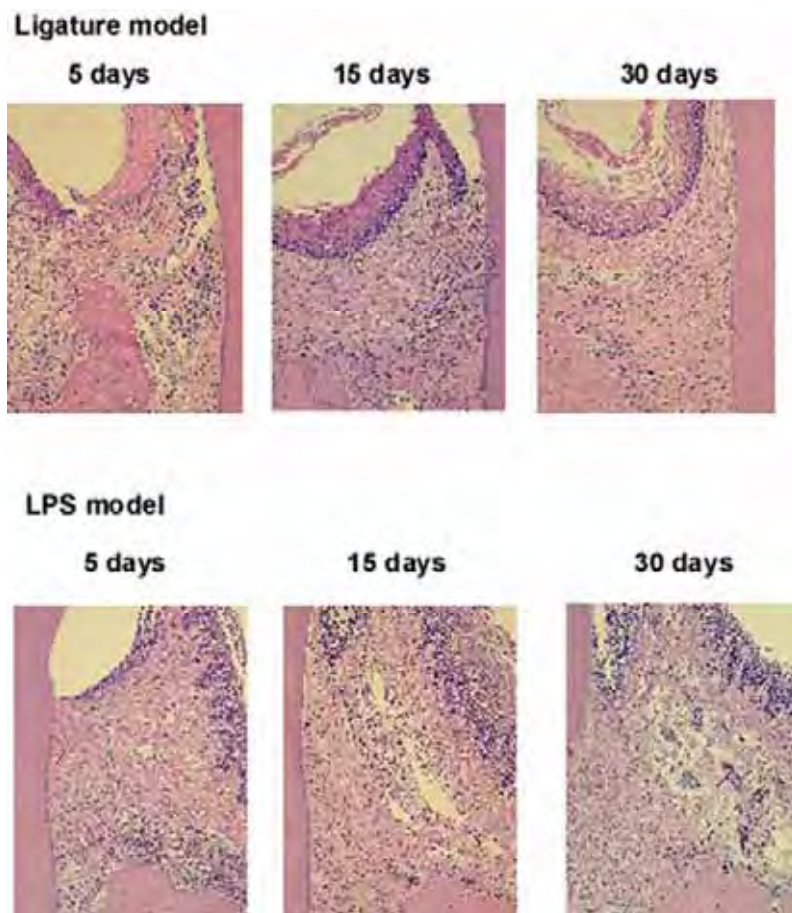
Figure 1

Figure 2

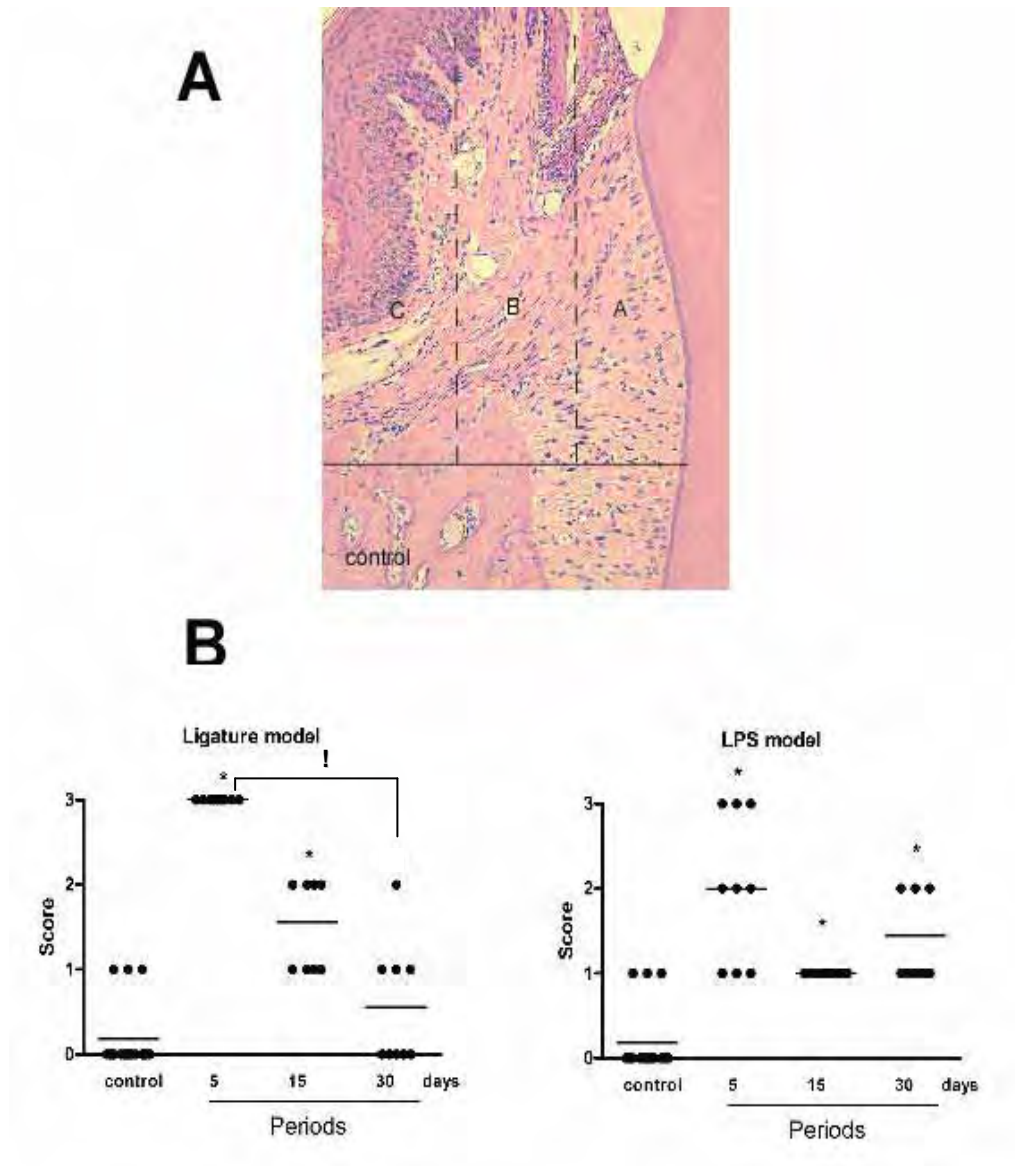


Figure 3

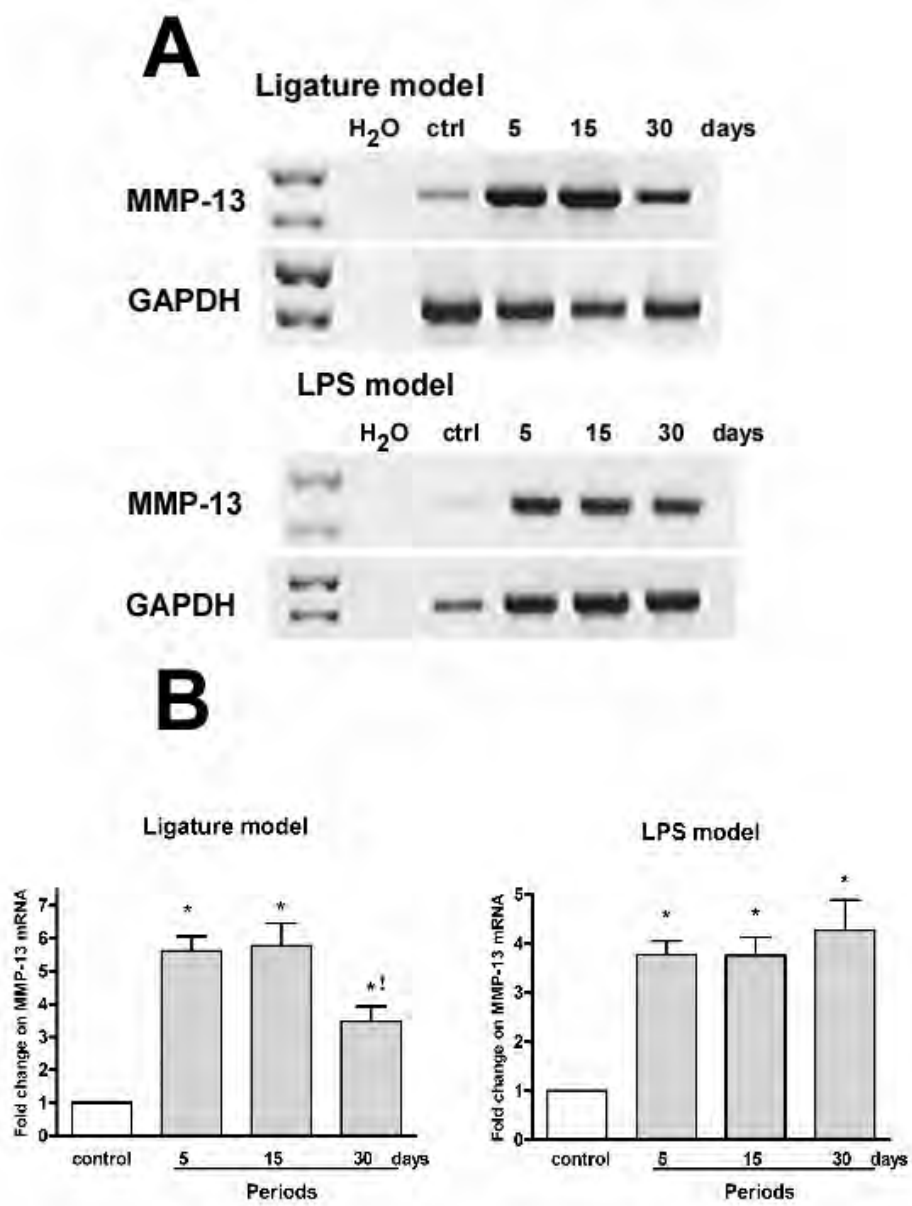
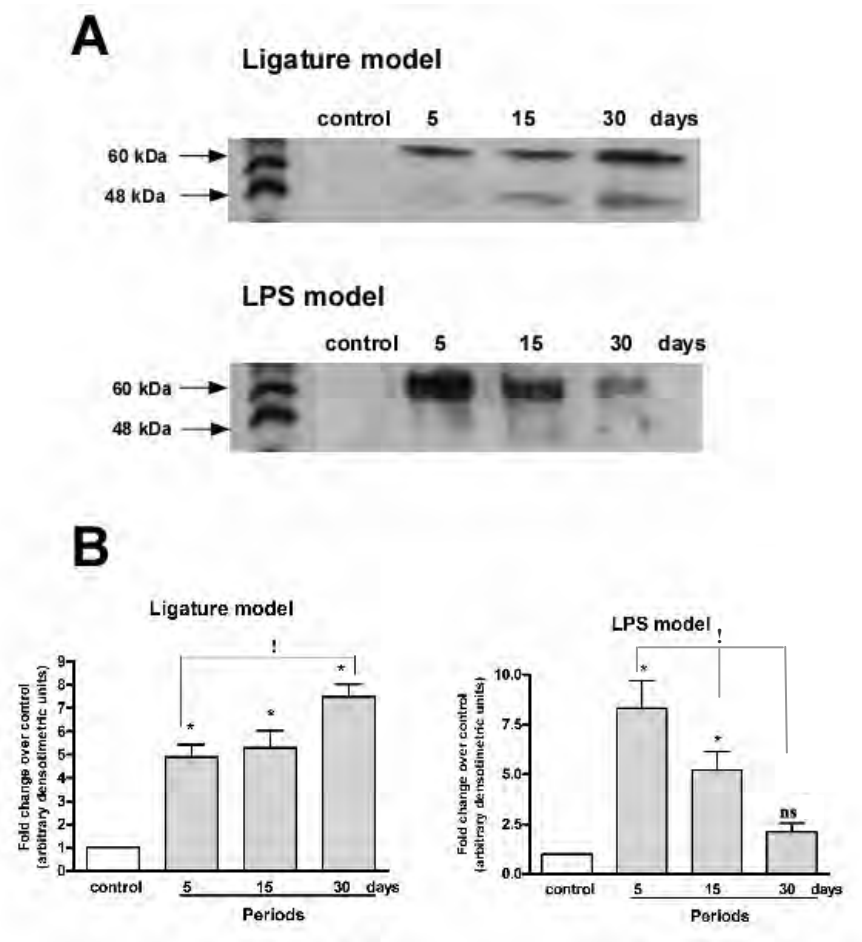


Figure 4



CAPÍTULO 2

Objetivo específico: Determinar a ativação das vias de sinalização intracelulares associadas com a resposta inflamatória e correlacionar esta informação com a atividade de diferentes fatores de transcrição relevantes para a expressão de MMP-13 e destruição dos tecidos conjuntivo e ósseo.

Hipótese: Há uma ativação diferencial das vias de sinalização segundo o tipo celular ou tecido durante a doença periodontal. As vias de sinalização ativadas irão induzir diferentes fatores de transcrição e esta atividade pode ser correlacionada com a destruição tecidual e com os níveis de expressão de MMP-13.

Abordagem: As vias de sinalização (p38, ERK MAPkinases) e fatores de transcrição (STAT3, STAT5 e NF- κ B) ativados durante a doença periodontal foram estudados por eletroforese em gel de acrilamida (*Western blot*) em amostras de proteína total extraídas dos tecidos periodontais.

Signaling pathways activated during the course of two models of experimentally-induced periodontal disease*

Sabrina Garcia de Aquino, DDS[†], Fábio Renato Manzolli Leite, DDS, MS[†], Juliete Francisco da Silva*, Dagmar Ruth Stach-Machado, PhD^{*} Luís Carlos Spolidorio DDS, PhD^{**}, Carlos Rossa, Jr., DDS, PhD^{*†}

[†]Department of Diagnosis and Surgery, ^{**}Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry at Araraquara, State University of Sao Paulo (UNESP), Araraquara, SP, Brazil.

*Department of Microbiology and Immunology, Biology Institute, State University at Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Running title: Signaling pathways activated in periodontal disease

Key-words: cell signaling, MAPK, chronic inflammation, periodontal disease, experimental models

Corresponding author:

Carlos Rossa Jr, D.D.S, Ph.D.

Department of Diagnosis and Surgery

School of Dentistry at Araraquara - State University of Sao Paulo (UNESP)

Rua Humaita, 1680

Araraquara, SP 14801-903 Brazil

Tel. (55-16) 3301-6375 Fax. (55-16) 3301-6369

E-mail: crossajr@foar.unesp.br

* Artigo a ser submetido para publicação

Abstract

Objective: Evaluate the signaling pathways activated during the course of two models experimentally-induced periodontal disease.

Background: Regulation of gene expression results from the activation of signaling pathways initiated by receptor-ligand binding of external antigens and also of cytokines produced by the host immune system. Understanding the signaling pathways relevant for a given condition may provide information useful on a therapeutic approach.

Methods: Activation of signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators was studied during the course of experimentally-induced periodontal disease by Western Blotting. Two experimental models were used: LPS injections and ligature placement. 30 µg of a PBS solution of LPS from *Escherichia coli* was injected twice a week into the palatal aspect of upper molars. Ligatures were placed at the gingival margin around lower first molars. A sham-operated group received injections of PBS vehicle on the palatal gingivae of upper first molars whereas no ligatures were placed on the lower molars. Samples were collected 5, 15 and 30 days after initiation of periodontal disease and processed for extraction of total protein, as well as routinely processed for histology/stereometry.

Results: Ligature model was associated with rapid and transient activation of p38 and ERK MAPK as well as of NF-κB. Activation of these signaling pathways on the LPS model was delayed but sustained throughout the 30-day experimental period. Inflammatory changes induced by both models were similar; however there was a significant reduction on the severity of inflammation on the ligature model, which paralleled the decrease observed on activation of the signaling pathways. Interestingly, activation of STAT3, especially on Tyrosine residues, and of STAT5 was verified only on ligature model.

Conclusion: p38 and ERK MAPKinases, as well as NF-κB were activated during the course of LPS- and ligature-induced experimental periodontal disease in parallel with the severity of inflammation; however with different kinetics. STAT3 and STAT5 activation was noted only on ligature-induced model.

Introduction

In recent years periodontal research has been increasingly focusing on the understanding of the host immune response to the microorganisms in the dental biofilm (12). This is because current knowledge attributes most of the mineralized and non-mineralized tissue destruction associated with the progress of destructive periodontal diseases to a general imbalance on the production of host-derived biological mediators. This imbalance is triggered by the microorganisms in the dental biofilm and also possibly modified by genetic variations as well as environmental or acquired host conditions (26, 28, 43).

The hallmark of destructive periodontal disease is the overproduction of cytokines and other inflammatory mediators, which is similar to other chronic diseases, including conditions of non-infectious origin such as rheumatoid arthritis (16). Production of cytokines and inflammatory mediators is usually a tightly-controlled process which is always initiated by external stimuli, or 'signals' that are rapidly transduced through the cytoplasm and into the nucleus where gene expression starts with the transcription of DNA into pre-mRNA. From this very start to the final assembly of the biologically-active protein, there are a great number of regulatory mechanisms that can affect gene expression and the signaling pathways activated participate in many of these mechanisms, both at transcriptional and post-transcriptional levels.

Uncontrolled overproduction of cytokines has serious consequences to the organism and is documented in a number of diseases, including cancer and autoimmune diseases. Thus, cytokine production is a fast and transient process, initiated and controlled by an even faster mechanism represented by the signaling pathways. These are generally composed by proteins arranged in a general hierarquical order that allows the flow of information from the outside of the cell to the nucleus (32). Thus, proteins that can sense the external signal (receptors) convey the message to a variable number of cytosolic proteins that can interact with other proteins and induce post-translational modifications that transfer energy, provoking changes in the tridimensional conformation of the target proteins which ultimately modulate their biological activity. The most common of these post-translational modifications is phosphorylation by kinases because it is very fast, reversible and does not require *de novo* protein production. Interestingly, the proteins comprising many of the signaling pathways are

very conserved among different species of organisms indicating their fundamental role in many essential physiological reactions. Some of these signaling pathways have also a relevant role in diverse pathological conditions, demonstrating their multivalency. For instance, the p38 MAPK pathway is involved in the control of cell proliferation and also in the transduction of inflammatory and stress signals (9), with many reports indicating its relevance in disease processes including rheumatoid arthritis (23, 24, 48) and periodontal disease (17).

Other interesting facts include the possibility of cross-talk and interaction among different signaling pathways that are simultaneously activated by the same external signal; the cell- and tissue- specificity of signaling pathways activated by the same external signal; and the specific effects resulting from the activation of a given signaling pathway depending on the nature of the external stimuli.

Specifically in periodontal disease, in spite of a great deal of information available on the expression of inflammatory cytokines, we could not find any reports on the signaling pathways activated *in vivo*. The cytokine profile associated with periodontal disease *in vivo* varies and includes both Th1- and Th2-type responses. IL-1 α , IL-1 β , IL-8 and TNF- α mRNA were detected in macrophages present in inflamed gingival tissues (21), whereas Th-2 cytokine IL-4 and pleiotropic IL-6 protein were also observed in diseased periodontal tissues (51). The type of periodontal disease, gingivitis with no bone resorption or periodontitis, has been associated with a characteristic cytokine profile. Thus, expression of Th1-type cytokines has been associated with gingivitis, whereas Th2 cytokines were found in higher levels on periodontitis-affected tissues (18, 45), even though this distinction was not clear-cut with both Th1 and Th2 cytokines being produced in gingivitis and periodontitis affected tissues and the predominant profile may determine the activity of tissue destruction (8, 41, 50).

Since the cytokine network established in diseased periodontal tissues is very complex and may be subject to shifts depending on disease activity (4, 52), and also due to the redundant and overlapping role of many cytokines, understanding the signaling pathways involved in cytokine gene expression may provide an alternative approach for the modulation of host response affecting the whole cytokine profile.

The rationale for this research approach is that once the signaling pathways governing cytokine production during periodontal disease are understood, it may be possible to use a therapeutic strategy based on the selective inhibition of signal

transduction to affect the cytokine profile and, consequently, the outcome of the host response (16, 17).

In this study we provide information on the kinetics of signaling pathways activated in two models of experimentally-induced periodontal disease. We focused on pathways that were shown to be relevant for inflammatory diseases and/or for expression of cytokines that are associated with mineralized and non-mineralized connective tissue destruction, including p38 and ERK MAPKinases, STAT-3 and STAT-5 and NF- κ B.

Methods

Animals and experimental periodontal disease models

Thirty male adult Wistar rats (*Norvegicus albinus*) obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation (CEMIB-UNICAMP), weighing approximately 250 g each were housed under specific pathogen free conditions at the animal facility of the Department of Microbiology and Immunology, Biology Institute - State University of Campinas (IB-UNICAMP). The animals were housed in pairs with food and distilled water *ad libitum*, and the study protocol was conducted according to the recommendations of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and approved by the Animal Experiments Ethics Committee – UNICAMP (CEEA).

Two experimental models of periodontal disease were used: ligature-induced periodontal disease at the lower first molars and LPS-injections at the palatal aspect of upper first molars of the same animals. A total of 6 animals were used as sham-controls: they were anesthetized but no ligatures were placed on the lower molars and only the same volume of vehicle (PBS, pH 7.4) was injected on the palatal aspect of upper molars.

For the injection procedures, anesthesia was induced with IP injections of a 2:1 mixture of ketamine and xylazine (80 μ L and 40 μ L per 100g of body weight, respectively). The test group (n=12) received a 3 μ L injection of a 10 μ g/ μ L PBS suspension of *E. coli* LPS (strain 055:B5, Sigma-Aldrich Chemical Co.) with a 33-gauge Hamilton syringe to the palatal interproximal gingivae at the mesial aspect of the first molars. Injections were performed 2 times per week. This protocol was modified from a previous publication (34). After obtaining a slight separation between the first

and second molars with an endodontic file, cotton thread ligatures were placed subgingivally around both lower first molars of all animals in the test group at day 0 using a pair of modified tweezers.

Two control and 8 experimental animals were killed by an overdose of anesthetics at each of the experimental periods of 5, 15 and 30 days. For all experimental animals, one randomly determined side of the lower and upper jaw was removed (n=5) for each method of periodontal disease induction and period), trimmed to retain only the first molars and surrounding tissues and fixed in 10% buffered formalin for 48 h at 4 C. Three samples from each jaw were prepared in the same way from the control animals. These samples were decalcified in 0.5M EDTA pH 8.0 for 4 to 6 weeks, embedded in paraffin and subsequently were used for the stereometric analysis after routine histological processing and staining with hematoxylin and eosin. Soft tissue samples were obtained from the remaining areas of control and experimental animals and total protein was extracted for Western blot analysis.

Stereometric analysis

Semi-serial sections of 4 μM were obtained from the tissue blocks on a buccal-lingual orientation. The sections were processed for regular H/E staining, and a total of 3 sections were evaluated per tissue block. Each of these three sections was spaced 100 μM from each other, in order to be representative of 300 μM extension from the middle of the mesial root towards the distal aspect of the first molars. A point-counting technique was used to evaluate the proportion of the following structures on the H/E-stained sections: fibroblastic cells, collagen, vascular structures and inflammatory cells. Two areas were assessed individually by a single examiner who was blind to the experimental groups: a submarginal area, representing the connective tissue subjacent to the gingival sulcus (apical border of junctional epithelium and tooth structure as the coronal and medial limits, respectively); and a bone crest area, representing the connective tissue adjacent to the bone crest (a horizontal limit was set 25 μM below the most coronal portion of the bone crest as the apical limit, whereas the tooth structure was the medial limit). A 250 μM^2 square-lattice grid was constructed using an image software (Adobe Photoshop, 7.0) and the type of structure found on the intersection of the grid lines was counted on a optical microscope (Diastar-Cambridge Instruments) under 200X magnification. The actual area assessed in each section varied due to

differences on the volume of soft tissue above the bone crest, but the presence of each structure was normalized to the total area analyzed in each section and is expressed as a percentage of the total area analyzed.

Western blot

Activation of the selected signaling pathways (NF- κ B, p38 and ERK MAPKinases, STAT-3 and STAT-5) was evaluated in total protein extracted from tissue samples harvested at the different experimental periods. These protein samples were harvested by tissue homogenization in a commercially obtained extraction buffer (T-Per, Pierce Biotechnology) supplemented with aprotinin, leupeptin, PMSF and sodium orthovanadate as protease and phosphatase inhibitors on ice, followed by centrifugation at 9,000 RPM at 4 C for 5 minutes. The supernatants were transferred to a new tube, subjected to three cycles of freeze (-80 C) / thawing (37 C) for complete lysis of cellular membranes and quantitated using the Bradford method (Bio-Rad Lab.). 40 μ g of total protein were added to a sample buffer containing glycerol, SDS and DTT, heat-denatured at 95 C for 5 minutes and subsequently loaded on SDS-polyacrylamide gels.

The proteins were electrophoretically separated on 10% Tris-Cl polyacrylamide gels run at 100 V for 90 min and subsequently electro-transferred to 0.2 μ M nitrocellulose membranes (300 mA constant current for 60 minutes). The membranes were blocked (Tris-buffered saline with 5% non-fat dry milk, 0.1% Tween-20) for 1 hour at room temperature and then incubated overnight at 4⁰C with primary antibodies against the phosphorylated forms of the proteins of interest. The presence of the primary antibodies was detected on radiographic film by using HRP-conjugated secondary antibodies and a chemiluminescence system (Lumi-Glo, Cell Signaling). The membranes were stripped off both primary and secondary antibodies by incubation in stripping buffer (100 mM 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-Cl, pH 6.7) for 15 minutes at room temperature followed by 10-minute wash in dH₂O (2x) and a final 10-minute wash in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20. After stripping, the membranes were blocked as described previously and incubated with antibodies against GAPDH to verify equal loading of the wells. Digitalized images of the radiographic films were obtained in a gel documentation system (ImageQuant 100, GE Lifesciences)

and densitometric measurements were obtained using ImageJ 1.37v software (NIH, Bethesda, MD, USA).

Results

p38, ERK MAPKinases and NF- κ B are activated with different kinetics in LPS- and ligature-induced periodontal disease

Significant activation of ERK, p38 and NF- κ B was observed already at 5 days with ligature-induced periodontal disease, whereas on LPS-injected sites both p38 and NF- κ B were significantly activated only after 15 to 30 days (Figures 1 and 2). This may be due to a differential utilization of these signaling pathways by the receptors activated in each method. Since LPS activates mainly TLR-4, on ligature sites other receptors might be activated due to the presence of increased number of viable microorganisms secreting toxins and with participation of other pathogen-associated molecular patterns capable of activating other TLRs, including CpG DNA, flagellin and zymosan. Interestingly, only ERK MAPK was significantly activated at 5 days on LPS-injected sites, suggesting direct and preferential utilization of this pathway by TLR-4 signaling. Another interesting finding is the decrease on the activation of these MAPKinases on ligature sites after 15 and 30 days. This was unexpected, since the common belief was that if ligatures are maintained long enough, inflammation would persist and the teeth would be exfoliated due to severe loss of periodontal support. On the other hand, LPS sites showed sustained activation of both MAPKinases through days 15 and 30. The stereometric analysis supports these results, since the density of inflammatory cells decreased on the proximity of the bone crest at days 15 and 30 (Figure 4). This decrease may explained by a initial resorption of the bone crest and apical displacement of supporting tissues caused by the ligatures, allowing the organism to increase the distance between the bone crest area and the aggression (ligatures), returning to a homeostasis state. Activation of NF- κ B also occurred early on ligature in comparison to LPS sites, however, in contrast to the MAPKinases it was sustained throughout the 30-day experimental period. Delayed activation of NF- κ B is consistent with a preferred utilization of TLR-4 in LPS sites.

STAT3 and STAT5 are preferentially activated on ligature-induced periodontal disease model

On LPS sites there was a discrete activation by phosphorylation of Serine residues of STAT3 starting at day 5, however this activation only reached statistical significance at 30 days. On the other hand, Tyrosine residue phosphorylation of STAT3, as well as phosphorylation of STAT5 were not observed with the LPS model, but were noticed on ligature sites at days 15 and 30, respectively (Figures 1 and 2). The more complex signaling network induced by ligatures may explain the increased activation of both STAT3, and STAT5 in comparison to LPS sites after 15 to 30 days.

Inflammation induced by ligatures and LPS is similar, but LPS-induced inflammatory reaction is sustained on the proximity of the bone crest

Both LPS and ligatures induced an obvious inflammatory reaction, as indicated on the illustrative images (Figure 3) and stereometric analysis results (Figure 4). This reaction is represented by a significant increase on the numbers of inflammatory cells and vascular structures. The general change on the composition of the connective tissue, including a decrease on the number of fibroblasts and on the density of collagen is a common finding in periodontal disease. The characteristics of inflammation induced by LPS and ligatures are similar, however the severity of inflammation in the area of the bone crest decreased on ligature sites towards the end of the 30-day experimental period. This is shown by the non-significant difference on the number of inflammatory cells between the control sites and 30-day ligature sites, as well as the trend of increasing number of fibroblasts and collagen from 15 to 30 days. In spite of subtle and sometimes non-statistically significant differences, this suggests an attempt of damage repair that is noticeable only on ligature sites. Since inflammation associated with ligatures initiate on the gingival margin because of both mechanical trauma as well as increased dental biofilm accumulation, it is possible that initial damage, represented by the increased severity of inflammation at the bone crest area on day 5 after ligature placement, may in fact increase the distance between the bone crest area and the ligatures. This hypothesis would also explain why this trend of decreasing severity is much more subtle on the submarginal area, which is in greater proximity to the ligature. These results also agree with the finding that activation of MAPKinases decreased on

ligature sites towards the end of the experimental period. The LPS-induced inflammation was sustained at both the submarginal and bone crest areas throughout the 30-day experimental period, which is consistent with the persistent challenge to the host immune system represented by the injections performed 2 times/week for the duration of the experimental period. Since these LPS injections were performed on the palate at a distance of approximately 1 mm from the gingival margin it is interesting to note that this model also produced a sustained inflammatory reaction on the submarginal area.

Discussion

The relevance of signaling pathways to specific pathological conditions, such as cancer, Alzheimer's disease, rheumatoid arthritis, acute coronary syndrome, chronic obstructive pulmonary disease and dental diseases(14, 31, 38, 39) has been an area of active research recently. Our research group has shown that bacterial LPS activate multiple signaling pathways in periodontal ligament fibroblasts(29, 36). However, we could not find any literature report on the kinetics of signaling pathways activated during experimentally-induced periodontal disease. In this report we provided evidence that p38, ERK MAPKinases, as well as NF- κ B and, to some extent, STAT3 are significantly activated during periodontal disease. The choice of signaling pathways to be studied was based on their relevance to the expression of inflammatory mediators, such as IL-1, TNF- α (1), IL-6(5, 30), MMP-13(37), MMP-9(20) and RANKL(35).

The comparison between two commonly used methods of inducing periodontal disease in a murine model revealed important differences on the kinetics of activation of these signaling pathways. LPS-induced periodontal disease was associated with a delayed activation of all the signaling pathways evaluated in comparison to the ligature model, except for ERK MAPK. This may be associated with the characteristics of TLR-4 signaling; however one would expect that NF- κ B would also be rapidly activated by this pathway. The delayed activation in comparison to the ligature sites might be due to a difference on the intensity of the aggression, as well as to difference on the kinases activated that will lead to I κ B (IKK complex) phosphorylation on the canonical signaling pathway. Downstream of TNF receptor activation, phosphorylation of IKK complex requires the recruitment of TRAF2 and TRAF5 which will recruit RIP to act as a scaffold for the binding of IKK complex. TLR signaling requires a different set of adaptors, including MyD88 and TIRAP, which will recruit IRAK or TRAF6, and it is

currently believed that the kinase TAK1 would link TRAF6 to the IKK complex(11, 44). These characteristics of the signaling pathways downstream of different receptors may explain the temporal differences on NF- κ B activation.

Sustained activation of ERK and p38 MAPKinases in the LPS model may be attributed to the continuous stimulation during the 30-day experimental period represented by the two injections/week regimen, whereas in the ligature model the initial bone resorption resulted in a greater distance between the aggression (ligatures) and the soft tissue, decreasing the severity of the inflammation and, thus the activation of these signaling pathways, in this model. However, there may be differences on the activation of various kinases upstream of p38 MAPK according to the model (LPS or ligatures) that can explain differences on the intensity and/or kinetics of activation of this pathway. In the LPS model, upstream enzymes in the p38 pathway such as TRAF6 may interact with MyD88 associated with TLR signaling(22) and TAK1 may also be activated by LPS(19) that can ultimately affect the profile of inflammatory gene expression in each model. We have also shown previously(36, 37) that activation of MKK3 and 6, immediate upstream activators of p38, may also account for differences on p38 MAPK phosphorylation and gene expression, and this can vary in intensity or kinetics according to the experimental model of periodontal disease, LPS- or ligature-induced.

It was an interesting finding that ERK MAPKinase was the only signaling pathway that was already significantly activated at the 5 day period, especially since this pathway is usually associated with signaling of polypeptide growth factors and hormones(3). We found constitutive activation of ERK MAPK in a mouse periodontal ligament fibroblast cell line(37), and recently ERK MAPK was one of the pathways implicated in the expression of IL-1 β , TNF- α and IL-12 in concanavalin A-stimulated murine macrophages, in conjunction with p38 MAPK(15). Besides cell growth and differentiation, ERK MAPK has been shown to have important role also on several inflammatory processes, and phosphorylation of some transcription factors has been shown to require both p38 and ERK, including MSK1/2, MNK1/2 and RSKb(10). Indeed, pharmacologic manipulation of the ERK pathway is currently being assessed in clinical trial for oncology applications(42, 46).

The signal transducers and activators of transcription (STATs) family of latent transcription factors are involved in many cytokine signaling pathways(13), especially by those that use the gp130 receptor Stats dimerize upon phosphorylation and

translocate to the nucleus where it will bind to specific DNA motifs on the promoter region of the target genes. STAT3 can be phosphorylated at tyrosine and serine residues. This dual phosphorylation is needed for full activation, even though the role of serine phosphorylation is not well known it has no effect on the DNA-binding of STAT3(49). As far as we know, activation of STATs in periodontal disease *in vivo* has not been reported yet. The finding of STAT3 and STAT5 activation only on ligature sites may be due to increased levels of inflammatory cytokines on these sites in comparison to the LPS sites. Thus, two hypothesis may explain the STAT activation on ligature sites only: the more complex array of signaling pathways activated at the ligature sites might account for the increased level of cytokine expression; and also the cross-talk between MAPKinases and STAT may account for a delayed STAT activation(1, 7, 25, 40, 53), especially on the serine residue(6, 47).

The differences on the activation of signaling pathways according to the experimental model should be considered when interpreting the results of studies that use either of these models, since the signaling pathways activated (and the dynamics of this activation) will influence the pattern of gene expression, even though the general histological characteristics of the inflammatory reaction are similar. In fact, the differences between the ligature and LPS-models of experimentally-induced periodontal disease are usually discussed only in terms of the extent of bone loss produced and the histological characteristics of the inflammation of periodontal tissues in each method.

Regardless of the model, p38 and ERK MAPKinases and NF- κ B were significantly activated during experimentally-induced periodontal disease. There are numerous reports indicating a relevant role for p38 and NF- κ B to periodontal inflammation(2, 33), and interestingly p38 MAPK even mediates activation of NF- κ B induced by IL-1 β (27). In fact, there is increasing evidence of participation of multiple signaling pathways on inflammatory gene expression and it will be interesting to find out the collaboration of each pathway. There may be either synergistic or antagonistic effects of different pathways to the final steady-state result, and different pathways may affect distinct molecular mechanisms of gene expression, i.e., transcription and post-transcriptional mechanisms. Moreover, the effect of a given pathway on gene

expression may depend on the external stimuli as we have previously shown for p38 MAPK on regulation of MMP-13 expression(36, 37). It may also be cell- or tissue-specific, which adds another level of complexity to the study of cell signaling pathways as it relates to regulation of gene expression. In this regard, it will be interesting to know the kinetics of activation of signaling pathways in different pathological conditions *in vivo*, since therapeutic approaches based on modulation of signaling pathways may affect more than one cell type or tissue.

Here we provide a new insight on relevant differences between the methods that may be used on the study of signaling pathways involved in infectious and inflammatory conditions, since the LPS method initially activates only TLR-4 and subsequent activation of other receptors will be dependent on the cells activated and recruited to the area in response to that; it allows the study of the role of TLR-4 signaling pathway in the establishment of a complex inflammatory reaction. Interestingly, evidence for a relevant role of TLR signaling in rheumatoid arthritis has been recently shown(38), which stresses out the applicability of the knowledge derived from the LPS-model of experimentally-induced periodontal disease. On the other hand, the ligature method most likely activates a broader range of receptors and signaling pathways once they are inserted because of both mechanical trauma and increased accumulation of a live and complex microbiota. It will be interesting to evaluate the profile of inflammatory mediators expressed in the periodontal tissues in each method, which will be done in future studies.

Acknowledgements

The authors want to express their gratitude to for in this study. Grant support was provided by FAPESP grants #2005/04428-9 and #2006/07283-4 (CRJ).

References

1. Ajizian SJ, English BK, Meals EA. Specific inhibitors of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J Infect Dis.* 1999 Apr;179(4):939-44.
2. Ambili R, Santhi WS, Janam P, Nandakumar K, Pillai MR. Expression of activated transcription factor nuclear factor-kappaB in periodontally diseased tissues. *J Periodontol.* 2005 Jul;76(7):1148-53.
3. Avruch J. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem.* 1998 May;182(1-2):31-48.
4. Bickel M, Axtelius B, Solioz C, Attstrom R. Cytokine gene expression in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001 Sep;28(9):840-7.
5. Chae HJ, Byun JO, Chae SW, Kim HM, Choi HI, Pae HO, et al. p38 MAPK and NF-kappaB on IL-6 release in human gingival fibroblasts. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2005;27(4):631-46.
6. Chung J, Uchida E, Grammer TC, Blenis J. STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 1997 Nov;17(11):6508-16.
7. Frias MA, Rebsamen MC, Gerber-Wicht C, Lang U. Prostaglandin E2 activates Stat3 in neonatal rat ventricular cardiomyocytes: A role in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2007 Jan 1;73(1):57-65.
8. Garlet GP, Martins W, Jr., Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontol Res.* 2003 Apr;38(2):210-7.
9. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science.* 1994 Aug 5;265(5173):808-11.
10. Hauge C, Frodin M. RSK and MSK in MAP kinase signalling. *J Cell Sci.* 2006 Aug 1;119(Pt 15):3021-3.
11. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 2004 Sep 15;18(18):2195-224.
12. Hourri-Haddad Y, Wilensky A, Shapira L. T-cell phenotype as a risk factor for periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2007;45:67-75.
13. Ihle JN. The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 2001 Apr;13(2):211-7.
14. Inoue T, Boyle DL, Corr M, Hammaker D, Davis RJ, Flavell RA, et al. Mitogen-activated protein kinase kinase 3 is a pivotal pathway regulating p38 activation in inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Apr 4;103(14):5484-9.
15. Kesharwani V, Sodhi A. Quantitative role of p42/44 and p38 in the production and regulation of cytokines TNF-alpha, IL-1beta and IL-12 by murine peritoneal macrophages in vitro by concanavalin A. *Cytokine.* 2007 Jan;37(1):62-70.
16. Kirkwood KL, Cirelli JA, Rogers JE, Giannobile WV. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2007;43:294-315.
17. Kirkwood KL, Li F, Rogers JE, Otremba J, Coatney DD, Kreider JM, et al. A p38alpha selective mitogen-activated protein kinase inhibitor prevents periodontal bone loss. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007 Jan;320(1):56-63.

18. Lappin DF, MacLeod CP, Kerr A, Mitchell T, Kinane DF. Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. *Clin Exp Immunol.* 2001 Feb;123(2):294-300.
19. Lee J, Mira-Arbibe L, Ulevitch RJ. TAK1 regulates multiple protein kinase cascades activated by bacterial lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol.* 2000 Dec;68(6):909-15.
20. Liang KC, Lee CW, Lin WN, Lin CC, Wu CB, Luo SF, et al. Interleukin-1beta induces MMP-9 expression via p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK, and nuclear factor-kappaB signaling pathways in human tracheal smooth muscle cells. *J Cell Physiol.* 2007 Jun;211(3):759-70.
21. Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *Immunology.* 1992 May;76(1):42-7.
22. Matsuzawa A, Saegusa K, Noguchi T, Sadamitsu C, Nishitoh H, Nagai S, et al. ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol.* 2005 Jun;6(6):587-92.
23. Mbalaviele G, Anderson G, Jones A, De Ciechi P, Settle S, Mnich S, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase prevents inflammatory bone destruction. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Jun;317(3):1044-53.
24. Medicherla S, Ma JY, Mangadu R, Jiang Y, Zhao JJ, Almirez R, et al. A selective p38 alpha mitogen-activated protein kinase inhibitor reverses cartilage and bone destruction in mice with collagen-induced arthritis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Jul;318(1):132-41.
25. Ng DC, Long CS, Bogoyevitch MA. A role for the extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases in interleukin-1 beta-stimulated delayed signal transducer and activator of transcription 3 activation, atrial natriuretic factor expression, and cardiac myocyte morphology. *J Biol Chem.* 2001 Aug 3;276(31):29490-8.
26. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol.* 1996 Nov;1(1):821-78.
27. Oikawa A, Kobayashi M, Okamatsu Y, Shinki T, Kamijo R, Yamamoto M, et al. Mitogen-activated protein kinases mediate interleukin-1beta-induced receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2007 Aug;42(4):367-76.
28. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1991 May;26(3 Pt 2):230-42.
29. Patil C, Rossa C, Jr., Kirkwood KL. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide induces interleukin-6 expression through multiple mitogen-activated protein kinase pathways in periodontal ligament fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol.* 2006 Dec;21(6):392-8.
30. Patil C, Zhu X, Rossa C, Jr., Kim YJ, Kirkwood KL. p38 MAPK regulates IL-1beta induced IL-6 expression through mRNA stability in osteoblasts. *Immunol Invest.* 2004 May;33(2):213-33.
31. Patil CS, Kirkwood KL. p38 MAPK signaling in oral-related diseases. *J Dent Res.* 2007 Sep;86(9):812-25.
32. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Apr;9(2):180-6.
33. Rogers JE, Li F, Coatney DD, Otremba J, Kriegel JM, Protter TA, et al. A p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor arrests active alveolar bone loss in a rat periodontitis model. *J Periodontol.* 2007 Oct;78(10):1992-8.

34. Rogers JE, Li F, Coatney DD, Rossa C, Bronson P, Krieder JM, et al. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2007 Mar;78(3):550-8.
35. Rossa C, Ehmann K, Liu M, Patil C, Kirkwood KL. MKK3/6-p38 MAPK signaling is required for IL-1beta and TNF-alpha-induced RANKL expression in bone marrow stromal cells. *J Interferon Cytokine Res.* 2006 Oct;26(10):719-29.
36. Rossa C, Jr., Liu M, Bronson P, Kirkwood KL. Transcriptional activation of MMP-13 by periodontal pathogenic LPS requires p38 MAP kinase. *J Endotoxin Res.* 2007;13(2):85-93.
37. Rossa C, Jr., Liu M, Patil C, Kirkwood KL. MKK3/6-p38 MAPK negatively regulates murine MMP-13 gene expression induced by IL-1beta and TNF-alpha in immortalized periodontal ligament fibroblasts. *Matrix Biol.* 2005 Oct;24(7):478-88.
38. Sacre SM, Andreakos E, Kiriakidis S, Amjadi P, Lundberg A, Giddins G, et al. The Toll-like receptor adaptor proteins MyD88 and Mal/TIRAP contribute to the inflammatory and destructive processes in a human model of rheumatoid arthritis. *Am J Pathol.* 2007 Feb;170(2):518-25.
39. Schindler JF, Monahan JB, Smith WG. p38 pathway kinases as anti-inflammatory drug targets. *J Dent Res.* 2007 Sep;86(9):800-11.
40. Sellers LA, Feniuk W, Humphrey PP, Lauder H. Activated G protein-coupled receptor induces tyrosine phosphorylation of STAT3 and agonist-selective serine phosphorylation via sustained stimulation of mitogen-activated protein kinase. Resultant effects on cell proliferation. *J Biol Chem.* 1999 Jun 4;274(23):16423-30.
41. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontol Scand.* 2001 Jun;59(3):167-73.
42. Strumberg D, Richly H, Hilger RA, Schleucher N, Korfee S, Tewes M, et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of the Novel Raf kinase and vascular endothelial growth factor receptor inhibitor BAY 43-9006 in patients with advanced refractory solid tumors. *J Clin Oncol.* 2005 Feb 10;23(5):965-72.
43. Takeichi O, Haber J, Kawai T, Smith DJ, Moro I, Taubman MA. Cytokine profiles of T-lymphocytes from gingival tissues with pathological pocketing. *J Dent Res.* 2000 Aug;79(8):1548-55.
44. Tergaonkar V. NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(10):1647-53.
45. Tokoro Y, Matsuki Y, Yamamoto T, Suzuki T, Hara K. Relevance of local Th2-type cytokine mRNA expression in immunocompetent infiltrates in inflamed gingival tissue to periodontal diseases. *Clin Exp Immunol.* 1997 Jan;107(1):166-74.
46. Townsley CA, Major P, Siu LL, Dancey J, Chen E, Pond GR, et al. Phase II study of erlotinib (OSI-774) in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2006 Apr 24;94(8):1136-43.
47. Turkson J, Bowman T, Adnane J, Zhang Y, Djeu JY, Sekharam M, et al. Requirement for Ras/Rac1-mediated p38 and c-Jun N-terminal kinase signaling in Stat3 transcriptional activity induced by the Src oncoprotein. *Mol Cell Biol.* 1999 Nov;19(11):7519-28.
48. Wada Y, Nakajima-Yamada T, Yamada K, Tsuchida J, Yasumoto T, Shimozato T, et al. R-130823, a novel inhibitor of p38 MAPK, ameliorates hyperalgesia and swelling in arthritis models. *Eur J Pharmacol.* 2005 Jan 4;506(3):285-95.
49. Wen Z, Darnell JE, Jr. Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic Acids Res.* 1997 Jun 1;25(11):2062-7.

50. Yamamoto M, Fujihashi K, Hiroi T, McGhee JR, Van Dyke TE, Kiyono H. Molecular and cellular mechanisms for periodontal diseases: role of Th1 and Th2 type cytokines in induction of mucosal inflammation. *J Periodontal Res.* 1997 Jan;32(1 Pt 2):115-9.
51. Yamazaki K, Nakajima T, Gemmell E, Polak B, Seymour GJ, Hara K. IL-4- and IL-6-producing cells in human periodontal disease tissue. *J Oral Pathol Med.* 1994 Sep;23(8):347-53.
52. Yamazaki K, Nakajima T, Kubota Y, Gemmell E, Seymour GJ, Hara K. Cytokine messenger RNA expression in chronic inflammatory periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* 1997 Oct;12(5):281-7.
53. Zauberman A, Zipori D, Krupsky M, Ben-Levy R. Stress activated protein kinase p38 is involved in IL-6 induced transcriptional activation of STAT3. *Oncogene.* 1999 Jul 1;18(26):3886-93.

Figure legends

Figure 1 – Differences on the kinetics of signaling pathway activation in ligature- and LPS-induced models of experimental periodontal disease. Total protein was extracted from gingival tissue samples obtained from ligature (A) and LPS injection sites (B) at 5, 15 and 30 days periods. 40 μg of total protein was separated by electrophoresis in 10% acrylamide gels under denaturing conditions and transferred to nitrocellulose membranes. Activation of the signaling pathways was determined by incubating the membranes with the specific primary antibodies and revealed with HRP-conjugated secondary antibodies and an ECL system. The images are representative of three independent samples.

Figure 2 – Densitometric analysis of the Western blot results indicate sustained activation of MAPKinases on LPS injection sites and stronger activation of STATs in ligature sites. The Western blot images of three independent samples were digitalized and submitted to densitometric analysis using a gel documentation system (ImageQuant 100, GE Lifesciences) and software (Image J, NIH). The density of the target proteins was normalized to the density of GAPDH and is expressed in arbitrary densitometric units. LPS injection sites demonstrated a significant sustained activation of MAPKinases. This was not observed on ligature sites that presented a decrease on the activation of ERK and p38 already at 15 days and further decreasing at 30 days, when the difference from healthy control sites was not statistically significant. On the other hand, activation of NF- κ B, STAT3 and STAT5 was sustained throughout the 30 days and was noticeably stronger than on LPS sites. Bars represent mean normalized arbitrary densitometric units of three independent samples for each period, and vertical lines the standard deviation. The \perp indicates a significant difference ($p < 0.05$) from

other experimental periods, whereas the * indicates a significant difference from control sites ($p < 0.05$, ANOVA followed by Tukey test).

Figure 3 – Inflammation associated with ligatures decreases its severity on the proximity of the bone crest towards the end of the experimental period in comparison to that observed on LPS injection sites. Representative images of each experimental period (control, 5, 15 and 30 days) are shown according to the method of induction of experimental periodontal disease (LPS or ligatures). The general characteristics of the inflammatory reaction are similar between both methods and include increases on densities of cells and vascular structures, and decreases on number of fibroblastic cells and collagen. The image from a control site depicts the positioning of the $250 \mu\text{M}^2$ grids on the two areas studied on the stereometric analysis: a submarginal area limited coronally by the junctional epithelium and laterally by the tooth structure, and the bone crest area with an apical limit set at $25 \mu\text{M}$ below the most coronal part of the bone crest and laterally by the tooth structure.

Figure 4 – Stereometric analysis indicate that LPS injections are associated with a sustained inflammatory reaction at the bone crest area. Inflammation was studied by the relative presence of inflammatory cells, vascular structures, fibroblastic cells and collagen on two $250 \mu\text{M}^2$ areas (schematically shown on figure 3). The LPS-induced inflammation was sustained at both the bone crest and submarginal areas throughout the 30-day experimental period, which is consistent with the persistent challenge to the host immune system represented by the injections performed 2 times/week for the duration of the experimental period (panel A and B respectively). On the other hand, the density of inflammatory cells decreased on the proximity of the bone crest at days 15 and 30 for ligature model (panel A). The ! indicates a significant difference ($p < 0.05$, ANOVA and

Tukey tests) from control sites and ⁺,* indicates a significant difference ($p < 0.05$, One-sample t test) between Ligature and LPS models in the same period.

Figure 1

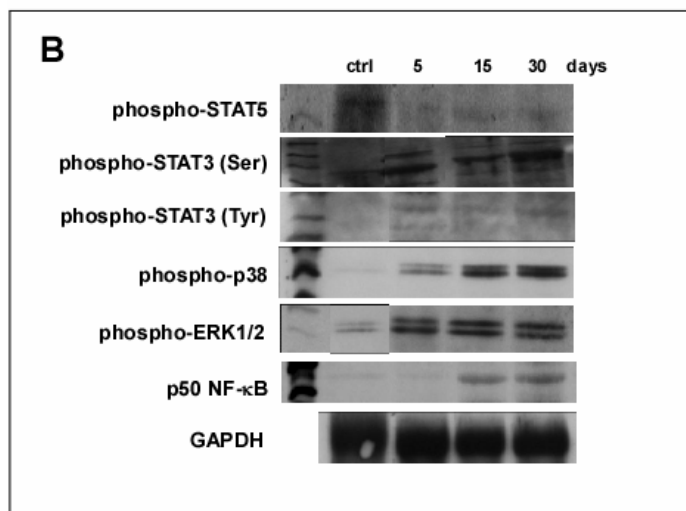
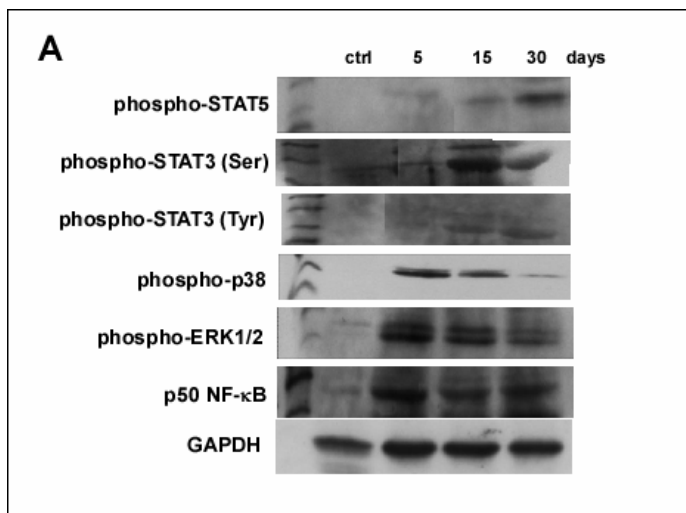


Figure 2

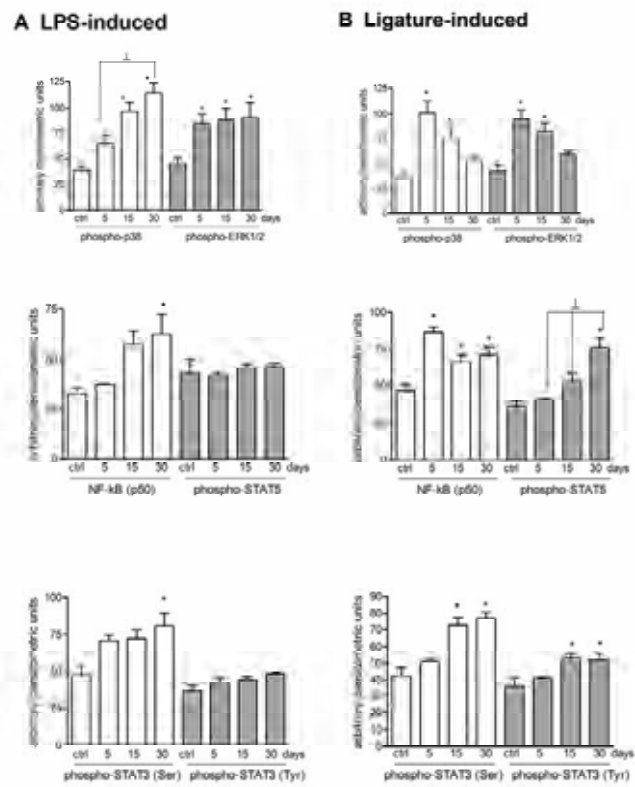


Figure 3

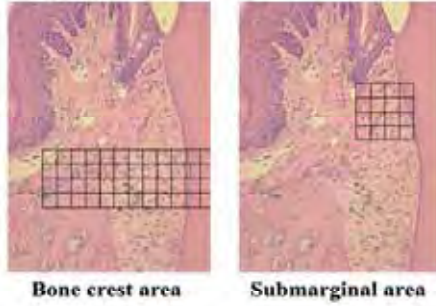
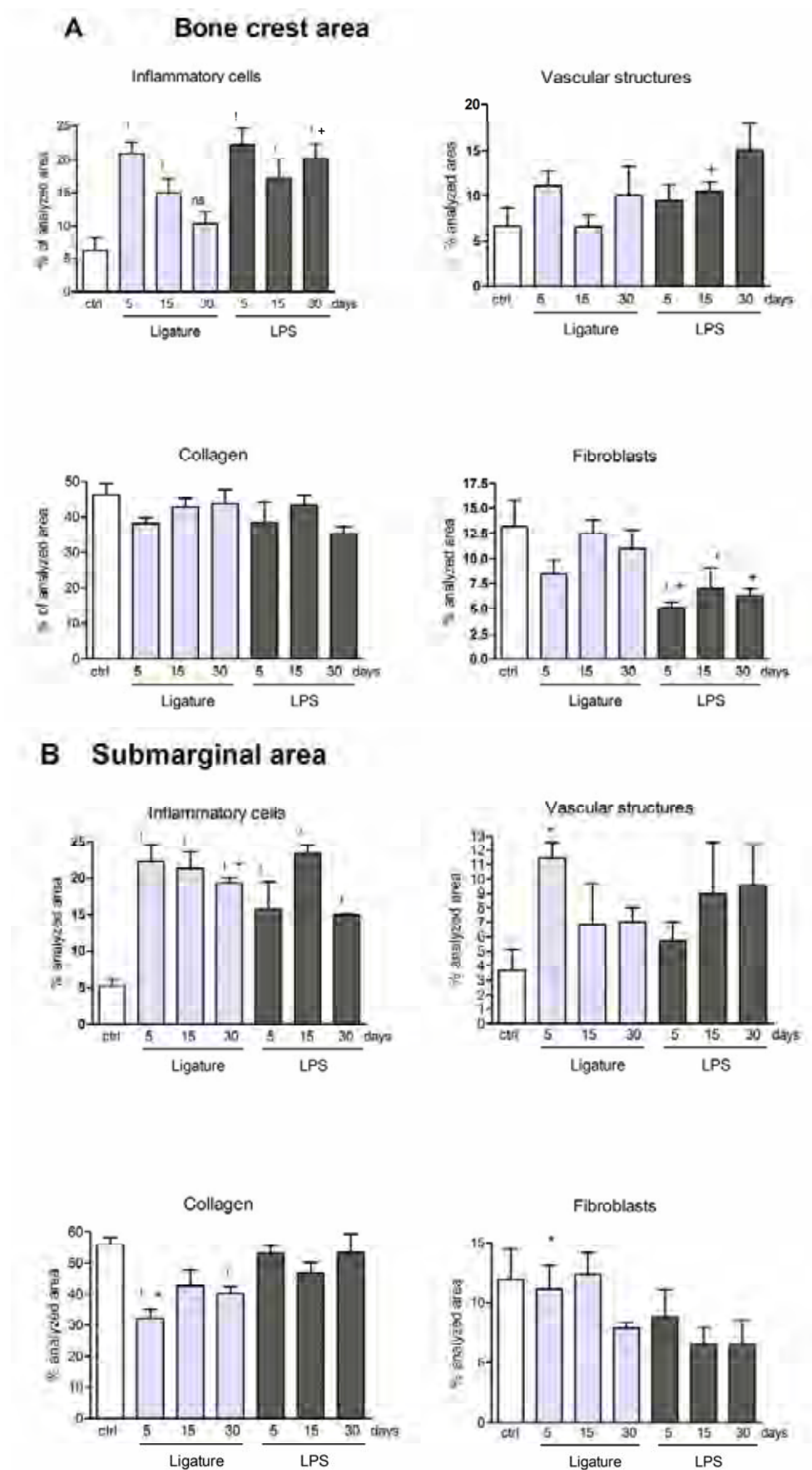
Control**Ligature model****5 days****15 days****30 days****LPS model****5 days****15 days****30 days**

Figure 4



Material e método

Obtenção e manutenção de animais

Foram utilizados 30 ratos Wistar (*Norvegicus albinus*) machos e adultos, mantidos no biotério da UNICAMP, com padrão SPF (*Specific Pathogen Free*), de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da UNICAMP. O número de animais utilizados foi determinado a partir dos períodos experimentais propostos, considerando 08 animais do grupo experimental e dois animais do grupo controle-negativo (sham-tratados) por período experimental. Os animais foram acomodados em gaiolas de polipropileno e receberam alimentação granulada (Labina/Purina) e água *ad libitum*, sendo pesados semanalmente. O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da UNICAMP (Anexo 1).

Os 30 animais foram distribuídos em dois grupos experimentais:

- grupo controle negativo (seis animais): sham-tratados
- grupo tratamento (24 animais): submetidos à indução de doença periodontal

Indução da doença periodontal

Neste estudo, o modelo de indução de doença periodontal por ligadura, assim como o de injeção de LPS na região palatina, foi utilizado.

Inicialmente os animais receberam anestesia geral (0,08 mL de Ketamina e 0,04 mL de cloridrato de xilasina por 100g de peso corporal) e foram em seguida posicionados em mesa operatória. O modelo de ligadura foi obtido com a colocação de um fio de algodão número 24 ao redor dos

primeiros molares inferiores bilateralmente. Na região palatina entre o 1º e 2º molar, realizou-se com microseringas tipo Hamilton (Agilent), a injeção de um volume de 3µL, correspondendo a um total de 30 µg, de LPS de *Eschericia coli* (strain 055:B5 - Sigma Chem Co). As injeções de LPS foram repetidas 02 vezes por semana bilateralmente, durante as quatro semanas de duração do experimento, sendo os animais sedados previamente à realização das injeções. O grupo controle recebeu injeções de PBS (veículo) na gengiva palatina dos primeiros molares superiores, enquanto ligaduras não foram colocadas nos molares inferiores.

A utilização do LPS para indução de reabsorção óssea periodontal é um método bastante utilizado na literatura^{3,27,61} e visa possibilitar a avaliação da expressão do gene de interesse MMP-13 após estímulo inicial limitado ao *toll-like receptor 4* (TLR-4). Na doença periodontal induzida por ligadura, além da possibilidade de participação de um estímulo mecânico na indução da resposta inflamatória, o acúmulo de microrganismos viáveis implica na participação de diferentes antígenos ou padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*), como toxinas e produtos do metabolismo microbiano, CpG DNA, flagelos e peptídeoglicanos. Embora a indução por ligadura possa representar mais apropriadamente a situação clínica da doença periodontal no humano, a complexidade dos antígenos envolvidos interagindo com diferentes receptores e levando à ativação de diversas vias de sinalização intracelular dificulta a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de destruição do tecido conjuntivo e ósseo. Assim, para efeito comparativo, optamos por incluir no modelo experimental a indução do processo de reabsorção óssea por meio de um agonista de TLR-4.

Sacrifício dos animais, obtenção de amostras e delineamento experimental

Previamente à colocação das ligaduras e início das injeções de LPS, 02 animais do grupo controle negativo foram sacrificados, em câmara de CO₂, para servirem como *baseline*. Após 5, 15 e 30 dias do início do experimento, 08 animais do grupo tratamento, bem como dois animais do grupo controle negativo foram sacrificados. A seleção destes períodos considerou a representação do início da agressão ou períodos precoces do desenvolvimento da resposta imune-inflamatória nos tecidos periodontais (cinco dias), uma vez que a ativação das vias de sinalização e expressão de citocinas é usualmente bastante rápida e transitória, com alterações no perfil de citocinas expressas segundo a fase de desenvolvimento da resposta inflamatória e doença periodontal. Os períodos de 15 e 30 dias seriam representativos da doença instalada em nível moderado/avançado de severidade. A cronologia do experimento está representada na Tabela 1.

Imediatamente após o sacrifício, a mandíbula de cada animal foi removida e separada em duas hemimandíbulas, assim como os blocos envolvendo 1º e 2º molares superiores. Estas peças provenientes da mandíbula e da maxila foram então reduzidas e destinadas à estereometria ou à extração de RNA total e proteínas.

Em relação ao grupo controle negativo, as peças obtidas de um animal de cada período experimental foram processadas para a análise estereométrica. Para a mesma finalidade, destinou-se um número de três peças superiores e três peças inferiores dos animais do grupo tratamento sacrificados em cada período experimental. Já a coleta de tecidos moles para extração de RNA total e proteínas, foi realizada no restante das peças de

ambos os grupos, removendo-se o tecido gengival das regiões que sofreram a indução da doença periodontal, ou seja, dos 1^{os} molares inferiores e da região entre 1^o e 2^o molares superiores.

As peças para estereometria foram fixadas em formol tamponado a 10% durante 48h e então desmineralizadas em solução de EDTA (0.5 M, pH 8.0) sob agitação à temperatura ambiente durante 2-3 meses (com troca da solução 2x/semana), com posterior inclusão em parafina. Cortes seriados de 4 µm de espessura foram obtidos na direção vestibulo-lingual, montados em lâminas de vidro e em seguida receberam a coloração (H/E), para posterior análise estereométrica do processo inflamatório.

Os tecidos periodontais coletados para extração de RNA total foram armazenados logo após sua remoção em 1mL de Trizol (guanidine isothiocyanate) (Invitrogen, Corp.) a -80°C. Já o tecido mole destinado à extração de proteínas foi mantido a -20°C em 500µL de RNA holder (Bioagency) até o momento do processamento para as análises.

Tabela 1 – Cronologia do Experimento

	0	5	10	15	30
Colocação da ligadura	+				
Checagem da ligadura		+	+	+	+
Sacrifício	+	+		+	+

+ significa que o procedimento foi realizado no período indicado. *Apenas 02 animais do grupo controle negativo foram sacrificados no baseline do experimento.

* Injeções de LPS serão realizadas 2 vezes / semana, durante as 4 semanas.

Estereometria

A análise estereométrica do processo inflamatório foi realizada com o auxílio de um microscópio de luz (Diastar-Cambridge Instruments) na magnificação de 200 x. Um total de 3 cortes foi avaliado por dente. Um intervalo 100 μM foi dado entre esses cortes com o objetivo de se obter em 300 μM de extensão áreas representativas das porções mesial, média e distal do dente.

A técnica estereológica de contagem de pontos foi empregada nos cortes de HE para avaliar a proporção de componentes teciduais em um plano bidimensional por microscopia. Este procedimento permite a avaliação quantitativa do quadro inflamatório nas proximidades da agressão.

Com esta finalidade, foi determinada a densidade volumétrica relativa (ou proporção) dos seguintes componentes teciduais: fibras colágenas, fibroblastos, outros tipos de células (inflamatórias, osteoclastos, cementoblastos, etc.), vasos sanguíneos e outras estruturas (que correspondem ao tecido ósseo, epitelial, dente e nervos). Duas diferentes localizações anatômicas da porção vestibular e/ou palatina dos cortes foram quantificadas:

1- o tecido conjuntivo subjacente ao sulco gengival, junto à base do epitélio juncional (EJ) – O limite coronal foi representado pela borda apical do epitélio juncional e a estrutura dental correspondeu ao limite medial.

2- o tecido conjuntivo próximo ao topo da crista óssea, junto à superfície dental (CO) – O limite apical foi delimitado 25 μM abaixo da porção mais coronal da crista óssea e a estrutura dental correspondeu ao limite medial.

Nos cortes que receberam a injeção de LPS, foi realizada apenas a análise da região palatina. Após a captura de imagens, a quantificação foi feita com o auxílio de grades confeccionadas com a dimensão de $50\ \mu\text{M} \times 50\ \mu\text{M}$ ou $250\ \mu\text{M}^2$ de área. Estas grades foram posicionadas (sobrepostas) preenchendo as duas regiões de interesse da imagem (EJ e CO) e, para cada grade, foram contados 25 pontos coincidentes sobre as estruturas histológicas. Em seguida, foi feita uma análise percentual de cada componente tecidual em relação ao número total de pontos contados por período experimental baseado no trabalho de Odze et al.⁴⁸ para a representação gráfica da estereometria. Estes mesmos cortes foram submetidos a uma segunda forma de análise estereométrica. Todas as análises foram realizadas 3 vezes por um examinador cego para os grupos experimentais. O processo inflamatório foi determinado através de um escore de células inflamatórias (PMN/mononucleares) de acordo com Liu et al.³⁸: 0, ausência de células inflamatórias; 1, inflamação leve, com uma pequena quantidade de células inflamatórias; 2, inflamação moderada (número significativo de células inflamatórias difusas pelo tecido conjuntivo acima da crista óssea); 3, inflamação severa, com predominância de células inflamatórias. Para a aplicação deste sistema de escores, os cortes histológicos mandibulares foram divididos em 3 áreas de forma fictícia, tendo como base o topo da crista óssea, em direção ao tecido conjuntivo gengival. As regiões pré-determinadas e avaliadas foram: 1, próxima ao dente; 2, o centro da crista óssea, 3, lateralmente à crista óssea. O modelo de ligadura foi avaliado para essas 3 regiões pelo lado vestibular/bucal e lingual. Já os cortes maxilares, tratados com LPS, sofreram análise da porção palatina, especificamente da área próxima ao topo da crista óssea alveolar. O valor médio para cada animal

foi determinado e usado para avaliar a extensão do quadro inflamatório durante os diferentes períodos experimentais dos modelos de ligadura e LPS.

Extração de RNA total, transcrição reversa e PCR

O RNA total do tecido foi extraído com o reagente Trizol, segundo o protocolo do fornecedor (Invitrogen Corp.). A quantidade e pureza do RNA foram determinadas em espectrofotômetro de luz UV (Biomate 3 - Thermo Electron Corporation) por meio da avaliação das absorvâncias a 260 nm e da relação entre as absorvâncias a 260/280 nm, respectivamente.

A síntese de cDNA foi realizada subsequentemente em termociclador (MyCycler - Bio-Rad), utilizando 800 ng de RNA total na presença de Oligo-dT (12-18) primers, dNTPs, MgCl₂ e enzima de transcriptase reversa, segundo as instruções do fabricante (Improm II - Promega).

Os pares de primers específicos para MMP-13 e para o gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) estão apresentados na Tabela 2. GAPDH foi utilizado como controle endógeno do RT-PCR por ser um gene constitutivo, cuja expressão não se altera com a indução da doença periodontal. Embora as seqüências de pares de primers específicas para os genes-alvo de camundongos tenham sido publicadas na literatura, as condições da reação de PCR (incluindo concentração de primers, temperatura de anelamento e número de ciclos) foram otimizadas em experimentos-piloto. As seqüências dos RNAs mensageiros utilizadas neste trabalho foram obtidas no banco público de dados NCBI.

Tabela 2 – Seqüência dos primers e condições iniciais da reação de PCR (Camundongo)

Gene	Primers (5' – 3') Sense (S) e antisense (AS)	Acession #	Ta (°C)	Amplicon	Ciclos
<i>GAPDH</i>	CACCATGGAGAAGGCCGGGG – S GACGGACACATTGGGGGTAG – AS	BC083065	52	418 bp	25
<i>MMP13</i>	GGTCCCAAACGAACCTTAACCTTACA – S CCTTGAACGTCATCATCAGGAAGC – AS	NM008607	60	445 bp	35

A reação de PCR foi feita em termociclador (MyCycler - Bio-Rad), com um volume total de 25 µL, utilizando 2 µL do produto da reação de transcriptase reversa na presença de 100 pmol/µL de primers de cada gene (50 pmol/µL de cada primer, *sense* e *antisense*), além de uma concentração de MgCl₂ de 1,5 mM para GAPDH e 2,5 mM para MMP-13. Os produtos da reação de PCR foram resolvidos por meio de eletroforese em gel de agarose a 1.5% (Invitrogen Corp.) e corados com brometo de etídeo (0.5 µg/mL – Invitrogen Corp.). Para documentação e análise, foram obtidas imagens digitalizadas destes géis (ImageQuant 100 – GE Healthcare) e submetidas à análise densitométrica. A expressão do gene - alvo foi normalizada para a expressão do *housekeeping gene* (GAPDH) e expressa como *fold change* em relação ao controle negativo.

Western blot

A expressão de MMP-13 foi confirmada por *Western blot*, técnica também empregada na determinação da ativação das vias de sinalização intracelular (p38 e ERK MAPKinases) e dos fatores de transcrição avaliados (STAT3, STAT-5 e NF-κB).

Para isto, foram utilizadas amostras de proteína total extraídas dos tecidos periodontais representativos dos diferentes períodos experimentais, segundo instruções do fabricante. Para isto, foi preparado o tampão de

extração contendo T-PER (Tissue Protein Extraction Reagent - Pierce) e o coquetel inibidor de protease (Protein Stabilizing Cocktail - Pierce). Este tampão foi adicionado aos tecidos, os quais foram macerados, centrifugados por 5 minutos a 13.000 RPM a 4°C (Sorvall fresco), com posterior remoção do sobrenadante. Os extratos de proteína foram então concentrados, segundo instruções do fabricante (Microcon YM10 – Millipore Corp.), com centrifugação de 10000g por 25 minutos à temperatura ambiente e quantificados pelo método de *Bradford* (Bio-Rad) a 595nm em leitor de ELISA ELx 800 (Bio-Tek). Quantidades iguais de proteína total (40 µg) foram resolvidas por eletroforese.

As amostras de proteína foram em seguida coletadas por homogeneização em tampão de amostra contendo SDS 2% (3x SDS Sample Buffer Blue – Cell Signaling) e 41.7mM de DTT (30x DTT Cell Signaling), e ajuste de um volume final igual para as amostras com o tampão de extração de proteínas. Esta homogeneização foi feita em gelo, seguida de fervura para desnaturação protéica à 97°C por 5 minutos, posterior centrifugação de 30 segundos a 13000 RPM (centrífuga 5415D – Eppendorf) e manutenção em gelo por 5 minutos, procedimentos também realizados para o padrão de peso molecular biotilado (Cell Signaling).

Para o *Western blot*, as amostras foram separadas em géis de poliacrilamida Tris-Cl a 10% (Mini-Protean 3 cell – Bio-Rad), utilizando voltagem constante de 100 V por 90 minutos, seguidos de eletro-transferência (Mini Trans-blot Electrophoretic Transfer Cell – Bio Rad) para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad) durante 1 hora a 300 mA cte. Após o bloqueio em tampão Tris-NaCl (TBS) contendo 5% de leite desnatado liofilizado (*blocking buffer*) por 1 hora sob agitação (TS-2000 VDRL *shaker* – Biomixer) à temperatura ambiente, as membranas receberam 3 lavagens de 5 minutos com

tampão TBS-Tween (TBS-T) a 0,1% e foram incubadas sob agitação (Mini Rocker MR-1 – Biosan) *overnight* a 4°C com os anticorpos primários para as proteínas de interesse: MMP-13 (Ab3 LIPCO II D1 – Lab Vision Neomarkers) na diluição de 1:50 em PBS; formas fosforiladas de: NF-κB-p50 (1:1000 em PBS - Santa Cruz Biotechnology), STAT3, STAT-5, p38 e ERK MAPKinasas (Cell Signaling) na diluição de 1:1000 em tampão de diluição de anticorpo primário (BSA 5%), além de GAPDH (1:400 - Santa Cruz Biotechnology) para confirmar que quantidades iguais de proteínas totais foram utilizadas). Os anticorpos secundários utilizados (conjugados à *horseradish peroxidase*) foram diluídos de acordo com as instruções do fabricante (Cell Signaling/Santa Cruz Biotechnology). Para MMP-13, utilizou-se o anticorpo secundário anti-camundongo (1:1000 - Cell Signaling) diluído em *blocking buffer* e para as demais proteínas, um anticorpo secundário anti-coelho (Santa Cruz Biotechnology) nas mesmas condições. Após remoção do anticorpo primário e 3 lavagens com TBS-T, a incubação com o secundário foi realizada por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação (TS-2000 VDRL *shaker* – Biomixer). Em seguida, as membranas foram novamente lavadas e a detecção da presença das proteínas realizada por um sistema de quimioluminescência (LumiGlo, Cell Signaling).

Imagens digitalizadas dos filmes radiográficos para *Western blot* foram obtidas em um sistema de digital de fotodocumentação (ImageQuant 100 – GE Healthcare) e submetidas à análise densitométrica.

Discussão

A progressão da doença periodontal é caracterizada pelos processos de degradação da matriz extracelular e reabsorção óssea os quais resultam da reação inflamatória/imune iniciada em resposta à agressão pelos microrganismos do biofilme dental e suas toxinas. A severidade do dano tecidual na doença periodontal é proporcional aos níveis de citocinas e mediadores pró-inflamatórios presentes nos sítios periodontais doentes^{15,50}. Esta afirmação é suportada por diversos estudos que demonstram elevados níveis de citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF- α e PGE₂ nas lesões periodontais^{10,14,16,19,33,59,72}.

Na complexa rede de citocinas estabelecida com a reação inflamatória associada à doença periodontal, diversos mediadores biológicos são produzidos, incluindo a MMP-13²¹, a qual pode ter um importante papel nos processos de degradação da matriz extracelular e reabsorção óssea. Sua relevância nestes processos está relacionada ao amplo padrão de substratos da MMP-13, que inclui colágenos tipo I, II e IV, e também ao fato dos tecidos periodontais mineralizados e não-mineralizados apresentarem elevada proporção de colágeno em sua composição; o que justifica o papel de destaque desta colagenase no desenvolvimento das lesões periodontais e também em outras alterações de caráter inflamatório crônico com aspectos histológicos de degradação de matriz extracelular semelhantes aos da doença periodontal, como a artrite reumatóide²⁵.

Estudos in vivo demonstram a presença e atividade da MMP-13 nos tecidos periodontais, a qual participa em eventos fisiológicos de remodelação óssea e do *turnover* da matriz extracelular⁷³, enquanto em níveis de

expressão mais elevados associados ao quadro inflamatório crônico das doenças periodontais⁷⁴ participa dos processos de degradação da matriz extracelular e reabsorção óssea^{24-25,74}. O papel da MMP-13 no processo de reabsorção óssea é suportado por dados *in vivo*^{32,39}. Os resultados obtidos em ambos os modelos de periodontite induzida experimentalmente utilizados neste trabalho demonstram aumento na expressão de MMP-13, tanto em nível de mRNA quanto protéico, em comparação aos níveis de expressão observados nos animais do grupo controle, em que não foi induzida a doença periodontal. O reduzido nível de MMP-13 encontrado no periodonto dos animais do grupo controle é coerente com o conceito de que a MMP-13 é uma endoprotease de expressão estritamente regulada^{58,71}.

Uma vez que a expressão gênica de MMPs é regulada por diversos mediadores inflamatórios, entre os quais, as citocinas^{50,63}, o grau de inflamação presente nos tecidos periodontais, e conseqüentemente os níveis de expressão de citocinas inflamatórias, pode influenciar a produção de MMP-13 por diferentes tipos de células residentes e inflamatórias. Este fato foi observado em nossos resultados, que demonstraram que o perfil de expressão de MMP-13 em nível de mRNA acompanhou a intensidade do processo inflamatório durante a progressão da doença periodontal. Assim, ambos os modelos experimentais apresentaram, já aos 5 dias de indução, uma reação inflamatória considerável a qual se manteve por todo o período experimental de 30 dias no modelo de injeção de LPS, embora tenha apresentado significativa redução de intensidade no modelo de ligadura aos 30 dias. Os níveis de expressão de mRNA de MMP-13 acompanharam a severidade da inflamação verificada pela estereometria.

A redução do processo inflamatório aos 30 dias no modelo de ligadura, embora não seja comumente verificada, pode ser atribuída ao deslocamento do tecido gengival apicalmente, na tentativa de afastar-se da agressão e recuperar o espaço biológico. É importante ressaltar que, após a colocação da ligadura na região cervical do primeiro molar inferior dos animais, esta não foi reposicionada à medida que ocorria a migração apical da margem gengival, havendo assim um maior distanciamento entre os tecidos periodontais e o estímulo agressor, o que proporcionou a diminuição da intensidade da agressão. Este fato não ocorreu no modelo de LPS, em que as repetidas injeções mantinham a intensidade da agressão e, conseqüentemente, do processo inflamatório. Esta diferença entre as metodologias avaliadas influenciou diretamente os resultados. De qualquer forma, é possível constatar uma importante correlação entre a expressão de MMP-13, a severidade do processo inflamatório e densidade de células inflamatórias, sugerindo-se então uma importante participação destas células na produção de mRNA de MMP-13. Já em relação à expressão da MMP-13 em nível protéico, não foi observada correlação com os níveis de mRNA, demonstrando a falta de acoplamento transcrição-tradução (*transcription-translation coupling*).

Estudos *in vitro* demonstram que a regulação da expressão gênica de MMP-13 é complexa e pode envolver mecanismos transcricionais^{62-63,78} e pós-transcricionais^{9,65,77}. A falta de correlação entre os níveis de RNAm e proteína em ambos os modelos experimentais, sugere uma regulação pós-transcricional da expressão de MMP-13 na doença periodontal *in vivo*. De forma interessante, esta participação de mecanismos pós-transcricionais de

regulação da MMP-13 parece ter ocorrido nos dois modelos experimentais avaliados, porém de forma distinta. No modelo de ligadura, a diminuição dos níveis de mRNA foi acompanhada por aumento dos níveis de proteína, enquanto no modelo de LPS foi observado o oposto.

De fato, existem evidências de que a regulação da expressão de MMP-13 depende da natureza do estímulo extracelular^{62-63,83}. Os resultados deste trabalho de certa forma suportam estas observações, uma vez que as formas de indução da periodontite utilizadas neste estudo desencadearam respostas distintas. A injeção de LPS de *E.coli* promove um estímulo inicial limitado ao TLR4, enquanto a colocação de ligadura além de incluir um estímulo de trauma mecânico, proporciona o acúmulo de microrganismos viáveis e seus variados PAMPs, o que leva a ativação de distintos TLRs e de diversas vias de sinalização celular, o que pode resultar em uma resposta inflamatória mais intensa, como demonstrado nos resultados de estereometria. É importante considerar que a origem (espécie de microrganismo), grau de pureza e regime de aplicação de LPS variam entre os trabalhos que utilizaram esta metodologia^{3,61}, fatores que podem influenciar a intensidade da inflamação e, conseqüentemente, a severidade do dano tecidual.

No entanto, tanto a natureza quanto a intensidade do estímulo extracelular determinam quais receptores celulares serão engajados e, assim, as vias de sinalização intracelular ativadas. As vias de sinalização, por sua vez, influenciam de forma decisiva a regulação da expressão gênica e o estabelecimento da rede de citocinas, incluindo a da MMP-13, finalmente determinando o estabelecimento da resposta inflamatória/imune como um todo. O papel das vias de sinalização intracelular na regulação da expressão

gênica usualmente é estudado num contexto de ativação rápida e transitória; no entanto considerando a persistência do estímulo agressor nas doenças periodontais e os níveis elevados de citocinas associados à inflamação crônica que indicam ativação sustentada das vias de sinalização, torna-se interessante compreender a dinâmica de ativação destas vias no estabelecimento da inflamação crônica dos tecidos periodontais, pois deste entendimento podem ser desenvolvidas estratégias terapêuticas para modulação da inflamação *in vivo*^{26-27,61}.

Neste estudo avaliamos a ativação de algumas vias de sinalização intracelular relacionadas à expressão de mediadores inflamatórios, incluindo a MMP-13, em dois modelos de doença periodontal induzida experimentalmente. Dessa forma, em diferentes momentos do desenvolvimento da doença periodontal destrutiva e estabelecimento da inflamação crônica associada, avaliamos a ativação de p38 e ERK MAPKinases, STAT-3, STAT-5 e NF- κ B. A seleção destas vias baseou-se no envolvimento destas em desordens inflamatórias, entre elas, a doença periodontal^{3,61}, e na regulação da expressão de mediadores inflamatórios relacionados à degradação de tecido conjuntivo e reabsorção óssea como: IL-1⁴⁹, TNF- α ², IL-6^{8,53}, RANKL⁶⁴ e MMP-13⁶³.

É interessante observar que as informações sobre o papel das vias de sinalização são derivadas de estudos *in vitro*, assim a maior complexidade dos eventos *in vivo*, incluindo a variedade de estímulos extracelulares e a participação de diversos tipos celulares e de mediadores inflamatórios endógenos podem influenciar decisivamente o papel das vias de sinalização intracelular no controle da expressão gênica. Mesmo em estudos *in vitro*

podemos encontrar evidências do papel da natureza do estímulo extracelular, como a demonstração de que o papel da ativação da p38 MAPK na regulação da expressão de MMP-13 em fibroblastos do ligamento periodontal^{62,63} pode resultar em regulação positiva ou negativa da expressão gênica, dependendo do estímulo extracelular.

Esta influência do estímulo extracelular sobre as vias de sinalização ativadas no desenvolvimento do processo inflamatório foi demonstrada em nossos resultados, visto que os modelos de ligadura e LPS apresentaram evidentes diferenças na cinética de ativação das vias analisadas. Ativação de STAT3 e STAT5, por exemplo, foi detectada apenas no modelo de ligadura. Já aos 5 dias de indução, este modelo apresentou consideráveis níveis de p38, ERK e NF- κ B, com diminuição das MAPKinasas entre os períodos de 15 e 30 dias e manutenção da ativação de NF- κ B durante todo o período experimental. Já o modelo de LPS apresentou uma ativação de p38 e NF- κ B mais tardia, aos 15 e 30 dias, enquanto apenas ERK foi significativamente ativada aos 5 dias de indução. Esta cinética de ativação das vias de sinalização, da mesma forma que a expressão de mRNA de MMP-13, acompanhou a severidade do processo inflamatório presente nos tecidos periodontais em ambos os modelos. Portanto, o perfil de expressão diferencial de MMP-13 tanto em nível de mRNA quanto protéico verificado nos modelos de LPS e ligadura, pode ser relacionado à ativação diferencial das vias de sinalização intracelular. Além disso, as diferenças no perfil inflamatório e de ativação dessas vias em ambos os modelos estão relacionadas à ativação diferencial (qualitativa e quantitativa) de receptores celulares, promovida por cada forma de indução. LPS ativa preferencialmente

TLR4, podendo-se atribuir a este fato a menor severidade de inflamação verificada neste modelo, além da ativação em menores níveis das MAPKinasas e de NF- κ B. Entretanto, a presença destas proteínas foi detectada ao longo dos 30 dias de indução, paralelamente ao estabelecimento e aumento da severidade da reação inflamatória com as injeções de LPS. Além disso, a intensa ativação de ERK aos 5 dias nesse modelo sugere a ativação preferencial dessa via por TLR4, o que não era esperado. Já a colocação de ligadura promove, com o trauma mecânico inicial aliado à presença de microrganismos viáveis e seus variados PAMPs, a ativação de um número maior de TLRs e, conseqüentemente, uma maior complexidade da rede de sinalização, o que está diretamente relacionado à intensidade da resposta inflamatória presente, conforme observado pela análise estereométrica.

Assim, uma mesma via de sinalização pode ser ativada por diferentes estímulos extracelulares e desencadear uma resposta específica, na dependência da intensidade e cinética de ativação. Ao mesmo tempo, um mesmo estímulo extracelular pode promover a ativação de vias de sinalização distintas, as quais podem interagir por meio de *cross-talk* e resultar em um determinado efeito sobre a regulação da expressão gênica e, conseqüentemente, ter impacto decisivo no estabelecimento da rede de citocinas. É importante ressaltar que diferentes vias podem atuar sobre esse controle, tanto em mecanismos transcricionais como pós-transcricionais, sendo que a participação de mecanismos pós-transcricionais é sugerida pelos nossos resultados na produção de MMP-13 durante a doença periodontal induzida in vivo.

Finalmente, considerando o importante papel da MMP-13 como mediador biológico da resposta do hospedeiro na doença periodontal e em outras condições inflamatórias de fisiopatologia semelhante como a artrite reumatóide, um melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação da expressão gênica desta collagenase na inflamação crônica pode ter importante aplicação terapêutica. Sabe-se que citocinas pró-inflamatórias são capazes de induzir a expressão de MMP-13 em células do tecido periodontal⁶³, além da participação destas moléculas imunorreguladoras na progressão da doença periodontal, condição em que são verificadas em níveis aumentados^{10,14,16,19,33,59,72}. O padrão de resposta imune/inflamatória gerada frente os microrganismos do biofilme dental é determinado pela rede de citocinas estabelecida^{15,50} que, por sua vez, depende da complexidade das vias ativadas diante determinado estímulo externo. Portanto, o melhor entendimento da cinética de ativação e papel das vias de sinalização intracelular na doença periodontal e em outros processos inflamatórios e infecciosos é de fundamental importância para a compreensão da regulação da expressão gênica in vivo, incluindo o estabelecimento da rede de citocinas. Neste sentido, o presente estudo mostrou a aplicabilidade de ambos os modelos de doença periodontal no estudo da sinalização envolvida em processos inflamatórios, mas detectou significantes diferenças entre os métodos. O modelo de LPS apresentou uma sinalização inicialmente limitada ao TLR4. Estudos recentes verificaram a participação da sinalização via TLRs na patogênese da artrite reumatóide⁶⁶, o que aumenta a utilidade das informações obtidas pelo modelo de doença periodontal induzida por LPS. No entanto, a colocação de ligadura promoveu uma ativação mais

complexa de receptores e vias de sinalização relacionadas, sendo este modelo considerado mais representativo da situação clínica. Estas significativas diferenças entre os modelos sugerem a presença de distintos perfis de citocinas associados a cada modelo experimental. Assim, um melhor entendimento de todo esse processo em nível molecular deve ser elucidado e empregado na elaboração de alternativas terapêuticas que possam intervir diretamente na transdução do sinal e assim, no perfil de citocinas produzidas²⁶⁻²⁷, bem como de outros importantes mediadores biológicos da resposta do hospedeiro, como a MMP-13.

Conclusão

O perfil de expressão dos níveis de mRNA de MMP-13, assim como a cinética das vias de sinalização ativadas durante o curso da doença periodontal foram específicos para cada modelo e estão relacionados à severidade do processo inflamatório. A falta de correlação entre os níveis de mRNA e proteína indicam que mecanismos pós-transcricionais participam da regulação da expressão dos níveis protéicos de MMP-13 in vivo. A expressão diferencial de MMP-13 nos modelos de LPS e ligadura pode estar relacionada às especificidades das vias de sinalização ativadas em cada modelo. A complexidade das redes de sinalização, severidade das respostas inflamatórias e os níveis de MMP-13 verificados em cada modelo experimental podem ser atribuídos à ativação diferencial (qualitativa e quantitativa) de receptores celulares promovida por cada forma de indução e, conseqüentemente, a distintos perfis de citocinas. A elaboração de alternativas terapêuticas que possam intervir diretamente na transdução do sinal e assim, neste perfil de citocinas, depende do melhor entendimento dos mecanismos moleculares responsáveis pela regulação da expressão gênica em desordens inflamatórias.

Referências*

1. Ahmed S, Rahman A, Hasnain A, Goldberg VM, Haqqi TM. Phenyl N-tert-butyl nitro compound down-regulates interleukin-1 beta-stimulated matrix metalloproteinase-13 gene expression in human chondrocytes: suppression of c-Jun NH2-terminal kinase, p38-mitogen-activated protein kinase and activating protein-1. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;305:981-8.
2. Ajizian SJ, English BK, Meals EA. Specific inhibitors of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J Infect Dis.* 1999;179:939-44.
3. Ambili R, Santhi WS, Janam P, Nandakumar K, Pillai MR. Expression of activated transcription factor nuclear factor-kappaB in periodontally diseased tissues. *J Periodontol.* 2005;76:1148-53.
4. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt19):3719-27.
5. Balbin M, Fueyo A, Knauper V, Lopez JM, Alvarez J, Sanchez LM, et al. Identification and enzymatic characterization of two diverging murine counterparts of human interstitial collagenase (MMP-1) expressed at sites of embryo implantation. *J Biol Chem.* 2001;276:10253-62.
6. Bartold PM, Marshall RI, Haynes DR. Periodontitis and rheumatoid arthritis: a review. *J Periodontol.* 2005; 76(11Suppl):2066-74.
7. Cappuzzo F, Magrini E, Ceresoli GL, Bartolini S, Rossi E, Ludovini V, et al. Akt phosphorylation and gefitinib efficacy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96:1133-41.
8. Chae HJ, Byun JO, Chae SW, Kim HM, Choi HI, Pae HO, et al. p38 MAPK and NF-kappaB on IL-6 release in human gingival fibroblasts. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2005;27:631-46.
9. Delany AM, Jeffrey JJ, Rydziel S, Canalis E. Cortisol increases interstitial collagenase expression in osteoblasts by post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem.* 1995;270:26607-12.
10. Ejeil AL, Gaultier F, Igondjo-Tchen S, Senni K, Pellat B, Godeau G, et al. Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression? *J Periodontol.* 2003;74:196-201.

*De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site: <http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform-requirements.html>

11. El Mabrouk M, Sylvester J, Zafarullah M. Signaling pathways implicated in oncostatin M-induced aggrecanase-1 and matrix metalloproteinase-13 expression in human articular chondrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773:309-20.
12. Elkington PT, O'Kane CM, Friedland JS. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin Exp Immunol*. 2005;142:12-20.
13. Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J, et al. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem*. 1994;269:16766-73.
14. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol*. 2000;71:1535-45.
15. Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol*. 2006;21:12-20.
16. Geivelis M, Turner DW, Pederson ED, Lamberts BL. Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *J Periodontol*. 1993;64:980-3.
17. Genco RJ, Slots J. Host responses in periodontal diseases. *J Dent Res*. 1984;63:441-51.
18. Gillis S, Williams DE. Cytokine therapy: lessons learned and future challenges. *Curr Opin Immunol*. 1998;10:501-3.
19. Gorska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2003;30:1046-52.
20. Graves DT. The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in periodontal disease progression. *Clin Infect Dis*. 1999;28:482-90.
21. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003;74:391-401.
22. Greenwald RA, Kirkwood K. Adult periodontitis as a model for rheumatoid arthritis (with emphasis on treatment strategies). *J Rheumatol*. 1999;26:1650-3.
23. Hefti AF. Aspects of cell biology of the normal periodontium. *Periodontol* 2000. 1993;3:64-75.

24. Hernandez M, Valenzuela MA, Lopez-Otin C, Alvarez J, Lopez JM, Vernal R, et al. Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *J Periodontol.* 2006;77:1863-70.
25. Kiili M, Cox SW, Chen HY, Wahlgren J, Maisi P, Eley BM, et al. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. *J Clin Periodontol.* 2002;29:224-32.
26. Kirkwood KL, Cirelli JA, Rogers JE, Giannobile WV. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2007;43:294-315.
27. Kirkwood KL, Li F, Rogers JE, Otremba J, Coatney DD, Kreider JM, et al. A p38alpha selective mitogen-activated protein kinase inhibitor prevents periodontal bone loss. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;320:56-63.
28. Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem.* 1996;271:1544-50.
29. Knauper V, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, et al. 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.* 1996;271:17124-31.
30. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000.* 1997;14:33-53.
31. Kosaki N, Takaishi H, Kamekura S, Kimura T, Okada Y, Minqi L, et al. Impaired bone fracture healing in matrix metalloproteinase-13 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;354:846-51.
32. Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, et al. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology.* 1998;139:1338-45.
33. Lee HJ, Kang IK, Chung CP, Choi SM. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1995;22:885-90.
34. Leivonen SK, Chantry A, Hakkinen L, Han J, Kahari VM. Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression in human gingival fibroblasts. Evidence for cross-talk between Smad3 and p38 signaling pathways. *J Biol Chem.* 2002;277:46338-46.

35. Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Zafarullah M. Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biol.* 2002;21:251-62.
36. Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M, et al. Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. *Exp Cell Res.* 2003;288:208-17.
37. Listgarten MA. Pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1986;13:418-30.
38. Liu R, Bal HS, Desta T, Krothapalli N, Alyassi M, Luan Q, et al. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Dent Res.* 2006;85:510-4.
39. Ma J, Kitti U, Teronen O, Sorsa T, Husa V, Laine P, et al. Collagenases in different categories of peri-implant vertical bone loss. *J Dent Res.* 2000;79:1870-3.
40. Maskos K, Lang R, Tschesche H, Bode W. Flexibility and variability of TIMP binding: X-ray structure of the complex between collagenase-3/MMP-13 and TIMP-2. *J Mol Biol.* 2007;366:1222-31.
41. Mengshol JA, Vincenti MP, Brinckerhoff CE. IL-1 induces collagenase-3 (MMP-13) promoter activity in stably transfected chondrocytic cells: requirement for Runx-2 and activation by p38 MAPK and JNK pathways. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:4361-72.
42. Molina JR, Reid JM, Erlichman C, Sloan JA, Furth A, Safgren SL, et al. A phase I and pharmacokinetic study of the selective, non-peptidic inhibitor of matrix metalloproteinase BAY 12-9566 in combination with etoposide and carboplatin. *Anticancer Drugs.* 2005;16:997-1002.
43. Murphy G, Knauper V, Atkinson S, Butler G, English W, Hutton M, et al. Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res.* 2002;4 (Suppl 3):S39-49.
44. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006;69:562-73.
45. Nichols TC, Fischer TH, Deliarhyris EN, Baldwin AS, Jr. Role of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) in inflammation, periodontitis, and atherogenesis. *Ann Periodontol.* 2001;6:20-9.
46. Nishikawa M, Yamaguchi Y, Yoshitake K, Saeki Y. Effects of TNFalpha and prostaglandin E2 on the expression of MMPs in human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2002;37:167-76.

47. Noguchi K, Ruwanpura SM, Yan M, Yoshida N, Ishikawa I. Down-regulation of interleukin-1 α -induced matrix metalloproteinase-13 expression via EP1 receptors by prostaglandin E2 in human periodontal ligament cells. *Oral Microbiol Immunol.* 2005;20:56-9.
48. Odze RD, Marcial MA, Antonioli D. Gastric fundic gland polyps: a morphological study including mucin histochemistry, stereometry, and MIB-1 immunohistochemistry. *Hum Pathol.* 1996;27:896-903.
49. Oikawa A, Kobayashi M, Okamatsu Y, Shinki T, Kamijo R, Yamamoto M, et al. Mitogen-activated protein kinases mediate interleukin-1 β -induced receptor activator of nuclear factor- κ B ligand expression in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2007;42:367-76.
50. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1991;26(3Pt2):230-42.
51. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:617-29.
52. Patil C, Rossa C, Jr., Kirkwood KL. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide induces interleukin-6 expression through multiple mitogen-activated protein kinase pathways in periodontal ligament fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21:392-8.
53. Patil C, Zhu X, Rossa C, Jr., Kim YJ, Kirkwood KL. p38 MAPK regulates IL-1 β induced IL-6 expression through mRNA stability in osteoblasts. *Immunol Invest.* 2004;33:213-33.
54. Pendas AM, Balbin M, Llano E, Jimenez MG, Lopez-Otin C. Structural analysis and promoter characterization of the human collagenase-3 gene (MMP13). *Genomics.* 1997;40:222-33.
55. Perdiguero E, Ruiz-Bonilla V, Serrano AL, Munoz-Canoves P. Genetic deficiency of p38 α reveals its critical role in myoblast cell cycle exit: the p38 α -JNK connection. *Cell Cycle.* 2007;6:1298-303.
56. Preshaw PM, Hefti AF, Jepsen S, Etienne D, Walker C, Bradshaw MH. Subantimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis. A review. *J Clin Periodontol.* 2004;31:697-707.
57. Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol.* 2007;26:587-96.
58. Ravanti L, Hakkinen L, Larjava H, Saarialho-Kere U, Foschi M, Han J, et al. Transforming growth factor- β induces collagenase-3 expression by human gingival fibroblasts via p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1999;274:37292-300.

59. Reddi K, Wilson M, Nair S, Poole S, Henderson B. Comparison of the pro-inflammatory cytokine-stimulating activity of the surface-associated proteins of periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res.* 1996;31:120-30.
60. Reiter LA, Freeman-Cook KD, Jones CS, Martinelli GJ, Antipas AS, Berliner MA, et al. Potent, selective pyrimidinetrione-based inhibitors of MMP-13. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006;16:5822-6.
61. Rogers JE, Li F, Coatney DD, Otremba J, Kriegl JM, Protter TA, et al. A p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor arrests active alveolar bone loss in a rat periodontitis model. *J Periodontol.* 2007;78:1992-8.
62. Rossa C, Jr., Liu M, Bronson P, Kirkwood KL. Transcriptional activation of MMP-13 by periodontal pathogenic LPS requires p38 MAP kinase. *J Endotoxin Res.* 2007;13:85-93.
63. Rossa C, Jr., Liu M, Patil C, Kirkwood KL. MKK3/6-p38 MAPK negatively regulates murine MMP-13 gene expression induced by IL-1beta and TNF-alpha in immortalized periodontal ligament fibroblasts. *Matrix Biol.* 2005;24:478-88.
64. Rossa C, Jr., Ehmann K, Liu M, Patil C, Kirkwood KL. MKK3/6-p38 MAPK signaling is required for IL-1beta and TNF-alpha-induced RANKL expression in bone marrow stromal cells. *J Interferon Cytokine Res.* 2006;26:719-29.
65. Rydzziel S, Delany AM, Canalis E. AU-rich elements in the collagenase 3 mRNA mediate stabilization of the transcript by cortisol in osteoblasts. *J Biol Chem.* 2004;279:5397-404.
66. Sacre SM, Andreakos E, Kiriakidis S, Amjadi P, Lundberg A, Giddins G, et al. The Toll-like receptor adaptor proteins MyD88 and Mal/TIRAP contribute to the inflammatory and destructive processes in a human model of rheumatoid arthritis. *Am J Pathol.* 2007;170:518-25.
67. Shah R, Alvarez M, Jones DR, Torrungruang K, Watt AJ, Selvamurugan N, et al. Nmp4/CIZ regulation of matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) response to parathyroid hormone in osteoblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;287:E289-96.
68. Slots J, Genco RJ. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J Dent Res.* 1984;63:412-21.
69. Solis-Herruzo JA, Rippe RA, Schrum LW, de La Torre P, Garcia I, Jeffrey JJ, et al. Interleukin-6 increases rat metalloproteinase-13 gene expression through stimulation of activator protein 1 transcription factor in cultured fibroblasts. *J Biol Chem.* 1999;274:30919-26.

70. Sorsa T, Tjaderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med.* 2006;38:306-21.
71. Stahle-Backdahl M, Sandstedt B, Bruce K, Lindahl A, Jimenez MG, Vega JA, et al. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab Invest.* 1997;76:717-28.
72. Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol.* 1991;62:504-9.
73. Takahashi I, Nishimura M, Onodera K, Bae JW, Mitani H, Okazaki M, et al. Expression of MMP-8 and MMP-13 genes in the periodontal ligament during tooth movement in rats. *J Dent Res.* 2003;82:646-51.
74. Tervahartiala T, Pirila E, Ceponis A, Maisi P, Salo T, Tuter G, et al. 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.* 2000;79:1969-77.
75. Uchida M, Shima M, Shimoaka T, Fujieda A, Obara K, Suzuki H, et al. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) by bone resorptive factors in osteoblastic cells. *J Cell Physiol.* 2000;185:207-14.
76. Uria JA, Jimenez MG, Balbin M, Freije JM, Lopez-Otin C. Differential effects of transforming growth factor-beta on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J Biol Chem.* 1998;273:9769-77.
77. Varghese S, Canalis E. Alendronate stimulates collagenase 3 expression in osteoblasts by posttranscriptional mechanisms. *J Bone Miner Res.* 2000;15:2345-51.
78. Varghese S, Canalis E. Transcriptional regulation of collagenase-3 by interleukin-1 alpha in osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2003;90:1007-14.
79. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res.* 2002;4:157-64.
80. Wang Z, Yang H, Tachado SD, Capo-Aponte JE, Bildin VN, Koziel H, et al. Phosphatase-mediated crosstalk control of ERK and p38 MAPK signaling in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:5267-75.
81. Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J.* 1991;5:2145-54.

82. Wu N, Opalenik S, Liu J, Jansen ED, Giro MG, Davidson JM. Real-time visualization of MMP-13 promoter activity in transgenic mice. *Matrix Biol.* 2002;21:149-61.
83. Yang CM, Chien CS, Yao CC, Hsiao LD, Huang YC, Wu CB. Mechanical strain induces collagenase-3 (MMP-13) expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *J Biol Chem.* 2004;279:22158-65.
84. Zaragoza C, Soria E, Lopez E, Browning D, Balbin M, Lopez-Otin C, et al. Activation of the mitogen activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 by the nitric oxide-cGMP-cGMP-dependent protein kinase axis regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in vascular endothelial cells. *Mol Pharmacol.* 2002;62:927-35.



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEI-IB-UNICAMP

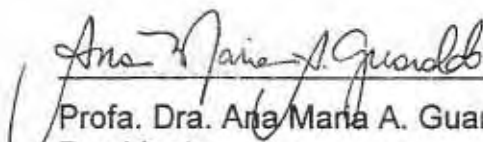
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1015-1, sobre "EXPRESSION E REGULAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS RELACIONADOS À DESTRUIÇÃO DE TECIDOS MINERALIZADOS E NÃO-MINERALIZADOS DO PERIODONTO. ESTUDO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado / Juliete Aparecida Francisco da Silva / Rafael Sartori / Sabrina Garcia de Aquino está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEI)-IB-UNICAMP em reunião de 17 de abril de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1015-1, entitled "EXPRESSION AND REGULATION OF INFLAMMATORY MEDIATORS ASSOCIATED WITH DESTRUCTION OF MINERALIZED AND NON-MINERALIZED TISSUES OF PERIODONTUM. STUDY OF THE INVOLVED SIGNALING PATHWAYS", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on April 17, 2006.

Campinas, 17 de abril de 2006.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

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

Araraquara, 17 de março de 2008.
SABRINA GARCIA DE AQUINO