FERNANDA AMORIM GOMES DA SILVA

**Avaliação temporal e espacial da expressão das
metaloproteinases de matriz tipo de membrana (MT2, MT3, MT4, MT5 e MT6-
MMP) durante a ossificação endocondral em camundongos**

São Paulo

2010

FERNANDA AMORIM GOMES DA SILVA

**Avaliação temporal e espacial da expressão das
metaloproteinases de matriz tipo de membrana (MT2, MT3, MT4, MT5 e MT6-
MMP) durante a ossificação endocondral em camundongos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Profa. Dra. Katiúcia Batista da Silva Paiva

São Paulo
2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Silva, Fernanda Amorim Gomes da

Avaliação temporal e espacial da expressão das metaloproteinases de matriz tipo de membrana (MT2, MT3, MT4, MT5 e MT6-MMP) durante a ossificação endocondral em camundongos / Fernanda Amorim Gomes da Silva; orientador Katiúcia Batista da Silva Paiva. -- São Paulo, 2010.

56p. : fig., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Ossificação. 2. Metaloproteinases. 3. Imunohistoquímica. 4. Reação em cadeia por polimerase. I. Paiva, Katiúcia Batista da Silva. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Silva FAG. Avaliação temporal e espacial da expressão das metaloproteinases de matriz tipo de membrana (MT2, MT3, MT4, MT5 e MT6-MMP) durante a ossificação endocondral em camundongos. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: / / 2010

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Celina, à minha tia, Ana e ao meu marido, Rogério, que nunca mediram esforços para que eu pudesse chegar a mais um dos meus objetivos e que estiveram do meu lado nos momentos mais difíceis. Sem vocês, nada teria sentido e nem seria possível.

AGRADECIMENTOS

À minha irmã Melissa, que sempre me apoiou em meu crescimento profissional.

À minha tia Tereza, ao meu tio Luiz e a minha prima Juliana, que sempre estiveram presentes, dando seu carinho.

Ao meu pai Carlos, a minha avó Célia e ao meu avô Carlito, que sempre se orgulharam e me apoiaram nessa jornada.

Aos meus avós Antônio Carlos e Marianice que, de onde estiverem, sempre sinto a sua presença e carinho e, nos momentos mais difíceis, por vocês eu nunca desisti.

Aos meus sogros Vera Lúcia e Euclides e aos meus cunhados Fábio, Rodrigo e Liliane, que sempre acompanharam de perto o meu crescimento.

Aos meus tios Cláudio e Silvia, por sempre acreditar no meu esforço e dedicação a este trabalho.

Ao meu professor, Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes, que me deu essa oportunidade, que sempre será um grande mestre para mim e por quem eu sempre vou ter um profundo respeito e admiração.

À Profa. Rominy Novaes Stefany, que me apresentou a Biologia Molecular e quem sempre será minha mestra, um exemplo de vida e de profissionalismo.

Aos Professores da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo: Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr., Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins, Profa. Dra. Karem Lopez Ortega, Profa. Dra. Marina Helena C. G. Magalhães, Profa. Dra. Andrea Mantesso.

Aos colegas de Pós-Graduação: Fernanda Giudice, Felipe Sperandio, Fábio Coracin, Aluana, Fátima, Luciana, Erika, Gabriela, Renata Caraméz, Camila Rodini, Flávia, Flávia Maziero, Elisangela, Gustavo, Juliana Noguti, Ronald, Felipe, Brunno, Vanessa, Fernanda Yamamoto, Thaís e Fábio Prosdócimo.

Aos funcionários da disciplina, pelo carinho e ajuda diária: Elisa, Bia, Zilda, Néia, Nair, Édna e Juvanni.

À Profa. Dra. Sônia Lopes do Instituto de Biociências, pelos ensinamentos e pelo bonito trabalho que desempenha com seus alunos.

À Profa. Dra. Katiúcia Batista da Silva Paiva.

À CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

Silva FAG. Avaliação temporal e espacial da expressão das metaloproteinases de matriz tipo de membrana (MT2, MT3, MT4, MT5 e MT6-MMP) durante a ossificação endocondral em camundongos [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2010.

As MMPs são endopeptidases zinco dependentes que, em conjunto, podem degradar todos os componentes da MEC e gerar moléculas bioativas. São as principais responsáveis pelo remodelamento tecidual durante eventos fisiológicos normais como a embriogênese e organogênese e também em eventos patológicos como a invasão tumoral nos tecidos. As pesquisas na área de mineralização biológica têm buscado identificar os genes envolvidos nos mecanismos moleculares que regula o processo de ossificação endocondral. As MMPs e seus inibidores são responsáveis pelo controle da degradação desta matriz, como os inibidores teciduais das MMPs (TIMPs) e a proteína RECK, que, muito provavelmente, determinam o grau de remodelação da matriz extracelular. Desta forma, nosso objetivo foi delinear o perfil temporal e espacial da expressão das MMP-15/MT2-MMP, MMP-16/MT3-MMP, MMP-17/MT4-MMP, MMP-24/MT5-MMP e MMP-25/MT6-MMP durante a ossificação endocondral em embriões de camundongos e em animais recém-nascidos através das técnicas de PCR em tempo real e imunohistoquímica. Por imunohistoquímica, nós não encontramos imunomarcagem para a MMP-15/MT2-MMP em nenhum dos períodos analisados, apesar da padronização do anticorpo primário. Tanto a MMP-16/MT3-MMP quanto a MMP-24/MT5-MMP foram imunolocalizadas, principalmente, nos osteoblastos do fronte de ossificação da placa de crescimento. Para a MMP-17/MT4-MMP, durante a diferenciação condrocítica (E13) os condrócitos proliferativos foram imunocorados, bem como os condrócitos hipertróficos no centro da cartilagem do molde cartilaginoso (E14). Durante a invasão celular e vascular (E15), as células mesenquimais oriundas do colar ósseo, provavelmente pré-osteoblastos, foram imunocorados na cavidade medular primitiva e osteoblastos fronte de ossificação foram imunocorados, de E16 a PN1. Observamos para a MMP-25/MT6-MMP o mesmo padrão de imunomarcagem das demais MT-MMPs, exceto no molde cartilaginoso, onde apenas as células do

periósteo e pericôndrio foram imunocoradas, diferentemente da demais que foram localizadas apenas no centro do molde cartilaginoso. A análise da expressão dos transcritos para todas as MT-MMPs revelou o mesmo perfil de expressão, sendo alta durante a fase de diferenciação condrocítica (E13), tendo queda de expressão de E14 a E16. Em E16 há um aumento de expressão até E18 e, novamente, queda até E20 e pouca ou nenhuma expressão em PN7. Apesar deste perfil semelhante, houve uma expressão diferencial entre elas, sendo a MMP-15/MT2-MMP > MMP-17/MT4-MMP > MMP-16/MT3-MMP > MMP-24/MT5-MMP > MMP-25/MT6/MMP. Os resultados obtidos mostram, pela primeira vez, que as MT-MMPs estão diferencialmente expressas durante a ossificação endocondral normal em camundongos, sugerindo que a atividade biológica destas enzimas esteja atuando na degradação da matriz extracelular pericelular tanto durante a fase de desenvolvimento quanto de formação óssea.

Palavras-Chave: Ossificação Endocondral. Metaloproteinases de Matriz Tipo Membrana. Imunohistoquímica. PCR em Tempo Real

ABSTRACT

Silva FAG. Temporal and spatial expression of membrane type-MMPs (MT2, MT3, MT4, MT5, and MT6-MMPs) during endochondral ossification in mice [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2010.

MMPs are zinc-dependent endopeptidases that, collectively, degrade all components of the ECM and generate bioactive molecules. They are able to remodelate the ECM during normal developmental processes such as embryogenesis and organogenesis, as well as in pathological processes such as tumoral invasion. The biological mineralization research looking for discovering the genes involved in the molecular mechanisms that control the endochondral ossification process. MMPs and their inhibitors (TIMPs and RECK) are responsible for bone matrix remodeling and, probably, determinate the level of its turnover. Thus, our goal was to evaluate the temporal-spatial expression of MMP-15/MT2-MMP, MMP-16/MT3-MMP, MMP-17/MT4-MMP, MMP-24/MT5-MMP, and MMP-25/MT6-MMP in mice embryos and newborns during endochondral ossification by Real Time PCR and immunohistochemistry. By immunohistochemistry, MMP-15/MT2-MMP signal was not detected. Both MMP-16/MT3-MMP and MMP-24/MT5-MMP were immunostained, mainly in osteoblasts at ossification front of growth plate. For MMP-17/MT4-MMP, proliferative chondrocytes were immunopositive during chondrocyte differentiation (E13) as well as in hypertrophic chondrocytes at the middle of cartilaginous template (E14). During cellular e vascular invasion (E15), mesenchymal cells from bone collar, probable pre-osteoblasts, were immunostained at primary bone marrow and osteoblasts at ossification front from E16 e PN1. For MMP-25/MT6-MMP, perichondrial and periosteal cells were immunostained at cartilaginous template. All MT-MMPs evaluated showed the same transcript levels profile, being high in chondrocyte differentiation (E13), decreasing from E14 to E16. mRNA levels increased from E16 to E18 and, once more, decreasing from E18 to E20. Despite this profile, we observed difference levels: MMP-15/MT2-MMP > MMP-17/MT4-MMP > MMP-16/MT3-MMP > MMP-24/MT5-MMP > MMP-25/MT6/MMP. Our findings show, for the first time, that MT-MMPs are differentially expressed during normal

endochondral ossification in mice, suggesting their biological activity act in pericellular extracellular matrix degradation in both development and bone formation.

Key-Words: Endochondral Ossification. Membrane-Type Matrix Metalloproteinases. Immunohistochemistry. Real-Time PCR

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 2.1 - Classificação das MT-MMPs e seus respectivos substratos e inibidores conhecidos	16
Figura 2.1 - Representação esquemática dos domínios das MMPs	17
Figura 2.2 - Representação esquemática do ancoramento à membrana plasmática das MT-MMPs	18
Figura 2.3 - Representação esquemática da ativação das pró-MMPs pelas MT-MMPs	19
Figura 2.4 - Representação esquemática da formação óssea endocondral durante o desenvolvimento embrionário	23
Quadro 4.1 - Anticorpos primários utilizados e os soros normais não-imunizados utilizados como controle negativo	27
Quadro 4.2 - Sequência dos <i>primers</i> e seus fragmentos amplificados	28
Quadro 5.1 - Análise dos genes endógenos pelo algoritmo GeNORM	33
Gráfico 5.1 - Análise relativa da expressão gênica das MT-MMPs durante a ossificação endocondral em camundongos	33
Figura 5.1 - Controles positivos utilizados para imunohistoquímica. (A) MMP-16/MT3-MMP; (B) MMP-15/MT2-MMP; (C) MMP-17/MT4-MMP; (D) MMP-24/MT5-MMP e MMP-25/MT6-MMP. Aumento de 40x	34
Figura 5.2 - Imunolocalização das MT-MMPs durante a ossificação endocondral em camundongos.....	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
3 PROPOSIÇÃO	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
5 RESULTADOS.....	32
6 DISCUSSÃO	36
7 CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS.....	40
ANEXOS	56

1 INTRODUÇÃO

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

As metaloproteinases de matriz são endopeptidases zinco dependentes que, em conjunto, podem degradar todos os componentes da matriz extracelular e gerar moléculas bioativas. São as principais responsáveis pelo remodelamento tecidual durante eventos fisiológicos normais como a embriogênese e organogênese, bem como em eventos patológicos como a invasão tumoral nos tecidos. As metaloproteinases de matriz tipo membrana podem degradar muitas moléculas da matriz extracelular, incluindo colágenos tipo I, II e III, gelatina, lamininas 1 e 5, fibronectina, vitronectina, agrecana, fibrina e lumicana. Devido ao ancoramento destas enzimas à membrana plasmática, estas se mostram muito distintas funcionalmente das demais metaloproteinases de matriz, conferindo um conjunto de mecanismos regulatórios importantes, tais como interação célula-matriz extracelular, controle de proteases ativas no meio pericelular, inserção de microdomínios à membrana celular, internalização e reciclagem, processamento autocatalítico, oligomerização e remoção de ectodomínios.

As pesquisas nessa área têm buscado identificar as metaloproteinases de matriz envolvidas nos mecanismos moleculares que regulam os processos de mineralização biológica durante a osteogênese, já que é sabido que algumas doenças ósseas são atribuídas à ausência ou superexpressão destas enzimas.

Nosso grupo de pesquisa vem analisando a expressão temporal e espacial das metaloproteinases de matriz e de seus inibidores (TIMPs e RECK) em diversos processos de biomineralização, tais como odontogênese e amelogênese, reparo ósseo, palatogênese, ossificação intramembranosa e endocondral, bem como os genes e fatores de transcrição (Ras, Myc, Fos e Jun) que os regulam através de

técnicas de imunohistoquímica, zimografia em gel e *in situ*, hibridização *in situ* e PCR em tempo real.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi delinear o perfil de expressão temporal e espacial das MMP-15/MT2-MMP, MMP-16/MT3-MMP, MMP-17/MT4-MMP, MMP-24/MT5-MMP e MMP-25/MT6-MMP durante a ossificação endocondral em camundongos por PCR em tempo real e imunohistoquímica.

Os resultados obtidos mostram, pela primeira vez, que as MT-MMPs estão diferencialmente expressas durante a ossificação endocondral normal em camundongos, sugerindo que a atividade biológica destas enzimas esteja atuando na degradação da matriz extracelular pericelular tanto durante a fase de desenvolvimento quanto de formação óssea.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Metaloproteinases de Matriz

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma importante família de endopeptidases, com 28 membros conhecidos e representam a maior classe de enzimas que, coletivamente, são responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC), sendo as únicas enzimas capazes de clivar colágenos fibrilares (1), diversas proteínas da superfície celular e do meio pericelular e algumas proteínas intracelulares. Através destas variadas formas de atuação, as MMPs podem afetar profundamente o ambiente pericelular e a promoção ou desfavorecimento da integridade tecidual não somente pela degradação da MEC, mas também pela geração de moléculas bioativas (2). As MMPs de mamíferos são classificadas em solúveis e insolúveis (MMPs ancoradas à membrana celular - MT-MMP), que apresentam um domínio de ancoramento à membrana plasmática.

O recrutamento de proteases secretadas para a membrana celular não somente aumenta o repertório proteolítico das células, mas também resulta em altas concentrações locais de proteases. Um nível de controle é obtido através da proteólise focal (3) e esta é de suma importância em muitos eventos mediados pelas MMPs, tais como remodelação tecidual, angiogênese e metástase tumoral. As MT-MMPs desempenham um importante papel na proteólise focal por estarem ancoradas a membrana celular. Apesar de apresentarem alto grau de similaridade estrutural, estas possuem diferenças na especificidade aos substratos, no recrutamento de TIMPs para a ativação da pró-MMP-2 (4,5) e na localização celular e tecidual (6-8) (Quadro 2.1).

As MMPs são sintetizadas como pré-pró-enzimas e a maioria são secretadas na forma latente, ou seja, pró-enzimas (zimogênio), contendo 5 domínios básicos: (I) N-terminal pré-peptídico (cerca de 10 kDa), sinalizador da secreção e removido no retículo endoplasmático rugoso; (II) N-terminal pré-peptídico, removido intra ou extracelularmente; (III) catalítico (20 kDa); (IV) região da alça; e (V) C-terminal tipo hemopexina (30 kDa) (9). Estes domínios representam a composição básica de todas as MMPs (exceto das MMPs -7 e -23, as mais simples dentre as MMPs e não

possuem o domínio hemopexina e nem a região da alça), e o aumento dos domínios está diretamente relacionado com o aumento da especificidade enzima-substrato ou em relação a sua localização celular, como é o caso das MT-MMPs. Todas MMPs são ativas em pH neutro, requerem Ca^{2+} para ativação e manutenção da conformação tridimensional. As MMPs solúveis são ativadas por clivagem enzimática (por serina proteínaases e outras MMPs) do domínio pró-peptídico (PRCGVPDV - especificamente entre a cisteína e o Zn^{+2}), liberando um fragmento de, aproximadamente, 10 kDa.

Esta subfamília compreende seis membros, sendo que as MT1, MT2, MT3 e MT5-MMPs (MMP-14/MT1-MMP, MMP-15/MT2-MMP, MMP-16/MT3-MMP e MMP-24/MT5-MMP, respectivamente) são ancoradas à membrana celular por um domínio hidrofóbico transmembrana do tipo I, seguido de uma cauda citossólica (cerca de 20-22 resíduos de aminoácidos) que interage com proteínas intracelulares relacionadas a várias vias de sinalização e, ainda, possuem uma conformação diferente do sítio catalítico (“MT-loop”), outra característica que as difere das demais MMPs (10). Enquanto que as MT4 e MT6-MMPs (MMP-17/MT4-MMP e MMP-25/MT6-MMP, respectivamente) não apresentam o domínio transmembrana, a cauda citossólica e nem o “MT-loop”, mas são ancoradas à membrana via âncora GPI (glicosilfosfatidilinositol) (11,12) e apresentam uma região adicional (“stem” ou “stalk”), entre o domínio hemopexina e a âncora GPI, contendo de 2 a 3 cisteínas que proporcionam a formação de pontes dissulfeto (13), promovendo a homodimerização destas enzimas na superfície celular (14), sugerindo que estas enzimas apresentam um conjunto de funções bem distinto das demais MMPs (Figura 2.1).

Este processo resulta na alteração na conformação tridimensional da proteína, revelando assim o seu sítio ativo e este é o mecanismo de ativação conhecido como *cysteine switch* (15,16). Existe ainda outro mecanismo de ativação chamado *stepwise activation* (17) onde a clivagem de um determinado ponto do domínio pró-peptídico remove apenas uma parte da sequência peptídica e sua completa remoção é, freqüentemente, efetuada por uma MMP intermediária ou por outra ativa.

<i>MT-MMP</i>	<i>Nomenclatura</i>	<i>Inibidores</i>	<i>Substratos</i>
14	MT1-MMP	TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4 e RECK	Col I (18,19), II (19,20), III (18,19), XVIII (21), aggrecana (22,23), gel I (18,19), caseína, nidogênio (18), elastina, fibronectina (18,19), Fator XII (24), perlecana (18), fibrina (25), fibrilina (26), fibrinogênio (24,25), vitronectina (19), laminina-1 (19), laminina-5 (γ2) (27), laminina-5(β3), pró-TGF-β (28), pró-TNF-α (18), sindecana-1 (29), proteína inibidora de mielina(30), CD44 (31), MCP-3, tTG (32), MUC1, lumicana, sulfato de dermatana, tenascina C (18), LDL-RP, integrina αv (33), IL-8 (34), SDF-1 (35), KiSS-1 proteína (36), metastina (36), CTGF, DR6 (37,38), gC1qr, glicana β, α1-PI, α2M, tTG (32), apoA-I (39), apoE (39), gelsolina plasmática (39;40), apoC-II (41), IL-8, SLPI (38), pro-TNF-a (38), CTGF (38), APP (42)
15	MT2-MMP	-	Col I, IV (43), gel, aggrecana (18), fibronectina (18), fibrilina (26), tenascina C (18), laminina-1 (18), nidogênio (18), tTG (32), perlecana (18), LDL-RP, fibronectina (18)
16	MT3-MMP	TIMP-2, TIMP-3 TIMP-4 (5)	Col II, III, gel (44,45), caseína (45), vitronectina (44), fibronectina (44), tTG (32), aggrecana, CD44, α1-PI (44), sindecana, LDL-RP, laminina-1 (44), glicana β, KiSS-1 proteína (36), metastina (36), α2-M (44), APP (42)
17	MT4-MMP	-	Fibrina (46), gel (47), fibrinogênio (46), pró-TNF-α (46,47), aggrecanase-1 (ADAMTS-4) (48), LDL-RP
24	MT5-MMP	TIMP-1 (49)	KiSS-1 proteína (36), metastina (36), gel, sulfato de condroitina, sulfato de dermatana, APP (42)
25	MT6-MMP ou leucosina	TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3 (49)	Fibrina (49), fibrinogênio (49), col IV (49), gel (49), fibronectina (49), sulfato de dermatana e condroitina (49), N-caderina (50)

APP: proteína precursora da amiloide beta ("amyloid-β precursor protein"); **Col:** colágeno; **Gel:** gelatina; **TGF-β:** fator de crescimento tumoral beta ("tumor growth factor β"); **TNF-α:** fator de necrose tumoral ("tumor necrosis factor α"); **MCP:** proteína quimioatrativa de monócitos ("monocyte chemoattractant protein"); **tTG:** transglutaminase tecidual ("tissue transglutaminase"); **MUC1:** mucina transmembrana ("mucin transmembrane"); **LDL-RP:** proteína receptora de lipoproteína de baixa densidade ("low-density lipoprotein receptor protein"); **IL-8:** interleucina ("interleucin"); **CTGF:** fator de crescimento de tecido conjuntivo ("connective tissue growth factor"); **DR6:** receptor de morte 6 ("death receptor 6"); **gC1qr:** proteína ligadora do domínio da cabeça globular do componente complemento C1q ("binding protein for the globular head domains of complement component C1q"); **SDF-1:** fator derivado de células estromais ("stromal cell-derived factor"); **α1-PI:** anti-quimiotripsina α1 ("α1 antichymotrypsin"); **apo:** apolipoproteína; **α2-M:** macroglobulina α2 ("α2-macroglobulin").

Quadro 2.1 - Classificação das MT-MMPs e seus respectivos substratos e inibidores conhecidos

Figura 2.1 – Representação esquemática dos domínios das MMPs. Pré: segmento pré-peptídico sinal (N-terminal); Pró: segmento pró-peptídico com um grupamento tiol (SH) livre ligador de zinco (N-terminal); A: região da alça; F: sítio susceptível a atuação de enzimas tipo furina; DT: domínio transmembrana (C-terminal); C: cauda citoplasmática (C-terminal); GPI: domínio glicosilfosfatidilinositol ancorado à membrana plasmática (C-terminal); Vn: domínio tipo vitronectinaa/hemopexina contendo 4 repetições, sendo que a primeira e a última estão ligadas por ponte dissulfeto; DTRIL-1 r-P/C: domínio tipo receptor de IL-1 (interleucina-1) rico em prolina/cisteína (C-terminal); “MT-loop”: conformação tridimensional diferente do sítio catalítico das demais MMPs; RS: região “stem” ou “stalk” entre o domínio hemopexina e o domínio GPI composto de 2 a 3 cisteínas que proporcionam a formação de pontes dissulfeto, promovendo a homodimerização destas enzimas na superfície celular

Embora a maior parte destas enzimas seja secretada como pró-enzimas, dez pró-MMPs possuem uma sequência de reconhecimento da pró-proteína convertase tipo furina localizada no final do segmento pró-peptídeo e são ativadas intracelularmente e secretadas para a MEC (MMP-11, MMP-21 e MMP-28) (51-55) ou ancoradas à membrana celular na forma ativa (MMP-23 e MT-MMPs) (55-61) (Figura 2.2).

Apesar do mecanismo de ativação da pró-MMP-2 tenha sido amplamente estudado pela formação do complexo ternário MMP-2/MMP-14/TIMP-2 (62), as MMP-15/MT-MMP-2 (63), MMP-16/MT3-MMP (64), MMP-24/MT5-MMP (65) e MMP-25/MT6-MMP (66,67) também podem ativar a pró-MMP-2. Bigg e colaboradores (68) propuseram que a pró-MMP-2 poderia ser ativada pela MMP-17/MT4-MMP, mas English *et al.* (46) demonstraram que a conclusão destes autores estava equivocada. Além disso, o recrutamento de TIMPs é também bastante diferente daquele apresentado pela MMP-14 (Figura 2.3). Além da MMP-2, outras MMPs podem ser ativadas pelas MT-MMPs (18,57,64,69,70), com exceção da MMP-24/MT5-MMP.

Estas enzimas são fortemente reguladas aos níveis transcricional, pós-transcricional, protéico via seus ativadores e inibidores e interação com componentes específicos da MEC (71). A expressão gênica destas enzimas é regulada por diversos fatores estimulantes e supressores que influenciam muitas

Figura 2.2 – Representação esquemática do ancoramento à membrana plasmática das MT-MMPs

vias de sinalização, tais como ésteres de forbol, sinais derivados de integrinas, hormônios, fatores de crescimento, oncogenes, citocinas, proteínas da MEC, regulação epigenética, stress celular e alteração na morfologia (72,73). Já ao nível da inibição enzimática, tanto a pró-enzima como a enzima ativa podem ser inibidas na MEC por seus inibidores, situados na membrana plasmática (*Reversion-Inducing-Cysteine- Rich Proteína with Kazal Motifs* - RECK) (74,75) e no perímetro pericelular, ou por aqueles secretados na MEC (*Tissue Inhibitor of MMPs* - TIMPs) (76), presentes em locais mais distantes do sítio de secreção da enzima. O balanço entre as MMPs e seus inibidores é um pré-requisito necessário para o funcionamento de eventos fisiopatológicos envolvendo a remodelação da MEC. RECK é o único inibidor das MMPs ancorado à membrana celular e inibe, exclusivamente, as MMPs - 2 (75), -9 e MMP-14 (74), mas há indícios de que a MMP-7 possa ser um possível alvo (77). Interessantemente, camundongos *knockout* para RECK (*RECK*^{-/-} e *RECK*^{+/-}) morreram *in utero* por volta dos 10,5 dias (E10,5), ou seja, antes do início da osteogênese. Além disso, estes animais apresentam a MEC alterada, tendo desarranjo na arquitetura tecidual o que acarreta anormal organogênese e redução significativa de colágeno tipo I, sugerindo que RECK pode ser um regulador chave da MEC através do controle da via de sinalização de Ras, a qual regula as MMPs e TIMPs (78).

Figura 2.3 – Representação esquemática da ativação das pró-MMPs pelas MT-MMPs. (1) (57), (2) (64), (3) (69), (4) (18) e (5) (70)

As funções desempenhadas pelas MT-MMPs são muito relacionadas a eventos ligados à proteólise pericelular. A MMP-14/MT1-MMP é a mais estudada tanto em situações fisiológicas quanto patológicas.

MMP-15/MT2-MMP foi descoberta a partir da biblioteca de cDNA de pulmão (79) e é também expressa em tumores (7,80-88) e desempenha atividade anti-apoptótica em células tumorais (89).

A MMP-16/MT3-MMP foi originalmente identificada em melanomas orais (64), mas também é expressa em cérebro (90), pulmão, placenta (64), células vasculares de músculo liso (45), córnea inflamada (91) e em diversos tumores (7,82-85,87,92). É muito similar a MMP-14 tanto estruturalmente como funcionalmente, porém apresenta atividade collagenolítica superior a da MMP-14 em relação ao colágeno tipo III e menor em relação ao colágeno tipo I (44). Dentre as MT-MMPs, é a única que apresenta *splicing* alternativo, gerando uma enzima solúvel que não possui o domínio transmembrana e apresenta funções distintas daquela ancorada à membrana (45). Ambas as formas podem ativar a pró-MMP-2 (93), entretanto, estudos funcionais em embriões de *Xenopus laevis* demonstraram que a superexpressão da forma insolúvel não interfere em genes relacionados ao desenvolvimento, enquanto que, a forma solúvel, reduz a expressão dos mesmos genes, sugerindo que ambas podem desempenhar funções distintas durante a embriogênese (94).

A MMP-17/MT4-MMP (12,95) foi clonada a partir da biblioteca de cDNA de câncer de mama (95) e é encontrada em cérebro, cólon, ovário, útero, testículo, leucócitos e superexpressa em diversos tumores (13,84,95-100). É co-localizada com a uPAR (*urokinase plasminogen activator receptor*), que também é ancorada via GPI (101), sugerindo sua participação na degradação pericelular de componentes da MEC através do sistema plaminogênio-plasmina (11).

A MMP-24/MT5-MMP (65;102) é bastante expressa por células do sistema nervoso central e periférico (103,104), testículo, fígado, rim, pâncreas, pulmão (65,102), células inflamatórias (105) e em tumores (65). Além de degradar componentes da MEC é importante na clivagem da molécula de adesão celular a N-caderina (50). Animais *MMP-24/MT5-MMP*^{-/-} não apresentaram diferenças no fenótipo, fertilidade e nem tempo de vida em relação ao animal selvagem (106,107), entretanto esta enzima parece ser fundamental no desenvolvimento normal das sinapses neuro-imunes (108).

A MMP-25/MT6-MMP (leucolisina) caracterizada em leucócitos (66)foi, ao mesmo tempo, identificada em tumores de cérebro (67), porém é expressa em muitos tecidos tumorais (13,109). Nestas células esta enzima pode ser recrutada por degranulação e após estimulação por fatores pró-inflamatórios tais como IL-1 e IL-8 (110). Pode degradar diversos componentes da MEC. É predominantemente localizada em regiões de junções célula-célula.

1.2 Ossificação Endocondral

O esqueleto é essencialmente formado por diferentes mecanismos: ossificação intramembranosa, endocondral e pericondral. As duas primeiras são originárias da condensação e diferenciação do tecido mesenquimal que pode ser de origem mesodérmica ou ecto-mesenquimal (células da crista neural). Em ambos os casos é necessário à deposição de uma matriz osteóide, pelos osteoblastos, e sua futura mineralização pela deposição de cristais de hidroxapatita. A ossificação pericondral ocorre durante a transformação do pericôndrio em periósteo (111).

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

(epífises). O desenvolvimento ósseo inicia-se no centro primário, já o centro secundário é independente e ossifica-se depois (Figura 2.4) (112).

Desde a descoberta da MMP-13 em ossos longos de ratos (113), mais da metade dos membros da família das MMPs têm sido demonstrados no tecido ósseo em diversas espécies, tais como as collagenases - MMPs -1 (114) - gelatinases - MMPs -2 (115) e -9 (116) - estromelisinases - MMPs -3 (117) e -10 (118) - e MT1-MMP (MMP-14) (119), sendo que as MMPs -9, -13 e -14 são as mais expressas. A análise de camundongos *knockout* e modelos de doenças genéticas humanas têm chamado a atenção para a importância das MMPs -2, -9, -13 e -14 para o desenvolvimento ósseo (120), já que estes animais apresentam severas deformidades ósseas. Exceto a MMP-14/MT1-MMP (119,121), pouco se conhece sobre a presença e função dos demais membros das MT-MMPs no tecido ósseo, principalmente na ossificação endocondral (121-126).

Com isso, tem-se enfatizado que as funções das MMPs deveriam ser consideradas em um espectro mais amplo do que a simples solubilização da matriz óssea e deveria incluir outros processos, tais como o recrutamento osteoclástico (127-130), coordenação da reabsorção e formação óssea (131), sobrevivência osteoblástica (28) e angiogênese (132). A chave para o entendimento do mecanismo molecular envolvendo as MMPs no osso é a precisa informação onde estas são expressas e por qual tipo celular. Existem atualmente consideráveis confusões no que diz respeito à expressão das MMPs, principalmente em osteoclastos (133).

Nosso grupo de pesquisa vem analisando a expressão temporal e espacial das MMPs (-2, -9 e -14), TIMPs (-1, -2, -3 e -4) e RECK em diversos processos de biomineralização, tais como odontogênese e amelogênese (134), reparo ósseo (135), palatogênese (136) e ossificação intramembranosa e endocondral, bem como os genes e fatores de transcrição (Ras, Myc, Fos e Jun) que os regulam através de técnicas de imunohistoquímica, zimografia em gel e *in situ*, hibridização *in situ* e PCR em tempo real.

Figura 2.4 – Representação esquemática da formação óssea endocondral durante o desenvolvimento embrionário

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi delinear o perfil de expressão temporal e espacial das MMP-15/MT2-MMP, MMP-16/MT3-MMP, MMP-17/MT4-MMP, MMP-24/MT5-MMP e MMP-25/MT6-MMP durante a ossificação endocondral em camundongos por PCR em tempo real e imunohistoquímica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e Coleta dos Tecidos

4.1.1 Tecidos embrionários

Camundongos Suíços fêmeas e machos adultos foram utilizados para o acasalamento. As fêmeas gestantes foram mortas de 13 a 20 dias (E13 – E20) após o cruzamento (dia zero estabelecido após a formação do *plug* vaginal) bem como os recém-nascidos de 1 e 7 dias de vida (PN1 e PN7). Os tecidos embrionários foram dissecados e processados de acordo com os protocolos para análise imunohistoquímica e PCR em tempo real.

Todas as fêmeas prenhas foram pré-anestesiadas (10 µL xilazina/20g animal) e, 5 minutos após, mortas por dose excessiva de anestésico composto (2 mL ketamina (50 mg/mL) + 500µL xilazina (20 mg/mL) + 7,5 mL água MilliQ, sendo que se utilizou 8 µL anestésico/g animal). As condições de manipulação e manutenção dos animais foram de acordo com as normas do Comitê de Ética da FO (Subcomissão de Bioética de Animais da FOUSP – Anexo A) e, estes, foram fornecidos e mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/USP). Todos os animais receberam ração e água *ad libitum*.

4.2 Processamento dos Tecidos

4.2.1 Tecidos parafinados

Os tecidos embrionários foram fixados em formalina a 10% em tampão fosfato em pH neutro, por 24h, desidratados em soluções de concentrações crescentes de

álcool etílico (70% e 100%), diafanizados em xilol e incluídos em parafina sintética Histosec® (Merck, Darmstedt, Alemanha).

Todos os blocos parafinados foram seccionados (5 µm) em Micrótomo Leica e os cortes seriados colocados sobre lâminas silanizadas (solução de silano a 10% (A3648, Sigma-Aldrich) em acetona (100014, Merck).

4.2.2 RNA total

Para PCR em tempo real, os tecidos dissecados (n=5/período) foram imersos em solução de RNA later® (7024, Ambion Inc., Texas, EUA) imediatamente após a coleta e armazenados a 4°C por até 1 mês (segundo recomendação do fabricante). Os tecidos foram retirados da solução de estabilização de RNA e macerados em cadinho contendo nitrogênio líquido até a obtenção de pequenos fragmentos. Em seguida, este material foi lisado utilizando o reagente TRIzol® (15596-018, Invitrogen) (1,0 mL/100 mg tecido) e as fases aquosa e orgânica foram separadas pela adição de clorofórmio (250 µL/mL TRIzol) seguida de centrifugação. A fase aquosa foi, então, coletada e o RNA precipitado pela adição de isopropanol, sendo o *pellet* ressuspensado em H₂O DEPC. O RNA purificado foi armazenado a -80°C em biofreezer. Uma alíquota de cada amostra foi quantificada por espectroscopia (Nanodrop – Laboratório de Cultura Celular/FOUSP – Prof. Décio dos Santos Pinto Jr.). Para verificar a integridade do RNA (bandas 28S e 18S), utilizamos 1 µg de RNA desnaturado por 10 min a 70°C e analisado em gel de agarose 1% com brometo de etídio.

4.3 Imunohistoquímica

4.3.1 Imunoperoxidase

As secções foram desparafinadas em xilol e reidratadas em soluções crescentes de álcool etílico (70 e 100%). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizada por incubação em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em PBS e recuperação antigênica por tampão fosfato-citrato (pH 6,0 a 96°C) (P4809, Sigma-Aldrich). Incubação com anticorpo primário *overnight* (vide Quadro 4.1). Nós utilizamos o kit EnVision+ Dual Link System-HRP (K4061, DAKO) por 30 min a temperatura ambiente. A revelação foi realizada pelo cromógeno 3, 3'-diaminobenzidina (DAB) (K3468, DAKO) e contra-coloração com Hematoxilina de Harris. As lâminas foram lavadas com tampão PBS/Triton a 0,1% e os anticorpos diluídos em PBS/BSA a 0,1%. As lâminas foram montadas com meio de montagem VectaMount™ (H-5000, Vector Laboratories, CA, USA).

<i>Anticorpo Primário</i>	<i>Animal Hospedeiro</i>	<i>Soro Normal</i>	<i>Empresa</i>	<i>Código</i>
MMP-15/MT2-MMP	Rabbit	Rabbit	Oncogene	IM48L
MMP-16/MT3-MMP	Rabbit	Rabbit	Chemicon	AB856
MMP-17/MT4-MMP	Rabbit	Rabbit	BioVision	3537-100
MMP-24/MT5-MMP	Mouse	Mouse	R&D Systems	AB924
MMP-25/MT6-MMP	Rabbit	Rabbit	Abcam	Ab39032

Quadro 4.1 - Anticorpos primários utilizados e os soros normais não-imunizados utilizados como controle negativo

4.4 PCR em Tempo Real

4.4.1 Desenho dos *primers*

Os *primers* foram desenhados utilizando o software Gene Tool, a partir da sequência Fasta (mRNA) de camundongo (*Mus musculus*) (Pubmed). Todos os *primers* tiveram suas especificidades verificadas através do alinhamento com os mRNAs de diversas espécies depositados no GenBank (Blast – Pubmed) e foram fabricados pela Invitrogen. Todos os *primers* desenhados são inter-éxon e codificam fragmentos entre 50-150 pares de base (Quadro 4.2).

Gene Alvo	Número de Acesso (NM)	Seqüência (5' - 3')	Posição (5' - 3')	Tamanho (pb)	Fragmento (pb)
GAPDH	008084.2	F: cgaccccttcattgacctc R: ctcgctcctggaagatggt	F: 146-164 R: 267-285	19 19	140
HPRT1	013556.2	F: tggacaggactgaaagactt R: aatgtaatccagcaggtcag	F: 274-293 R: 373-392	20 20	119
Tubulina 2a	009450.2	F: caaccagatcggcgctaag R: gttgccagcagcttcattgt	F: 118-136 R: 231-250	19 20	133
β -actina	007393.3	F: atggtgggaatgggtcagaa R: aatggggtacttcagggta	F: 209-228 R: 273-292	20 20	84
MMP-15/MT2-MMP	008609.3	F: ttcgctgctcccgtgct R: agccgcagccagttctcc	F: 598-615 R: 679-696	18 18	99
MMP-16/MT3-MMP	019724.3	F: tcgtgcatcggtcggtgt R: tccgttccgcagactgtag	F: 280-298 R: 334-352	19 19	73
MMP-17/MT4-MMP	011846.4	F: ggcagctacagaccagg R: gtttcatcagggccagagt	F: 285-302 R: 377-396	18 20	112
MMP-24/MT5-MMP	010808.3	F: gctgggcagaactggtaaa R: ctgctgcatagtggagacc	F: 286-305 R: 378-396	20 19	111
MMP-25/MT6-MMP	001033339.3	F: tggcgcttctgttggtcc R: ggtagccatagcgagtcag	F: 606-624 R: 686-704	19 19	99

Quadro 4.2 - Seqüência dos *primers* e seus fragmentos amplificados

4.4.2 Geração dos *templates*

Os RNAs foram tratados com DNase I (18068-015, Invitrogen), onde utilizamos 1,0 µg RNA, 1 µL tampão, 1 µL DNase I e H₂O DEPC para um volume final de 10 µL. Deixou-se 15 min à temperatura ambiente e 10 min a 65°C. Para a inativação da enzima, adicionou-se 1 µL EDTA (25 mM). Na sequência, os DNAs complementares foram sintetizados por RT-PCR (18080-093, *SuperScript™ III Reverse Transcriptase*, Invitrogen). A RT-PCR foi realizada em duas etapas: (I) alinhamento (65°C por 5 min): para um volume final de 13 µL adicionou-se 11 µL RNA tratado com Dnase I, 1,0 µL oligo(dT)12-18 primer (18418-012, Invitrogen) e 1,0 µL dNTP 10 mM (dATP 2,5 mM, dCTP 2,5 mM, dGTP 2,5 mM e dTTP 2,5 mM) (100 mM dNTP Set, PCR grade, 10297-018, Invitrogen); (II) transcrição reversa (50°C por 60 min e 70°C por 15 min): após o alinhamento, adicionou-se 4,0 µL Tampão (5X), 1,0 µL DTT (0,1M), 1,0 µL RNaseOUT™ (40 U/µL) (10777-019, Invitrogen), 1,0 µL SuperScript (200 U/µL), para um volume final de 20 µL. Ao término da segunda etapa, obtivemos o cDNA o qual foi reservado.

4.4.3 Padronização dos *primers*

A concentração ideal de cada *primer* foi analisada de acordo com a inexistência ou mínima formação de dímeros de *primer* (*primer-dimer*) e mínima variação entre as réplicas.

4.4.4 Curva de diluição padrão

O cDNA para cada gene-alvo foi diluído seriadamente (1:5) e foi amplificado pelo Kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), em triplicata e amplificados pelo equipamento 7500 (Applied Biosystems), e, então, obtidas as curvas de desnaturação (*melting curve*), amplificação (*quantification curve*) e a

regressão linear para cada *primer*. Para se obter uma boa curva padrão, é necessário uma eficiência de 100% da reação (com tolerância de ± 20), para ser validado pelo método matemático de Pfaffl (137).

4.4.5 Amplificação das amostras

Com o estabelecimento dos parâmetros de amplificação de cada *primer*, as amostras estudadas foram amplificadas a partir de 2,5 μ L de cDNA (à partir de 1,0 μ g de RNA) diluído (1:1) com quatro diferentes genes constitutivos (GAPDH, β -Actina, HPRT1 e Tubulina2a) para avaliar o seu perfil de expressão com a finalidade de selecionar, por meio do algoritmo GeNORM, o gene constitutivo mais estável e as amostras mais indicadas para normalização das reações de PCR em tempo real (138).

4.4.6 Quantificação relativa

A quantificação do produto formado durante a reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando o reagente SYBR Green Dye. A partícula fluorescente possui afinidade pelo sulco menor (*minor groove*) da dupla fita do DNA. Quando não está ligado ao DNA, emite uma pequena fluorescência no comprimento de onda (520 nm), entretanto, quando se liga a dupla fita do DNA, a fluorescência é aumentada cerca de 100 vezes permitindo assim a detecção do produto da PCR em tempo real (139).

Na análise inicial dos dados foi definido, manualmente, o *threshold* (medido acima do *baseline* e na fase exponencial). A intersecção deste com a curva de amplificação identifica-se o Ct (*Cycle threshold*), o qual é definido como o ciclo onde a fluorescência encontra-se acima do *background*). Portanto, quanto maior a concentração de um gene, mais rapidamente a sua curva de amplificação atingirá o *threshold* e menor será o seu Ct.

Assim, pelo método de Pfaffl (137), a expressão relativa dos genes-alvo podem ser normalizados por mais de 1 gene endógeno selecionado, através da seguinte fórmula:

$$\text{Expressão Relativa} = \frac{\text{Eficiência}^{\Delta\text{Ct alvo } (\Delta\text{Ct calibradora} - \Delta\text{Ct amostra})}}{\text{Eficiência}^{\Delta\text{Ct normalizador } (\Delta\text{Ct calibradora} - \Delta\text{Ct amostra})}}$$

Sendo a eficiência da reação do gene endógeno elevado ao ΔCt normalizador (o valor encontrado pelo algoritmo GeNORM) e a eficiência da reação de cada gene-alvo elevado ao ΔCt alvo (ΔCt calibradora - ΔCt amostra).

5 RESULTADOS

5.1 PCR em Tempo Real

Nós utilizamos como critérios de inclusão de amostra para a análise do RNA mensageiro àquelas que apresentaram boa relação A_{260}/A_{280} (entre 1,8 e 2,2), bandas 28S e 18S nítidas no gel de integridade, boa curva de amplificação dos quatro genes constitutivos (GAPDH, β -Actina, Tubulina2a e HPRT1) e selecionadas pelo algoritmo GeNORM. Desta forma, os genes constitutivos selecionados foram a β -Actina e Tubulina2a, por terem apresentado o menor “M” dentre os genes avaliados ($M=0,895$) (Quadro 5.1). Nós utilizamos o período PN7 como amostra calibradora, já que apresentou pouca ou nenhuma amplificação para muitos dos genes-alvo. As curvas-padrões foram realizadas utilizando placenta (MMP-15/MT2-MMP e MMP-16/MT3-MMP) e cérebro (MMP-17/MT4-MMP e MMP-24/MT5-MMP) de camundongo e apresentaram eficiências de reação de 112,545%, 119,078%, 103,733%, 100% e 100%, respectivamente.

A análise da expressão dos transcritos para todas as MT-MMPs revelou o mesmo perfil de expressão, sendo alta durante a fase de diferenciação condrocítica (E13), tendo queda de expressão de E14 a E16. Em E16 há um aumento de expressão até E18 e, novamente, queda até E20 e pouca ou nenhuma expressão em PN7 (Gráfico 5.1). Apesar deste perfil semelhante, houve uma expressão diferencial entre elas, sendo a MMP-15/MT2-MMP > MMP-17/MT4-MMP > MMP-16/MT3-MMP > MMP-24/MT5-MMP > MMP-25/MT6-MMP.

	GAPDH	BACT	HPRT	TUBB	Normalisation Factor
E13	1,29E+00	9,12E+00	8,13E-01	2,08E+02	1,9477
E14	2,23E+00	5,95E+00	2,03E+00	7,04E+02	3,0508
E15	5,51E-01	1,59E+00	1,02E+00	1,47E+02	0,7309
E16	8,29E+00	5,08E+00	8,09E+00	1,96E+02	2,9246
E18	9,36E-02	3,69E-01	2,47E-01	1,32E+01	0,1113
E20	1,19E+00	1,44E+00	9,05E-02	6,83E+01	0,7074
M < 1,5	1,492	1,321	1,811	1,381	

	GAPDH	BACT	Normalisation Factor
E13	1,29E+00	9,12E+00	2,1073
E14	2,23E+00	5,95E+00	2,2442
E15	5,51E-01	1,59E+00	0,5755
E16	8,29E+00	5,08E+00	3,9940
E18	9,36E-02	3,69E-01	0,1143
E20	1,19E+00	1,44E+00	0,8045
M < 1,5	1,256	1,256	

	GAPDH	TUBB	Normalisation Factor
E13	1,29E+00	2,08E+02	1,4172
E14	2,23E+00	7,04E+02	3,4396
E15	5,51E-01	1,47E+02	0,7809
E16	8,29E+00	1,96E+02	3,4941
E18	9,36E-02	1,32E+01	0,0963
E20	1,19E+00	6,83E+01	0,7808
M < 1,5	1,423	1,423	

	BACT	TUBB	Normalisation Factor
E13	9,12E+00	2,08E+02	2,4739
E14	5,95E+00	7,04E+02	3,6787
E15	1,59E+00	1,47E+02	0,8689
E16	5,08E+00	1,96E+02	1,7925
E18	3,69E-01	1,32E+01	0,1252
E20	1,44E+00	6,83E+01	0,5634
M < 1,5	0,895	0,895	

Quadro 5.1 - Análise dos genes endógenos pelo algoritmo GeNORM

Gráfico 5.1 - Análise relativa da expressão gênica das MT-MMPs durante a ossificação endocondral em camundongos. Amostra calibradora: PN7

5.2 Imunohistoquímica

Todos os anticorpos primários foram padronizados (Figura 5.1), utilizando como controle positivo carcinoma de cólon humano (MMP-17/MT4-MMP) (109), carcinoma epidermóide de boca contendo células inflamatórias (MMP-24/MT5-MMP e MMP-25/MT6-MMP), glândula salivar humana normal (MMP-15/MT2-MMP) e placenta de camundongo (MMP-16/MT3-MMP).

Figura 5.1 - Controles positivos utilizados para imunohistoquímica. (A) MMP-16/MT3-MMP; (B) MMP-15/MT2-MMP; (C) MMP-17/MT4-MMP; (D) MMP-24/MT5-MMP e MMP-25/MT6-MMP. Aumento de 40x

Por imunohistoquímica, nós não encontramos imunomarcção para a MMP-15/MT2-MMP em nenhum dos períodos analisados, apesar da padronização do anticorpo primário. Tanto a MMP-16/MT3-MMP quanto a MMP-24/MT5-MMP foram imunolocalizadas, principalmente, nos osteoblastos do fronte de ossificação da placa de crescimento. Para a MMP-17/MT4-MMP, durante a diferenciação condrocítica (E13) os condrócitos proliferativos foram imunocorados, bem como os condrócitos hipertróficos no centro da cartilagem do molde cartilaginoso (E14). Durante a invasão celular e vascular (E15), as células mesenquimais oriundas do colar ósseo, provavelmente pré-osteoblastos, foram imunocorados na cavidade medular primitiva e osteoblastos fronte de ossificação foram imunocorados, de E16 a PN1. Observamos para a MMP-25/MT6-MMP o mesmo padrão de imunomarcção das demais MT-MMPs, exceto no molde cartilaginoso, onde apenas as células do periósteo e pericôndrio foram imunocoradas, diferentemente da demais que foram localizadas apenas no centro do molde cartilaginoso (Figura 5.2).

Figura 5.2 - Imunolocalização das MT-MMPs durante a ossificação endocondral em camundongos. Não houve detecção da MMP-15/MT2-MMP. (A, B, D e E) As MT-MMPs ancoradas via GPI (MMP-17/MT4-MMP e MMP-25/MT6-MMP), (C) bem como as ancoradas via transmembrana (MMP-16/MT3-MMP e MMP-24/MT5-MMP) foram co-localizadas em todos os períodos avaliados. (A) Durante a diferenciação condrocítica (E13) os condrócitos proliferativos foram imunocorados. (B) No molde cartilaginoso (E14), os condrócitos hipertróficos no centro da cartilagem foram imunomarcados e (C) no pericôndrio e periósteo. (D) Durante a invasão celular e vascular (E15), as células mesenquimais oriundas do colar ósseo, provavelmente pré-osteoblastos, foram imunocorados na cavidade medular primitiva. (E) De E16 a PN1, osteoblastos do fronte de ossificação foram imunocorados

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho revela, pela primeira vez, indícios da presença e distribuição temporal e espacial das MMP-15/MT2-MMP, MMP-16/MT3-MMP, MMP-17/MT4-MMP, MMP-24/MT5-MMP e MMP-25/MT6-MMP durante a ossificação endocondral em camundongos.

Diferenciação Condrocítica (E13)

Após a condensação das células mesenquimais, nos locais das futuras peças ósseas, estas células se diferenciam em condrócitos (região central) e em células do pericôndrio (140). Estes condrócitos expressam marcadores específicos, tais como agrecana e colágeno tipo II, distinguindo-os do pericôndrio (141). Produzem, ainda, MMP-2 e MMP-9, ambas capazes de degradar colágeno tipo II (142,143) e, potencialmente, podem estar participando da remodelação da matriz cartilaginosa durante a diferenciação condrocítica (144). Neste período, seria bastante plausível a expressão das MT-MMPs, já que elas podem degradar a gelatina (produto dos colágenos desnaturados, principalmente pelas MMP-2 e MMP-9), exceto a MMP-25/MT6-MMP. Além disso, a MMP-16/MT3-MMP pode também clivar o colágeno tipo II. Verificamos altos níveis de transcritos para todas as MT-MMPs avaliadas neste projeto. Entretanto, nós imunolocalizamos apenas a MMP-17/MT4-MMP nos condrócitos proliferativos.

Molde Cartilaginoso (E14)

A peça óssea já apresenta duas partes bem distintas: a epífise e a diáfise. A epífise contém três zonas de condrócitos: zona repouso, proliferação e pré-hipertrófica, enquanto que a metáfise é composta por condrócitos hipertróficos, sinalizando que este local sofrerá vascularização, entretanto os condrócitos imaturos

e proliferativos secretam inibidores angiogênicos (145). Os níveis de transcritos decaíram, em relação, a E13, entretanto houve imunolocalização nos condrócitos hipertróficos. É bastante conhecido que a MMP-14/MT1-MMP é fundamental na troca da matriz cartilaginosa pela matriz óssea neste estágio (119).

Invasão Vascular e Celular (E15)

A substituição da matriz cartilaginosa avascular por matriz óssea, via ossificação endocondral, é realizada pela atuação coordenada de diversos tipos celulares e necessita de uma etapa vascular. A invasão vascular ocorre somente na MEC em torno dos condrócitos hipertróficos, onde as células endoteliais começam a invadir o molde cartilaginoso a partir do pericôndrio e transportam células indiferenciadas e diferenciadas osteogênicas, osteoclastos/condroclastos e hematopoiéticas, formando, então, o colar ósseo que é responsável pela degradação do septo transversal (interface entre os condrócitos hipertróficos e as células do colar ósseo) (146).

Após a migração vascular e celular, a MEC da cartilagem é, então, removida pelos condroclastos e substituída por uma matriz óssea rica em colágeno tipo I, uma molécula secretada por osteoblastos. Os condroclastos diferem dos osteoclastos por estarem localizadas na junção osteocondral e pelo fato de que elas expressam menos TRAP (fosfatase alcalina resistente ao tartarato) que os osteoclastos (128,132). A MMP-25/MT6-MMP foi localizada apenas nas células do periósteo e pericôndrio, enquanto que, as demais MT-MMPs, foram imunolocalizadas nos condrócitos hipertróficos do centro do molde cartilaginoso. Possivelmente, estas enzimas podem estar participando na degradação pericelular para a promoção da migração das células progenitoras para o centro do molde.

E16-PN1

Nesta fase, o osso já está completamente formado e a placa de crescimento está estabelecida e o crescimento ósseo longitudinal (trabéculas ósseas) é estabelecido via ossificação endocondral. Já o crescimento lateral (cortical) é via ossificação pericondral, onde o pericôndrio do molde cartilaginoso é substituído pelo periósteo (111). A expressão das MT-MMPs nestes períodos foi predominante no frente de ossificação primário, sugerindo sua participação na formação óssea.

O perfil da expressão relativa do RNA mensageiro das MT-MMPs foram bastante semelhantes, além do perfil visto pela imunohistoquímica. Desta forma, é provável que o fenômeno bastante conhecido entre as MMPs, o compensatório, esteja ocorrendo durante a ossificação endocondral normal.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram, pela primeira vez, que as MT-MMPs estão diferencialmente expressas durante a ossificação endocondral normal em camundongos, sugerindo que a atividade biológica destas enzimas esteja atuando na degradação da matriz extracelular pericelular tanto durante a fase de desenvolvimento quanto de formação óssea.

REFERÊNCIAS¹

- 1 Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol*. 1999 Nov;189(3):300-8.
- 2 Butler GS, Overall CM. Updated biological roles for matrix metalloproteinases and new "intracellular" substrates revealed by degradomics. *Biochemistry*. 2009 Nov 24;48(46):10830-45.
- 3 Itoh Y, Seiki M. MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. *J Cell Physiol*. 2006 Jan;206(1):1-8.
- 4 Morrison CJ, Butler GS, Bigg HF, Roberts CR, Soloway PD, Overall CM. Cellular activation of MMP-2 (gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway. *J Biol Chem*. 2001 Dec 14;276(50):47402-10.
- 5 Zhao H, Bernardo MM, Osenkowski P, Sohail A, Pei D, Nagase H, et al. Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem*. 2004 Mar 5;279(10):8592-601.
- 6 Morrison CJ, Overall CM. TIMP independence of matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation by membrane type 2 (MT2)-MMP is determined by contributions of both the MT2-MMP catalytic and hemopexin C domains. *J Biol Chem*. 2006 Sep 8;281(36):26528-39.
- 7 Szabova L, Yamada SS, Birkedal-Hansen H, Holmbeck K. Expression pattern of four membrane-type matrix metalloproteinases in the normal and diseased mouse mammary gland. *J Cell Physiol* 2005 Oct;205(1):123-32.
- 8 Wong H, Muzik H, Groft LL, Lafleur MA, Matouk C, Forsyth PA, et al. Monitoring MMP and TIMP mRNA expression by RT-PCR. *Methods Mol Biol*. 2001;151:305-20.
- 9 Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003 May 2;92(8):827-39.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

- 10 English WR, Holtz B, Vogt G, Knauper V, Murphy G. Characterization of the role of the "MT-loop": an eight-amino acid insertion specific to progelatinase A (MMP2) activating membrane-type matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 2001 Nov 9;276(45):42018-26.
- 11 Itoh Y, Kajita M, Kinoh H, Mori H, Okada A, Seiki M. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase. *J Biol Chem*. 1999 Nov 26;274(48):34260-6.
- 12 Kojima S, Itoh Y, Matsumoto S, Masuho Y, Seiki M. Membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MT6-MMP, MMP-25) is the second glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI)-anchored MMP. *FEBS Lett*. 2000 Sep 1;480(2-3):142-6.
- 13 Sohail A, Sun Q, Zhao H, Bernardo MM, Cho JA, Fridman R. MT4-(MMP17) and MT6-MMP (MMP25), A unique set of membrane-anchored matrix metalloproteinases: properties and expression in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2008 Jun;27(2):289-302.
- 14 Zhao H, Sohail A, Sun Q, Shi Q, Kim S, Mobashery S, et al. Identification and role of the homodimerization interface of the glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane type 6 matrix metalloproteinase (MMP25). *J Biol Chem*. 2008 Dec 12;283(50):35023-32.
- 15 Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jan;87(1):364-8.
- 16 Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jul;87(14):5578-82.
- 17 Nagase H, Enghild JJ, Suzuki K, Salvesen G. Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl)mercuric acetate. *Biochemistry*. 1990 Jun 19;29(24):5783-9.
- 18 d'Ortho MP, Will H, Atkinson S, Butler G, Messent A, Gavrilovic J, et al. Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem*. 1997 Dec 15;250(3):751-7.

19 Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem*. 1997 Jan 24;272(4):2446-51.

20 Fukui N, McAlinden A, Zhu Y, Crouch E, Broekelmann TJ, Mecham RP, et al. Processing of type II procollagen amino propeptide by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 2002 Jan 18;277(3):2193-201.

21 Ferreras M, Felbor U, Lenhard T, Olsen BR, Delaisse J. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett*. 2000 Dec 15;486(3):247-51.

22 Buttner FH, Hughes CE, Margerie D, Lichte A, Tschesche H, Caterson B, et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cleaves the recombinant aggrecan substrate rAgg1mut at the 'aggrecanase' and the MMP sites. Characterization of MT1-MMP catabolic activities on the interglobular domain of aggrecan. *Biochem J* 1998 Jul 1;333 (Pt 1):159-65.

23 Fosang AJ, Last K, Fujii Y, Seiki M, Okada Y. Membrane-type 1 MMP (MMP-14) cleaves at three sites in the aggrecan interglobular domain. *FEBS Lett*. 1998 Jul 3;430(3):186-90.

24 Hiller O, Lichte A, Oberpichler A, Kocourek A, Tschesche H. Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII. *J Biol Chem*. 2000 Oct 20;275(42):33008-13.

25 Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell*. 1998 Oct 30;95(3):365-77.

26 Ashworth JL, Murphy G, Rock MJ, Sherratt MJ, Shapiro SD, Shuttleworth CA, et al. Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodelling. *Biochem J*. 1999 May 15;340 (Pt 1):171-81.

27 Koshikawa N, Giannelli G, Cirulli V, Miyazaki K, Quaranta V. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J Cell Biol*. 2000 Feb 7;148(3):615-24.

28 Karsdal MA, Larsen L, Engsig MT, Lou H, Ferreras M, Lochter A, et al. Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J Biol Chem*. 2002 Nov 15;277(46):44061-7.

29 Endo K, Takino T, Miyamori H, Kinsen H, Yoshizaki T, Furukawa M, et al. Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *J Biol Chem*. 2003 Oct 17;278(42):40764-70.

30 Belien AT, Paganetti PA, Schwab ME. Membrane-type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter. *J Cell Biol*. 1999 Jan 25;144(2):373-84.

31 Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, Kinoh H, et al. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol*. 2001 May 28;153(5):893-904.

32 Belkin AM, Akimov SS, Zaritskaya LS, Ratnikov BI, Deryugina EI, Strongin AY. Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion. *J Biol Chem*. 2001 May 25;276(21):18415-22.

33 Deryugina EI, Ratnikov BI, Postnova TI, Rozanov DV, Strongin AY. Processing of integrin alpha(v) subunit by membrane type 1 matrix metalloproteinase stimulates migration of breast carcinoma cells on vitronectin and enhances tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem*. 2002 Mar 22;277(12):9749-56.

34 Tam EM, Morrison CJ, Wu YI, Stack MS, Overall CM. Membrane protease proteomics: Isotope-coded affinity tag MS identification of undescribed MT1-matrix metalloproteinase substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 4;101(18):6917-22.

35 McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, Power C, Clark-Lewis I, et al. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem*. 2001 Nov 23;276(47):43503-8.

36 Takino T, Koshikawa N, Miyamori H, Tanaka M, Sasaki T, Okada Y, et al. Cleavage of metastasis suppressor gene product KiSS-1 protein/metastin by matrix metalloproteinases. *Oncogene*. 2003 Jul 24;22(30):4617-26.

- 37) Derosa DC, Ryan PJ, Okragly A, Witcher DR, Benschop RJ. Tumor-derived death receptor 6 modulates dendritic cell development. *Cancer Immunol Immunother.* 2007 Oct 26.
- 38 Overall CM, Tam EM, Kappelhoff R, Connor A, Ewart T, Morrison CJ, et al. Protease degradomics: mass spectrometry discovery of protease substrates and the CLIP-CHIP, a dedicated DNA microarray of all human proteases and inhibitors. *Biol Chem.* 2004 Jun;385(6):493-504.
- 39 Hwang IK, Park SM, Kim SY, Lee ST. A proteomic approach to identify substrates of matrix metalloproteinase-14 in human plasma. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Oct 1;1702(1):79-87.
- 40 Park SM, Hwang IK, Kim SY, Lee SJ, Park KS, Lee ST. Characterization of plasma gelsolin as a substrate for matrix metalloproteinases. *Proteomics.* 2006 Feb;6(4):1192-9.
- 41 Kim SY, Park SM, Lee ST. Apolipoprotein C-II is a novel substrate for matrix metalloproteinases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jan 6;339(1):47-54.
- 42 Ahmad M, Takino T, Miyamori H, Yoshizaki T, Furukawa M, Sato H. Cleavage of amyloid-beta precursor protein (APP) by membrane-type matrix metalloproteinases. *J Biochem.* 2006 Mar;139(3):517-26.
- 43 Rebustini IT, Myers C, Lassiter KS, Surmak A, Szabova L, Holmbeck K, et al. MT2-MMP-dependent release of collagen IV NC1 domains regulates submandibular gland branching morphogenesis. *Dev Cell.* 2009 Oct;17(4):482-93.
- 44 Shimada T, Nakamura H, Ohuchi E, Fujii Y, Murakami Y, Sato H, et al. Characterization of a truncated recombinant form of human membrane type 3 matrix metalloproteinase. *Eur J Biochem.* 1999 Jun;262(3):907-14.
- 45 Shofuda K, Yasumitsu H, Nishihashi A, Miki K, Miyazaki K. Expression of three membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in rat vascular smooth muscle cells and characterization of MT3-MMPs with and without transmembrane domain. *J Biol Chem.* 1997 Apr 11;272(15):9749-54.
- 46 English WR, Puente XS, Freije JM, Knauper V, Amour A, Merryweather A, et al. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2. *J Biol Chem.* 2000 May 12;275(19):14046-55.

- 47 Wang Y, Johnson AR, Ye QZ, Dyer RD. Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain. *J Biol Chem*. 1999 Nov 12;274(46):33043-9.
- 48 Gao G, Plaas A, Thompson VP, Jin S, Zuo F, Sandy JD. ADAMTS4 (aggrecanase-1) activation on the cell surface involves C-terminal cleavage by glycosylphosphatidyl inositol-anchored membrane type 4-matrix metalloproteinase and binding of the activated proteinase to chondroitin sulfate and heparan sulfate on syndecan-1. *J Biol Chem*. 2004 Mar 12;279(11):10042-51.
- 49 English WR, Velasco G, Stracke JO, Knauper V, Murphy G. Catalytic activities of membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MMP25). *FEBS Lett*. 2001 Feb 23;491(1-2):137-42.
- 50 Monea S, Jordan BA, Srivastava S, DeSouza S, Ziff EB. Membrane localization of membrane type 5 matrix metalloproteinase by AMPA receptor binding protein and cleavage of cadherins. *J Neurosci*. 2006 Feb 22;26(8):2300-12.
- 51 Ahokas K, Lohi J, Lohi H, Elomaa O, Karjalainen-Lindsberg ML, Kere J, et al. Matrix metalloproteinase-21, the human orthologue for XMMP, is expressed during fetal development and in cancer. *Gene*. 2002 Nov 13;301(1-2):31-41.
- 52 Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, et al. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature*. 1990 Dec 20;348(6303):699-704.
- 53 Lohi J, Wilson CL, Roby JD, Parks WC. Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. *J Biol Chem*. 2001 Mar 30;276(13):10134-44.
- 54 Marchenko GN, Strongin AY. MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors. *Gene*. 2001 Mar 7;265(1-2):87-93.
- 55 Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature*. 1995 May 18;375(6528):244-7.
- 56 Mazzone M, Baldassarre M, Beznoussenko G, Giacchetti G, Cao J, Zucker S, et al. Intracellular processing and activation of membrane type 1 matrix metalloprotease depends on its partitioning into lipid domains. *J Cell Sci*. 2004 Dec 15;117(Pt 26):6275-87.

57 Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, et al. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature*. 1994 Jul 7;370(6484):61-5.

58 Sato H, Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in tumor metastasis. *J Biochem*. 1996 Feb;119(2):209-15.

59 Stawowy P, Margeta C, Kallisch H, Seidah NG, Chretien M, Fleck E, et al. Regulation of matrix metalloproteinase MT1-MMP/MMP-2 in cardiac fibroblasts by TGF-beta1 involves furin-convertase. *Cardiovasc Res*. 2004 Jul 1;63(1):87-97.

60 Stawowy P, Meyborg H, Stibenz D, Borges Pereira SN, Roser M, Thanabalasingam U, et al. Furin-like proprotein convertases are central regulators of the membrane type matrix metalloproteinase-pro-matrix metalloproteinase-2 proteolytic cascade in atherosclerosis. *Circulation*. 2005 May 31;111(21):2820-7.

61 Yana I, Weiss SJ. Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol Biol Cell*. 2000 Jul;11(7):2387-401.

62 Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem*. 1995 Mar 10;270(10):5331-8.

63 Butler GS, Will H, Atkinson SJ, Murphy G. Membrane-type-2 matrix metalloproteinase can initiate the processing of progelatinase A and is regulated by the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Eur J Biochem* 1997 Mar 1;244(2):653-7.

64 Takino T, Sato H, Shinagawa A, Seiki M. Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMPs form a unique membrane-type subclass in the MMP family. *J Biol Chem*. 1995 Sep 29;270(39):23013-20.

65 Llano E, Pendas AM, Freije JP, Nakano A, Knauper V, Murphy G, et al. Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. *Cancer Res*. 1999 Jun 1;59(11):2570-6.

66 Pei D. Leukolysin/MMP25/MT6-MMP: a novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage. *Cell Res*. 1999 Dec;9(4):291-303.

- 67 Velasco G, Cal S, Merlos-Suarez A, Ferrando AA, Alvarez S, Nakano A, et al. Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. *Cancer Res.* 2000 Feb 15;60(4):877-82.
- 68 Bigg HF, Shi YE, Liu YE, Steffensen B, Overall CM. Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. TIMP-4 binds progelatinase A and the COOH-terminal domain in a similar manner to TIMP-2. *J Biol Chem.* 1997 Jun 13;272(24):15496-500.
- 69 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 Jul 19;271(29):17124-31.
- 70 Palosaari H, Ding Y, Larmas M, Sorsa T, Bartlett JD, Salo T, et al. Regulation and interactions of MT1-MMP and MMP-20 in human odontoblasts and pulp tissue in vitro. *J Dent Res.* 2002 May;81(5):354-9.
- 71 Fanjul-Fernandez M, Folgueras AR, Cabrera S, Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Jan;1803(1):3-19.
- 72 Benbow U, Brinckerhoff CE. The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? *Matrix Biol.* 1997 Mar;15(8-9):519-26.
- 73 Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(6-7):1362-78.
- 74 Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell.* 2001 Dec 14;107(6):789-800.
- 75 Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, Kitayama H, Maki M, Hitomi K, et al. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Oct 27;95(22):13221-6.
- 76 Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 2002 Oct 1;115(Pt 19):3719-27.

77 Omura A, Matsuzaki T, Mio K, Ogura T, Yamamoto M, Fujita A, et al. RECK forms cowbell-shaped dimers and inhibits matrix metalloproteinase-catalyzed cleavage of fibronectin. *J Biol Chem*. 2009 Feb 6;284(6):3461-9.

78 Noda M, Oh J, Takahashi R, Kondo S, Kitayama H, Takahashi C. RECK: a novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. *Cancer Metastasis Rev*. 2003 Jun;22(2-3):167-75.

79 Tanaka M, Sato H, Takino T, Iwata K, Inoue M, Seiki M. Isolation of a mouse MT2-MMP gene from a lung cDNA library and identification of its product. *FEBS Lett*. 1997 Feb 3;402(2-3):219-22.

80 Davidson B, Goldberg I, Berner A, Nesland JM, Givant-Horwitz V, Bryne M, et al. Expression of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases messenger RNA in ovarian carcinoma cells in serous effusions. *Am J Clin Pathol*. 2001 Apr;115(4):517-24.

81 Ito E, Yana I, Fujita C, Irifune A, Takeda M, Madachi A, et al. The role of MT2-MMP in cancer progression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Mar 5;393(2):222-7.

82 Kitagawa Y, Kunimi K, Ito H, Sato H, Uchibayashi T, Okada Y, et al. Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human urothelial carcinomas. *J Urol*. 1998 Oct;160(4):1540-5.

83 Nakada M, Nakamura H, Ikeda E, Fujimoto N, Yamashita J, Sato H, et al. Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors. *Am J Pathol*. 1999 Feb;154(2):417-28.

84 Nuttall RK, Pennington CJ, Taplin J, Wheal A, Yong VW, Forsyth PA, et al. Elevated membrane-type matrix metalloproteinases in gliomas revealed by profiling proteases and inhibitors in human cancer cells. *Mol Cancer Res*. 2003 Mar;1(5):333-45.

85 Ohnishi Y, Tajima S, Ishibashi A. Coordinate expression of membrane type-matrix metalloproteinases-2 and 3 (MT2-MMP and MT3-MMP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in primary and metastatic melanoma cells. *Eur J Dermatol*. 2001 Sep;11(5):420-3.

86 Ota I, Li XY, Hu Y, Weiss SJ. Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Dec 1;106(48):20318-23.

87 Ueno H, Nakamura H, Inoue M, Imai K, Noguchi M, Sato H, et al. Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas. *Cancer Res*. 1997 May 15;57(10):2055-60.

88 Zhang J, Sarkar S, Yong VW. The chemokine stromal cell derived factor-1 (CXCL12) promotes glioma invasiveness through MT2-matrix metalloproteinase. *Carcinogenesis*. 2005 Dec;26(12):2069-77.

89 Abraham R, Schafer J, Rothe M, Bange J, Knyazev P, Ullrich A. Identification of MMP-15 as an anti-apoptotic factor in cancer cells. *J Biol Chem*. 2005 Oct 7;280(40):34123-32.

90 Yoshiyama Y, Sato H, Seiki M, Shinagawa A, Takahashi M, Yamada T. Expression of the membrane-type 3 matrix metalloproteinase (MT3-MMP) in human brain tissues. *Acta Neuropathol*. 1998 Oct;96(4):347-50.

91 Dong Z, Ghabrial M, Katar M, Fridman R, Berk RS. Membrane-type matrix metalloproteinases in mice intracorneally infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000 Dec;41(13):4189-94.

92 Kitagawa Y, Kunimi K, Uchibayashi T, Sato H, Namiki M. Expression of messenger RNAs for membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human renal cell carcinomas. *J Urol*. 1999 Sep;162(3 Pt 1):905-9.

93 Matsumoto S, Katoh M, Saito S, Watanabe T, Masuho Y. Identification of soluble type of membrane-type matrix metalloproteinase-3 formed by alternatively spliced mRNA. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Nov 1;1354(2):159-70.

94 Walsh LA, Cooper CA, Damjanovski S. Soluble membrane-type 3 matrix metalloproteinase causes changes in gene expression and increased gelatinase activity during *Xenopus laevis* development. *Int J Dev Biol*. 2007;51(5):389-95.

95 Puente XS, Pendas AM, Llano E, Velasco G, Lopez-Otin C. Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Res*. 1996 Mar 1;56(5):944-9.

- 96 Chabottaux V, Sounni NE, Pennington CJ, English WR, van den Brule F, Blacher S, et al. Membrane-type 4 matrix metalloproteinase promotes breast cancer growth and metastases. *Cancer Res.* 2006 May 15;66(10):5165-72.
- 97 Chabottaux V, Ricaud S, Host L, Blacher S, Paye A, Thiry M, et al. Membrane-type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) induces lung metastasis by alteration of primary breast tumour vascular architecture. *J Cell Mol Med.* 2009 Sep;13(9B):4002-13.
- 98 Gilles C, Polette M, Seiki M, Birembaut P, Thompson EW. Implication of collagen type I-induced membrane-type 1-matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation in the metastatic progression of breast carcinoma. *Lab Invest.* 1997 May;76(5):651-60.
- 99 Grant GM, Giambernardi TA, Grant AM, Klebe RJ. Overview of expression of matrix metalloproteinases (MMP-17, MMP-18, and MMP-20) in cultured human cells. *Matrix Biol.* 1999 Apr;18(2):145-8.
- 100 Riddick AC, Shukla CJ, Pennington CJ, Bass R, Nuttall RK, Hogan A, et al. Identification of degradome components associated with prostate cancer progression by expression analysis of human prostatic tissues. *Br J Cancer.* 2005 Jun 20;92(12):2171-80.
- 101 Min HY, Semnani R, Mizukami IF, Watt K, Todd RF, III, Liu DY. cDNA for Mo3, a monocyte activation antigen, encodes the human receptor for urokinase plasminogen activator. *J Immunol.* 1992 Jun 1;148(11):3636-42.
- 102 Pei D. Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP. *J Biol Chem.* 1999 Mar 26;274(13):8925-32.
- 103 Hayashita-Kinoh H, Kinoh H, Okada A, Komori K, Itoh Y, Chiba T, et al. Membrane-type 5 matrix metalloproteinase is expressed in differentiated neurons and regulates axonal growth. *Cell Growth Differ.* 2001 Nov;12(11):573-80.
- 104 Jaworski DM. Developmental regulation of membrane type-5 matrix metalloproteinase (MT5-MMP) expression in the rat nervous system. *Brain Res.* 2000 Mar 31;860(1-2):174-7.
- 105 Bar-Or A, Nuttall RK, Duddy M, Alter A, Kim HJ, Ifergan I, et al. Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. *Brain.* 2003 Dec;126(Pt 12):2738-49.

- 106 Komori K, Nonaka T, Okada A, Kinoh H, Hayashita-Kinoh H, Yoshida N, et al. Absence of mechanical allodynia and Abeta-fiber sprouting after sciatic nerve injury in mice lacking membrane-type 5 matrix metalloproteinase. *FEBS Lett.* 2004 Jan 16;557(1-3):125-8.
- 107 Rikimaru A, Komori K, Sakamoto T, Ichise H, Yoshida N, Yana I, et al. Establishment of an MT4-MMP-deficient mouse strain representing an efficient tracking system for MT4-MMP/MMP-17 expression in vivo using beta-galactosidase. *Genes Cells.* 2007 Sep;12(9):1091-100.
- 108 Folgueras AR, Valdes-Sanchez T, Llano E, Menendez L, Baamonde A, Denlinger BL, et al. Metalloproteinase MT5-MMP is an essential modulator of neuro-immune interactions in thermal pain stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Sep 22;106(38):16451-6.
- 109 Sun Q, Weber CR, Sohail A, Bernardo MM, Toth M, Zhao H, et al. MMP25 (MT6-MMP) is highly expressed in human colon cancer, promotes tumor growth, and exhibits unique biochemical properties. *J Biol Chem.* 2007 Jul 27;282(30):21998-2010.
- 110 Kang T, Yi J, Guo A, Wang X, Overall CM, Jiang W, et al. Subcellular distribution and cytokine- and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils. *J Biol Chem.* 2001 Jun 15;276(24):21960-8.
- 111 Scott-Savage P, Hall BK. Differentiative ability of the tibial periosteum for the embryonic chick. *Acta Anat (Basel).* 1980;106(1):129-40.
- 112 Ortega N, Behonick DJ, Werb Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol.* 2004 Feb;14(2):86-93.
- 113 Walker DG, Lapiere CM, Gross J. A collagenolytic factor in rat bone promoted by parathyroid extract. *Biochem Biophys Res Commun.* 1964 Apr 22;15(5):397-402.
- 114 Cawston TE, Rowan A. Prevention of cartilage breakdown by matrix metalloproteinase inhibition--a realistic therapeutic target? *Br J Rheumatol.* 1998 Apr;37(4):353-6.

- 115 Lefebvre V, Peeters-Joris C, Vaes G. Production of gelatin-degrading matrix metalloproteinases ('type IV collagenases') and inhibitors by articular chondrocytes during their dedifferentiation by serial subcultures and under stimulation by interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha. *Biochim Biophys Acta*. 1991 Aug 13;1094(1):8-18.
- 116 Reponen P, Sahlberg C, Munaut C, Thesleff I, Tryggvason K. High expression of 92-kDa type IV collagenase (gelatinase) in the osteoclast lineage during mouse development. *Ann N Y Acad Sci*. 1994 Sep 6;732:472-5.
- 117 Keyszer G, Lambiri I, Keysser M, Keysser C, Nagel R, Burmester GR, et al. Matrix metalloproteinases, but not cathepsins B, H, and L or their inhibitors in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis are potentially useful markers of disease activity. *Z Rheumatol*. 1998 Dec;57(6):392-8.
- 118 Bord S, Horner A, Hembry RM, Compston JE. Stromelysin-1 (MMP-3) and stromelysin-2 (MMP-10) expression in developing human bone: potential roles in skeletal development. *Bone*. 1998 Jul;23(1):7-12.
- 119 Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, et al. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell*. 1999 Oct 1;99(1):81-92.
- 120 Delaisse JM, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc Res Tech*. 2003 Aug 15;61(6):504-13.
- 121 Shi J, Son MY, Yamada S, Szabova L, Kahan S, Chrysovergis K, et al. Membrane-type MMPs enable extracellular matrix permissiveness and mesenchymal cell proliferation during embryogenesis. *Dev Biol*. 2008 Jan 1;313(1):196-209.
- 122 Bernal F, Hartung HP, Kieseier BC. Tissue mRNA expression in rat of newly described matrix metalloproteinases. *Biol Res*. 2005;38(2-3):267-71.
- 123 Simsa S, Genina O, Ornan EM. Matrix metalloproteinase expression and localization in turkey (*Meleagris gallopavo*) during the endochondral ossification process. *J Anim Sci*. 2007 Jun;85(6):1393-401.
- 124 Takei I, Takagi M, Santavirta S, Ida H, Ishii M, Ogino T, et al. Messenger ribonucleic acid expression of 16 matrix metalloproteinases in bone-implant interface tissues of loose artificial hip joints. *J Biomed Mater Res*. 2000 Dec 15;52(4):613-20.

- 125 Tamamura Y, Otani T, Kanatani N, Koyama E, Kitagaki J, Komori T, et al. Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *J Biol Chem*. 2005 May 13;280(19):19185-95.
- 126 Yang M, Zhang B, Zhang L, Gibson G. Contrasting expression of membrane metalloproteinases, MT1-MMP and MT3-MMP, suggests distinct functions in skeletal development. *Cell Tissue Res*. 2008 Jul;333(1):81-90.
- 127 Blavier L, Delaisse JM. Matrix metalloproteinases are obligatory for the migration of preosteoclasts to the developing marrow cavity of primitive long bones. *J Cell Sci*. 1995 Dec;108 (Pt 12):3649-59.
- 128 Engsig MT, Chen QJ, Vu TH, Pedersen AC, Therkidsen B, Lund LR, et al. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol*. 2000 Nov 13;151(4):879-89.
- 129 Karsdal MA, Fjording MS, Foged NT, Delaisse JM, Lochter A. Transforming growth factor-beta-induced osteoblast elongation regulates osteoclastic bone resorption through a p38 mitogen-activated protein kinase- and matrix metalloproteinase-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2001 Oct 19;276(42):39350-8.
- 130 Sato T, Foged NT, Delaisse JM. The migration of purified osteoclasts through collagen is inhibited by matrix metalloproteinase inhibitors. *J Bone Miner Res*. 1998 Jan;13(1):59-66.
- 131 Everts V, Delaisse JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, et al. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res*. 2002 Jan;17(1):77-90.
- 132 Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, et al. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell*. 1998 May 1;93(3):411-22.
- 133 Andersen TL, del Carmen OM, Kirkegaard T, Lenhard T, Foged NT, Delaisse JM. A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells. *Bone*. 2004 Nov;35(5):1107-19.

134 Paiva KB, Zambuzzi WF, Accorsi-Mendonca T, Taga R, Nunes FD, Sogayar MC, et al. Rat forming incisor requires a rigorous ECM remodeling modulated by MMP/RECK balance. *J Mol Histol*. 2009 Oct 17.

135 Accorsi-Mendonca T, Paiva KB, Zambuzzi WF, Cestari TM, Lara VS, Sogayar MC, et al. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and RECK during alveolar bone regeneration in rat. *J Mol Histol*. 2008 Apr;39(2):201-8.

136 de Oliveira Demarchi AC, Zambuzzi WF, Paiva KB, da Silva-Valenzuela MG, Nunes FD, de Cassia Savio FR, et al. Development of secondary palate requires strict regulation of ECM remodeling: sequential distribution of RECK, MMP-2, MMP-3, and MMP-9. *Cell Tissue Res*. 2010 Apr;340(1):61-9.

137 Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45.

138 Vandesompele J, De PK, Pattyn F, Poppe B, Van RN, De PA, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034.

139 Lekan Deprez RH, Fijnvandraat AC, Ruijter JM, Moorman AF. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Anal Biochem*. 2002 Aug 1;307(1):63-9.

140 Iwasaki M, Le AX, Helms JA. Expression of indian hedgehog, bone morphogenetic protein 6 and gli during skeletal morphogenesis. *Mech Dev*. 1997 Dec;69(1-2):197-202.

141 Horton WA. In vitro chondrogenesis in human chondrodysplasias. *Am J Med Genet*. 1993 Jan 15;45(2):179-82.

142 Itoh T, Matsuda H, Tanioka M, Kuwabara K, Itohara S, Suzuki R. The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J Immunol*. 2002 Sep 1;169(5):2643-7.

143 Van den Steen PE, Proost P, Grillet B, Brand DD, Kang AH, Van DJ, et al. Cleavage of denatured natural collagen type II by neutrophil gelatinase B reveals enzyme specificity, post-translational modifications in the substrate, and the formation of remnant epitopes in rheumatoid arthritis. *FASEB J*. 2002 Mar;16(3):379-89.

144 Colnot CI, Helms JA. A molecular analysis of matrix remodeling and angiogenesis during long bone development. *Mech Dev.* 2001 Feb;100(2):245-50.

145 Moses MA, Wiederschain D, Wu I, Fernandez CA, Ghazizadeh V, Lane WS, et al. Troponin I is present in human cartilage and inhibits angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 16;96(6):2645-50.

146 Lee KK, Tang MK, Yew DT, Chow PH, Yee SP, Schneider C, et al. *gas2* is a multifunctional gene involved in the regulation of apoptosis and chondrogenesis in the developing mouse limb. *Dev Biol.* 1999 Mar 1;207(1):14-25.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FOU SP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA****PARECER DE APROVAÇÃO
PROTOCOLO nº 13/08**

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de Animais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, **APROVOU** o protocolo de pesquisa **“Avaliação temporal e espacial da expressão das metaloproteinases de matriz tipo de membrana (MT2, MT3, MT4, MT5, MT6-MMP) durante a ossificação endocondral em camundongos”**, de responsabilidade do(a) pesquisador(a) Fernanda Amorim Gomes da Silva sob orientação do Professor(a) Doutor(a) Katiúcia Batista da Silva Paiva.

Cabe ao responsável enviar relatórios referentes ao andamento da pesquisa após 06 (seis) meses e 01(um) ano desta data, bem como cópia do trabalho em “cd” ou “disquete” ao finalizá-lo, conforme legislação vigente.

São Paulo, 16 de dezembro de 2008.

Prof. Dr. CELSO LUIZ CALDEIRA
PRESIDENTE DA SUBCOMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP