

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Luís Eduardo Almeida

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE MMP-2 e MMP-9 EM
DISCOS ARTICULARES HUMANOS DA ARTICULAÇÃO
TEMPOROMANDIBULAR (ATM) COM DESORDENS INTERNAS**

CURITIBA

2013

Luís Eduardo Almeida

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE MMP-2 e MMP-9 EM
DISCOS ARTICULARES HUMANOS DA ARTICULAÇÃO
TEMPOROMANDIBULAR (ATM) COM DESORDENS INTERNAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dra. Paula Cristina Trevilatto

CURITIBA

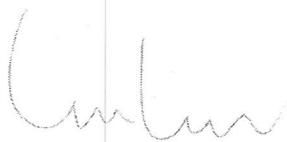
2013

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que **LUIS EDUARDO ALMEIDA** concluiu o Doutorado em Ciências da Saúde com defesa pública de tese “**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE MMP-2 e MMP-9 EM DISCOS ARTICULARES HUMANOS DA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR (ATM) COM DESARRANJOS INTERNOS**” defendida e aprovada pela Banca Examinadora nesta data. O recebimento do título de Doutor está condicionado ao cumprimento das exigências da banca examinadora e do Programa.

Por ser verdade, firmamos a presente declaração.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em Curitiba, aos dezesesseis dias do mês de julho de 2013.



Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

DEDICO

Ao meu pai e minha mãe,
Manoel e Sônia,
por sempre estarem perto e terem
me dado à oportunidade de adquirir
o maior dos prêmios desta vida que
é o estudo. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Prof^a. Dra. Paula Cristina Trevilatto, minha orientadora.

Esta figura fantástica, alegre, positiva e sempre feliz, a qual sempre estimulou o desenvolvimento deste trabalho.

Seu otimismo e felicidade contagiam todos a sua volta.

Paula, muito obrigado.

À Prof^a. Dra. Lúcia Noronha, que sempre esteve pronta para auxiliar nas dúvidas e questões, além de expandir a área a ser explorada do trabalho.

Obrigada por compartilhar seus conhecimentos.

AGRADECIMENTOS

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela oportunidade de realizar este Curso de Doutorado, colaborando com meu desenvolvimento profissional.

Às biólogas Ana Paula Camargo Martins e Marina Azevedo, pela paciência e prontidão na realização das lâminas histológicas.

À professora Marcia Olandoski, pela paciência e competência na realização da análise estatística deste estudo.

À Dra. Andrea Doetzer, pelas inúmeras revisões críticas deste trabalho.

Às alunas do curso de Odontologia PUCPR, Karina São Thiago Caporal e Viviane Ambros pela ajuda dispensada na confecção dos trabalhos histológicos.

Aos professores de áreas conexas, pelo convívio e contribuições para a formação neste curso de Doutorado.

Aos amigos e familiares, que pacientemente dividiram os momentos pelos quais vivi neste período de curso de doutorado, agradeço pelo incentivo e apoio.

A todos que de alguma maneira auxiliaram para a realização deste trabalho.

Embriagai-vos

*É necessário estar sempre bêbado.
Tudo reduz a isso, eis o único problema.
Para não sentirdes o fardo horrível do tempo,
que vos abate e vos faz pender para a terra,
é preciso que vos embriagueis sem tréguas.*

Mas de quê?

*De vinho, de poesia ou de virtude,
como achardes melhor. Contanto que vos embriagueis.
E, se algumas vezes, sobre os degraus de um palácio,
sobre a verde relva de um fosso,
ou na desolada solidão do vosso quarto,
despertardes com a embriaguez já atenuada ou desaparecida,
perguntai ao vento, à vaga, e a estrela e o pássaro e o relógio
hão de vos responder:*

– É hora de embriagai-vos!

*Para não serdes os martirizados escravos do tempo,
embriagai-vos; embriagai-vos, sem cessar!
De vinho, de poesia, ou de virtude,
como achardes melhor.*

Charles Pierre Baudelaire, 1967

Resumo

Desordens da articulação temporomandibular acomete parte da população, causando dor, alteração funcional, comprometendo a qualidade de vida desses pacientes. As metaloproteases (MMPs) são proteases conhecidas como enzimas envolvidas na remodelação tecidual, degradando colágeno da matriz extracelular no processo fisiológico normal e também na resposta inflamatória. As MMPs são vistas como as maiores responsáveis pela destruição tecidual em doenças articulares degenerativas, sendo reguladas por mediadores inflamatórios. O objetivo do trabalho foi investigar a associação da expressão da MMP-2 e MMP-9 com a desordem da articulação temporomandibular, por meio de exame imuno-histoquímico do disco articular. Quarenta e cinco (n=45) amostras de disco articular humano, i) 36 do grupo teste (pacientes apresentando deslocamento de disco com redução, n=29, e sem redução, n=7) e ii) 9 do grupo controle, foram analisados, por meio de imuno-histoquímica. A área da imunomarcagem foi comparada estatisticamente entre os grupos ($p<0,05$). Em relação à MMP-2, foram observadas diferenças na área de imunomarcagem entre o grupo controle e o grupo com deslocamento de disco com redução ($p=0,048$). Houve também diferenças significativas entre os grupos com deslocamento de disco com e sem redução ($p=0,029$), sendo a expressão significativamente aumentada no grupo sem redução (alteração mais grave). Já em relação à MMP-9, não foram vistas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo controle e o grupo com deslocamento de disco com ou sem redução, com relação à expressão ($p=0,476$). Concluiu-se que houve um aumento de expressão da MMP-2 no disco de pacientes com deslocamento de disco sem redução (alteração mais severa), enquanto que não houve diferença significativa na expressão da MMP-9 no disco da articulação temporomandibular de pacientes sem e com deslocamento de disco (com ou sem redução), por meio de análise imuno-histoquímica.

Abstract

Temporomandibular joint dysfunction (TMJ) affects part of the population, causing pain, functional alterations, compromising the quality of life of these people. Matrix metalloproteases (MMPs) are proteases known as remodeling tissue enzymes in the presence or not of immune-inflammatory diseases. MMPs are partly responsible for tissue destruction in degenerative joint diseases, with different expression among the MMPs, in healthy and ill joints. Metalloprotease-2 (MMP-2) and MMP-9 are gelatinases capable of degrading several types of the extracellular matrix collagen. The hypothesis is that in TMJ dysfunction, MMP-2 and MMP-9 expression levels might be elevated. Therefore, the aim of this study was to investigate the association of MMP-2 and MMP-9 expression with temporomandibular joint dysfunction, using immunohistochemical approach on the joint disc. A total of 45 samples of human disc joint was collected, being 36 from the test group: patients with anterior disc displacement with reduction ($n=29$) and without reduction ($n=7$); and 9 from the control group. The area of immunostaining was compared between the groups ($p<0.05$). Regarding MMP-2, differences were observed in the area of immunostaining between the control group and the group with disc displacement with reduction ($p=0.048$). Also, there were significant differences between the groups with disc displacement with and without reduction ($p=0.029$), with significantly increased expression in the group without reduction (the most severe condition). In relation to MMP-9 expression, significant differences were not seen between the control group and the groups with disc displacement with or without reduction ($p=0.476$). In conclusion, there was an increased expression of MMP-2 in patients with disc displacement without reduction (the most severe disorder), while no significant difference was observed in the expression of MMP-9 between patients with disc displacement (with or without reduction) by immunohistochemical analysis.

Sumário

INTRODUÇÃO.....	10
PROPOSIÇÃO.....	22
ARTIGO.....	23
CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
HISTÓRICO DO TRABALHO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48

Introdução

1. ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR (ATM)

A articulação temporomandibular (ATM) é diferente da maioria das outras articulações do corpo de diversas maneiras.

Em primeiro lugar, as superfícies articulares são cobertas por fibrocartilagem ao invés de cartilagem hialina. Por outro lado, ambas as articulações devem funcionar em conjunto, como uma unidade e, por conseguinte, não podem funcionar independentemente.

A ATM é única por ser uma articulação gínglimoartroidal, capaz tanto de rotação (ou seja, dobradiça ou gínglimo) quanto de translação (ou seja, delta ou artroidal) (Fig. 1).

Fundamentalmente a ATM é precisa e única para a forma e a função mandibular. (Okeson, 1996).

Doença, trauma ou deformidade, envolvendo uma ou ambas as articulações temporomandibulares, não só irá ter um impacto adverso sobre a função da mandíbula, mas, dependendo da idade do paciente e da gravidade da desordem, também sobre o crescimento e simetria do terço inferior da face (Dimitroulis, 1997).

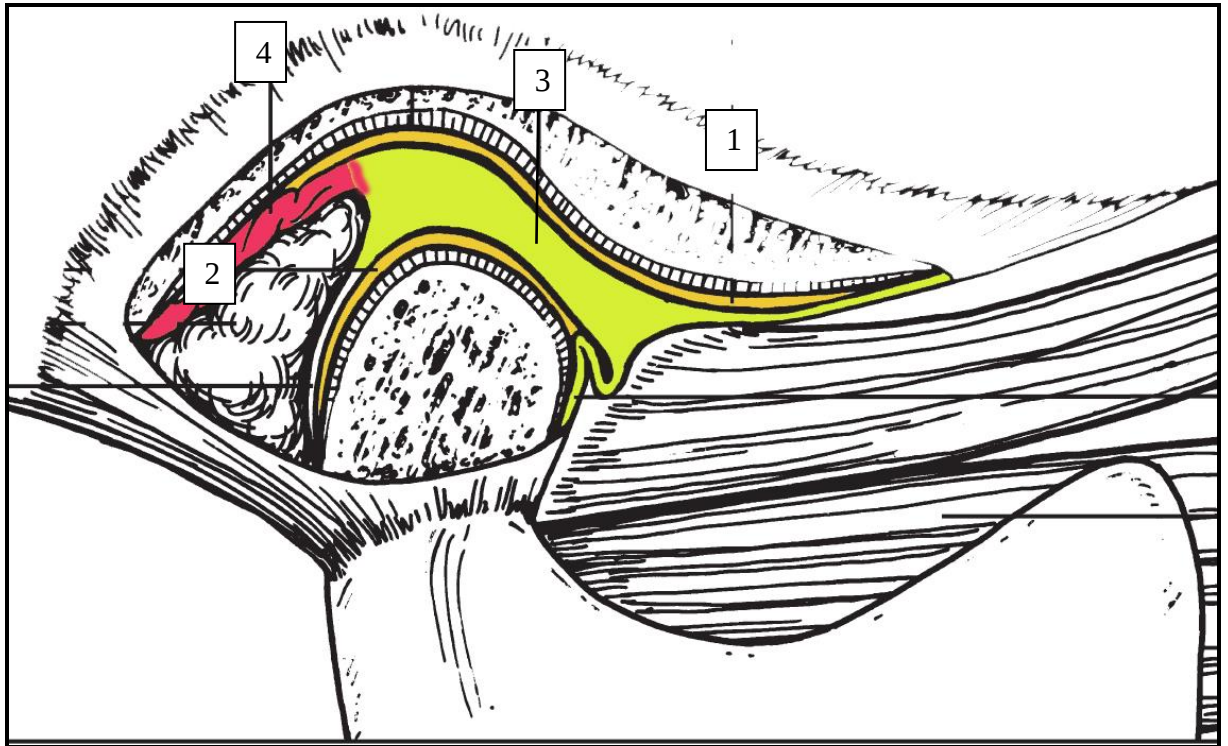


Figura 1. Articulação temporomandibular e suas estruturas adjacentes. 1: Espaço Superior. 2: Espaço Inferior. 3: Disco Articular. 4: Zona Bilaminar

(Color Atlas Of Temporomandibular Joint Surgery - Peter D. Quinn; Editora Mosby,1998)

1.1 Disco Articular

O disco articular é uma estrutura fibrocartilaginosa flexível e bicôncava, que atua como uma zona de separação entre a cabeça da mandíbula e a base craniana (osso temporal), tendo como função reduzir o atrito da articulação, distribuir as cargas, e reduzir a incongruência entre as superfícies ósseas articulares. O disco divide o espaço articular em compartimentos superior e inferior. O espaço de articulação inferior permite a rotação do côndilo na abertura inicial da boca (27-30 milímetros). Acima dessa distância, a abertura bucal é facilitada pelo espaço superior de articulação, que permite a translação ou deslizamento para frente do côndilo sobre a eminência articular. Perda de movimento de translação, devido à patologia que

envolve o espaço articular superior, vai limitar a abertura da boca para menos de 30 milímetros de distância interincisivos. Modificações na posição, forma ou estrutura anatômica do disco articular ocasionarão, em maior ou menor intensidade, alterações na função da ATM.

Em 1954, Rees descreveu a anatomia do disco articular como sendo composto de três zonas, a banda posterior (3 mm de espessura), a zona intermediária (1,5 mm de espessura) e a banda anterior (2 mm de espessura). A posição normal de repouso do disco é dita como o da banda posterior localizada na posição “12 horas” em relação ao côndilo. Em oclusão cêntrica, a pressão da cabeça da mandíbula é exercida através da zona intermediária fina sobre a inclinação posterior da eminência articular.

Histologicamente, o disco articular consiste de colágeno avascular com alguns elementos cartilagosos.

Aproximadamente 70% das células presentes no disco articular da ATM são fibroblastos (ou seja, em forma de fuso) e 30% das células são condrócitos (ou seja, células redondas), com contribuições esparsas de outros tipos de células (Detamore et al., 2006).

Ao contrário de outras cartilagens hialinas (colágeno tipo II), o disco da ATM é quase inteiramente de colágeno tipo I, com mínima presença de colágeno tipo II (Milam et al., 1991).

Fibras de elastina são encontradas em quantidades muito pequenas em relação ao colágeno e tendem a ser mais prevalentes na superfície superior e na periferia do disco da ATM (Keith, 1979).

A distribuição de colágeno dentro de uma matriz de fibrilas de glicosaminoglicanos sulfatados é concebida para resistir à compressão, bem como as forças de tensão (Allen & Athanasiou, 2006).

O disco está firmemente ligado aos pólos medial e lateral do côndilo mandibular, através dos ligamentos discais, e, anteriormente, com a cápsula articular, a qual está inserida superiormente na região anterior da eminência articular (Wilkinson, 1988).

Enquanto estudos anatômicos iniciais (Rees, 1954) relataram uma conexão direta da borda anterior do disco com o feixe superior do músculo pterigoideo lateral, estudos mais recentes relataram que a maioria das fibras do feixe superior do músculo pterigoideo lateral está aderida ao côndilo mandibular, sendo apenas algumas fibras musculares fixadas à parte ântero-medial do disco (Marguelles-Bonnet et al., 1989; Schmolke, 1994). Um estudo relatou que não há fibras do músculo pterigoideo lateral anexadas ao disco, mas sim dentro da cápsula sob o disco (Christo et al., 2005). Apesar disso, constatou-se também que a ativação da cabeça superior do músculo pterigoideo lateral produz tensão para o disco, embora não haja fibras musculares encontradas diretamente ligadas ao próprio disco (Wilkinson & Chan, 1988; Wilkinson, 1988; Christo et al., 2005).

Posteriormente, o disco está aderido às fibras da zona bilaminar, também chamada de tecido retrodiscal ou de fixação posterior. O tecido retrodiscal é vascularizado e com a presença de terminações nervosas, o que explica a sintomatologia dolorosa quando o paciente apresenta deslocamento de disco articular. Scapino (1991) descreveu o tecido retrodiscal como composto de três partes: a lâmina superior, a qual ele se referia como a parte temporal do ligamento, e a lâmina inferior, que ele descreveu como a parte da cabeça da mandíbula do ligamento

posterior. Entre as duas estaria a zona intermediária do tecido retrodiscal. A lâmina superior é ligada à fissura tímpano-escamosa e é formada por um tecido fibroelástico que permite a movimentação do disco quando da abertura da boca e, ao mesmo tempo, contrapõe as forças de contração da cabeça superior do músculo pterigoideo lateral (Wilkinson, 1988).

1.2 Desarranjos Internos da Articulação Temporomandibular

Desarranjo interno (DI) da ATM refere-se a uma falha mecânica localizada dentro da articulação, a qual interfere na sua função.

Mais especificamente, o DI é muitas vezes considerado o resultado do deslocamento de disco, onde existe uma relação anormal posicional entre o disco, a cabeça da mandíbula e a fossa / eminência articular.

Historicamente, Pringle (1918) foi o primeiro a sugerir o deslocamento do disco como a causa da dor e disfunção da ATM.

Em grande parte devido aos diversos trabalhos de Farrar (1971) e Wilkes (1978), deslocamento de disco tornou-se virtualmente sinônimo de DI.

Este conceito deu origem a uma era de prática clínica que promoveu muitos tratamentos cirúrgicos e não cirúrgicos para reposicionamento do disco deslocado, com o intuito de reduzir a dor e disfunção da ATM associada ao DI (McCarty & Farrar, 1979; Dolwick & Sanders, 1985; Dolwick & Nitzan, 1990; Hall & Nickerson, 1994).

1.2.1 Deslocamento Anterior de Disco com Redução

No deslocamento anterior do disco com redução, este está posicionado anterior e, geralmente, medial ao côndilo na posição com a boca fechada. Durante a

abertura da boca, o côndilo se move sobre a banda posterior do disco e finalmente retorna à relação normal côndilo-disco, repousando sobre a zona intermediária fina. É neste momento que, clinicamente, o paciente relata que há um “*click*” (barulho) na articulação. (Okeson, 1996).

Durante o fechamento da boca, o côndilo, então, desliza posteriormente e retorna à posição sob o tecido retrodiscal, e o disco retorna à posição ântero medial (Okeson, 1996).

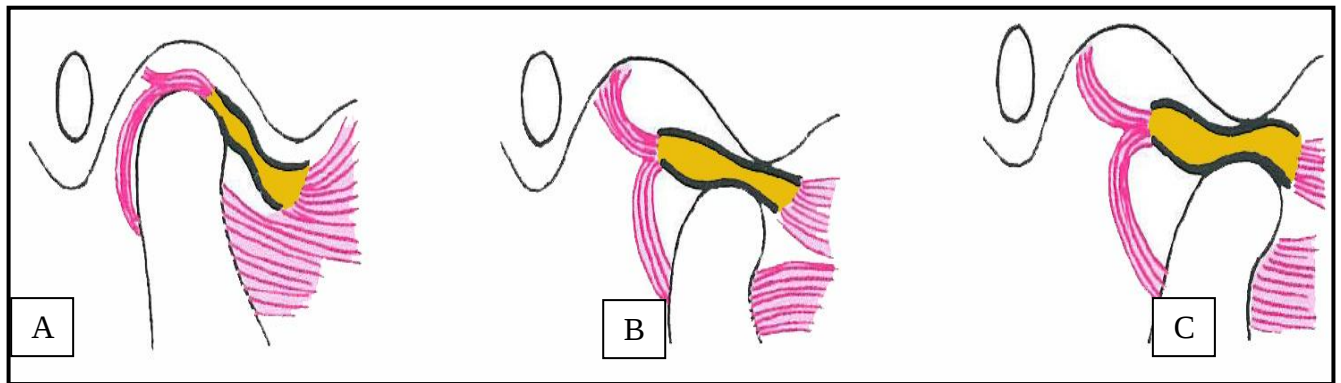


Figura 2. Deslocamento anterior do disco articular com redução. A. boca fechada. B. boca semiaberta. C. boca aberta.

(Color Atlas Of Temporomandibular Joint Surgery - Peter D. Quinn; Editora Mosby, 1998.)

1.2.2 Deslocamento Anterior de Disco sem Redução

Neste tipo de desarranjo interno da articulação temporomandibular, o deslocamento de disco não pode ser reduzido e, assim, o côndilo é incapaz de fazer o movimento de translação em toda a sua extensão.

Estes pacientes não apresentam o “*click*”, pois o côndilo não ultrapassa a região posterior do disco.

Esta falta de translação do côndilo mandibular pode resultar na abertura bucal limitada, desvio para o lado afetado, e diminuição da excursão lateral para o lado contralateral.

Algumas evidências sugerem que a limitação de movimento pode não estar diretamente relacionada com o deslocamento do disco, mas sim com a aderência do disco na fossa articular, causando uma restrição da função de deslizamento da articulação (Okeson, 1996).

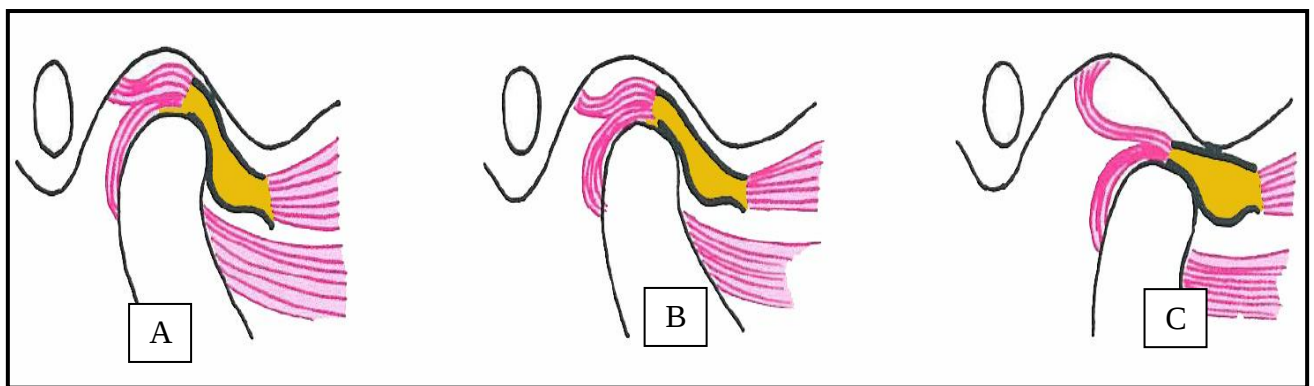


Figura 3. Deslocamento anterior do disco articular sem redução. A. boca fechada. B. boca semiaberta. C. boca aberta.

(Color Atlas Of Temporomandibular Joint Surgery - Peter D. Quinn; Editora Mosby, 1998.)

2. PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação tecidual é uma resposta coordenada que protege e cura o hospedeiro, após uma infecção ou trauma, e envolve várias reações moleculares do hospedeiro.

Crítica para a efetividade dessa resposta é a habilidade do hospedeiro em interromper este processo, assim que o agente causador da inflamação seja

removido, prevenindo a autodestruição tecidual. Esta autorregulação ocorre através de um balanço entre mediadores pró e anti-inflamatórios.

Estudos demonstraram que o processo inflamatório está intimamente ligado ao processo de destruição da ATM (Malemund & Goldberg, 1999). Frequentemente, as primeiras células a responder a um estímulo inflamatório são os mastócitos e macrófagos (Nathan, 2002). Com a estimulação inflamatória, essas células liberam vários fatores pró-inflamatórios, incluindo citocinas, as quais vão desencadear múltiplas cadeias reacionais, podendo resultar em destruição da matriz tecidual por ação das metaloproteases da matriz (MMPs).

3. METALOPROTEASES DA MATRIZ EXTRACELULAR (MMP)

A matriz extracelular compõe diversos tecidos e participa de muitos fenômenos celulares, como diferenciação e crescimento. Esta matriz está constantemente sendo sintetizada e degradada. Membros da família das metaloproteases (MMPs) são os principais reguladores da degradação da matriz extracelular (Birkedal-Hansen, 1993). As MMPs são proteases conhecidas como reguladoras de proteólise da matriz extracelular e classicamente reconhecidas como enzimas de remodelação tecidual no processo fisiológico da reparação e na presença de resposta inflamatória (Vu, 2000). Estas enzimas, apesar de possuírem estruturas e funções em comum, são diferenciadas de acordo com a especificidade de cada uma (geralmente com relação ao substrato). As MMPs estão divididas em três importantes classes: as collagenases intersticiais, as gelatinases e as estromelisinases. Esta classificação baseia-se na especificidade do substrato.

As collagenases intersticiais foram as primeiras a ser descritas, são as mais específicas (Gross & Nagai, 1962) e, durante as últimas décadas, têm sido objeto de diversos estudos que versam sobre sua expressão, distribuição, estrutura química e molecular, em processos normais e patológicos (Birkedal-Hansen, 1993). Estas enzimas são as únicas com capacidade de clivar a tríplice hélice dos colágenos I, II, III em condições fisiológicas, tornando estas moléculas suscetíveis à ação de outras enzimas (Souza et al., 1993).

Existem dois tipos de gelatinases que, apesar das semelhanças estruturais, são codificadas por genes distintos.

A MMP-2 é uma gelatinase que degrada diversos tipos de colágeno. Age também, proteoliticamente, contra o *core* proteico das proteoglicanas e elastina, que são resistentes contra a degradação por outras MMPs. A expressão da MMP-2 e MMP-9 são reguladas primariamente ao nível transcricional, onde o promotor do gene responde a diferentes mediadores inflamatórios, como a interleucina-1, fator de crescimento derivado de plaqueta, fator de necrose tumoral *alpha* e fator de crescimento epidermal. Porém, as células que produzem a MMP-2 são geralmente constitutivas, como os fibrocondrócitos, e as que sintetizam a MMP-9 são células do sistema imuno-inflamatório, como monócitos (Bar-Or et al., 2003).

Os genes que codificam as MMPs respondem a diferentes fatores de crescimento e citocinas inflamatórias. O TGF- β_1 (Fator Transformador do Crescimento- β_1) é aparentemente um dos mais importantes fatores reguladores da síntese de MMPs por fibroblastos (Torre-Amione et al., 1990). Este fator atua como estimulante da atividade reparadora nos tecidos, inibindo a expressão, síntese e liberação de MMPs pelos fibroblastos, além de estimular a produção de TIMPs (inibidor tecidual de metaloproteases), que neutralizam a atividade da enzima na

matriz extracelular. Classicamente o TGF- β_1 é considerado um fator promotor de fibrose. Entretanto, alguns autores classificam o TGF- β_1 como um fator pró-inflamatório, uma vez que ele atua como agente quimiotático para neutrófilos, monócitos e linfócitos do sangue (Torre-Amione et al., 1990).

A regulação da atividade proteolítica das metaloproteases ocorre em nível extracelular, através de proteínas inibidoras específicas de tecido, os TIMPs. Alterações nos níveis de síntese de TIMPs e MMPs podem levar a um desequilíbrio na taxa de degradação da matriz extracelular, podendo resultar em destruição anormal da matriz (Macnaul et al., 1990). MMPs e seus inibidores (TIMPs) participam da remodelação tecidual fisiológica, mas em condições inflamatórias a sobre-expressão e superatividade das MMPs resultam em destruição tecidual (Broussard Jr, 2005).

3.1 Metaloproteases da Matriz em Doenças e Processos Degenerativos

As metaloproteases da matriz desempenham papel importante em vários processos fisiológicos e patológicos, como na involução pós-parto (Weeks et al., 1976), na reabsorção óssea (Okada et al., 1995), na inflamação (Knauper et al., 1993), na tuberculose (Ninomiya et al., 2004), no infarto agudo do miocárdio (Kai et al., 1998), no aneurisma aórtico abdominal (McMillan & Pearce, 1999), no crescimento e expansão de tumores benignos (Autio-Harminen et al., 1993), na invasão e metástase de tumores malignos (Declerck et al, 1992, TORII et al., 1997; Lein et al., 2000), na osteoartrite (Woessner, 1991; Naito et al., 1999), na artrite reumatóide (Lindy et al., 1997; Pap et al., 2000; Kaneko et al., 2001; Liu et al., 2005), na artrite reumatóide juvenil (Gattorno et al, 2002), na doença periodontal (Souza et

al., 2003) e na disfunção da articulação temporomandibular (Yoshida et al., 1999; Gepstein, 2003; Xu et al., 2003).

As MMPs são vistas como as maiores responsáveis pela destruição tecidual em doenças articulares degenerativas, com diferenças nas expressões de MMPs em articulações saudáveis e doentes (Woessner Jr & Gunja-Smith, 1991).

3.2 Metaloproteases da Matriz e Desordens da ATM

Um estudo *in vitro* de Muroi et al. (2007), utilizando células de três discos de pacientes com disfunção temporomandibular demonstrou que, uma força mecânica excessiva, compressiva e intermitente, como no caso de um paciente que apresenta bruxismo, aumenta a expressão de MMP-2 e outros fatores inflamatórios, como ADAMTS-4, -5, e IL-8, o que, segundo os autores, são causas potenciais de inflamação e podem promover o processo de osteoartrite na ATM.

Utilizando o líquido sinovial de 44 pacientes que apresentavam alteração em posicionamento de disco articular da ATM, foi observada uma sobre-expressão das MMPs-2, 8 e 9 nestes pacientes. Porém, este estudo não comparou os resultados com um grupo controle (Srinivas et al., 2001). Marchetti et al. mostraram, em 1999, em um estudo com discos articulares de 11 pacientes que apresentavam desordem temporomandibular e 1 disco controle, maior presença de MMP-2 nos discos que apresentavam alterações. Relataram também que no grupo teste, a predominância de MMP-2 era nos discos que apresentavam maiores alterações em estrutura anatômica, ou seja, quanto maior a degeneração da estrutura articular, maior a expressão da MMP-2. Avaliando o líquido sinovial de 10 pacientes apresentando desordens temporomandibulares e 5 pacientes do grupo controle assintomáticos, observou-se claramente a sobre-expressão de MMP-2 e MMP-9 no grupo com desordem de ATM (Kubota et al., 1998).

Em estudo *in vitro* de Akamine, 2012, foi demonstrada uma expressão maior da MMP-3 (uma estromelisina) em tecido sinovial humano submetido à compressão excessiva. Este estudo utilizou células sinoviais de articulação do joelho humano, e não células da articulação temporomandibular, pois, segundo o autor, não havia células suficientes para o desenvolvimento da pesquisa em questão. Sendo assim,

os resultados foram extrapolados para a articulação temporomandibular, mas com a ressalva que não há certeza que a ATM responde de forma similar ao joelho. Outra pesquisa realizada sobre a MMP-3 com líquido sinovial de articulação temporomandibular, relatou uma sobre-expressão de MMP-3 no material estudado (Zardenetta et al., 1998). É importante ressaltar que não houve comparação com um grupo controle (grupo sem desordem temporomandibular). Tal resultado foi corroborado por Ishimaru (2000), o qual encontrou elevada concentração de MMP-3 em líquido sinovial em pacientes portadores de desordens temporomandibulares. A presença de MMP-3 em disco articular da ATM de pacientes com desordens internas foi demonstrada por Yoshida e colaboradores, em 1999, onde foram estudados 26 discos (16 pacientes com desordem de ATM e 10 controle - cadáveres). Yoshida relata que seus achados sugerem que a MMP-3 estaria em regiões de reparação e remodelação do disco, ou seja, que a metaloprotease em questão atua tanto no processo fisiológico quanto no processo patológico. Porém, esta pesquisa foi realizada em cadáveres, o que pode não replicar as condições fisiológicas e patológicas em humanos.

Discos de articulações temporomandibulares de ratos foram utilizadas por Puzaz et al. (2001) para a avaliação e comprovação da presença de MMP-9 na ATM. Leonardi et al. (2008) estudou 12 discos articulares humanos, sendo 10 discos de pacientes que apresentavam disfunção temporomandibular e 2 discos de cadáveres, e foi observada a sobre-expressão de MMP-13 (colagenase 3) nos discos com disfunção da articulação.

Proposição

Uma vez que a MMP-2 e MMP-9 estão diretamente envolvidas com a degradação da matriz extracelular do disco da articulação temporomandibular (ATM), o objetivo do presente trabalho foi investigar a associação da expressão da MMP-2 e MMP-9 com a disfunção ATM, por meio de análise imuno-histoquímica do disco articular.

Artigo

Immunohistochemical expression of matrix metalloprotease-2 and 9 in the disc of patients with temporomandibular joint dysfunction.

ABSTRACT

Matrix metalloproteases (MMPs) are proteases known as remodeling tissue enzyme in the functional remodeling process as in the presence of immune-inflammatory diseases. MMPs are partly responsible for tissue destruction in degenerative joint diseases, with different expression among the MMPs, in healthy and ill joints. Metalloprotease-2 (MMP-2) and metalloprotease-9 (MMP-9) are gelatinase capable of degrading several types of the extracellular matrix collagen. The hypothesis is that in temporomandibular joint (TMJ) dysfunction, MMP-2 and MMP-9 expression levels might be elevated. Therefore, the aim of this study was to investigate the association of MMP-2 and MMP-9 expression with temporomandibular joint dysfunction, using immunohistochemical approach on the joint disc.

A total of 45 samples of human disc joint was collected, being 36 test group (patients with anterior disc displacement with reduction (n=29) and without reduction (n=7); and 9 control group. The immunostaining of area of TMJ discs were statistically compared between the groups ($p<0.05$). There was a statistically difference observed in the area of immunostaining of MMP-2 between control group and group of displacement disc with reduction (ADDwR) ($p=0.048$) and between the groups with disc displacement with and without reduction (ADDwoR) ($p=0.029$), being the expression significantly elevated in the group ADDwoR.

In conclusion, no statistically significant difference was found between the variables area of MMP-9 expression in the disc with and without disc displacement of

patients, by means of immunohistochemical analysis. However, there was an elevation on MMP-2 expression in the disc of patients with displacement and without reduction (more severe alteration).

INTRODUCTION

Temporomandibular joint (TMJ) is a bilateral joint capable of adaptation and remodeling according to the functional demands. The fibrous-cartilaginous disc in TMJ is composed of regularly arranged collagen fibers and fibroblast-like cells; it plays an important role on distributing the pressure loads of articular surfaces of the condyle and glenoid fossa during joint movements (Beek et al., 2001). When the disc is overloaded exceeding its remodeling capability, it may suffer structural changes, such as fragmentation of compact collagen fibers and alteration of synovial cells (which covers the disc, being responsible for its lubrication) leading to TMJ disorders (Marchetti et al., 1999). Indeed, the pathogenesis of TMJ dysfunction is multifactorial, but the early establishment of the major contributing factor is crucial to a better treatment outcome. Among several TMJ dysfunctions that may lead to disc degeneration, anterior disc displacement with (ADDwR) and without reduction (ADDwoR) are frequent findings in TMJ patients (Westesson et al., 1985) and often precede osseous remodeling, disc perforation and osteoarthritic changes (Wilkes, 1978).

Inflammatory process is a coordinated response against trauma and infection. However, when the trigger inflammatory agent is not removed, this physiologic response may lead to pathological conditions. Among the enzymes involved in tissue physiological and inflammatory environments, there are the matrix metalloproteinases (MMPs), a family of 20 proteolytic enzymes that can degrade all types of collagen, proteoglycans and other components of extracellular matrix (Makowski & Ramsby, 2003). Their activity is essential for remodeling and adaptation of cartilage and other tissues (Vu et al., 2000). The tissue inhibitors of the metalloproteinases (TIMPs) work in balance with the MMPs during physiological

alterations (Brew et al., 2000), but in inflammatory conditions the over activity and overexpression of MMPs result in tissue destruction. The MMPs are divided into the following subgroups: collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13) that degrade fibrillar collagen types I, II and III; stromelysins (MMP-3, MMP-11) that degrade proteoglycans and nonhelical regions of collagens, and gelatinases (MMP-2, MMP-9) which degrade specifically collagen types I, IV, V and XI (Kozaci et al., 1997).

MMP-2 and MMP-9 are produced mostly by inflammatory cells and their expression is regulated at transcriptional levels by inflammatory mediators, such as interleukine-1 (Nagase & Woessner, 1999). They are synthesized as latent proenzymes, being cleaved to active form outside the cells. MMP-2 and MMP-9 are found increased in serum and synovial fluids of arthritic patients, being considered markers of the disease, and associated with cartilage degradation in animal experiment (Makowski & Ramsby, 2007). MMP-2 was found in early-stage osteoarthritis patients, while MMP-9 was highly expressed in patients with anterior disc displacement without reduction and advanced osteoarthritis (Yoshida et al., 2006), however the sample was collected from synovial fluid, lacking the knowledge of the discs degradation stages during that period. To a better understanding of the progression stage of the disease, it is important a detailed clinical evaluation and knowledge of the TMJ degenerating mechanisms (Tanaka et al., 2000).

Although the involvement of some MMPs in TMJ dysfunction is known, little is reported over which MMP enzymes are implicated with the TMJ disc disarrangements and the elucidation of this relationship might contribute to a better diagnosis and treatment of TMJ patients. Most studies have been carried out in synovial fluid (Mizui, Ishimaru et al. 2001), in animal models (Mizui, Ishimaru et al. 2001; Puzas, Landeau et al. 2001) or in cadavers (Leonardi, Almeida et al. 2011),

however, MMP-2 and MMP-9 expression has not been studied in degenerated discs of human TMJ. Therefore, the aim of this study is to investigate the association of MMP-2 and MMP-9 expression in discs of patients with temporomandibular joint dysfunction, using immunohistochemical approach on the joint disc.

MATERIALS AND METHODS

Sample Selection

The sample was composed of 45 disc specimens (Table 1) from 33 patients, both sexes, mean age 32.36 (17-57), being 36 TMJ displaced disc specimens collected from patients treated between 2002 and 2009 at the Evangelic University Hospital of Curitiba, Brazil. Nine virtually unaffected human TMJ discs were studied along with the pathological material. All subjects signed a written informed consent before tissue collection. The study was approved by the Ethical Committee on Research at Pontifical Catholic University of Paraná, Brazil, according to Resolution 196/96 of the National Health Council and approved under registration number 104.

Subjects completed personal medical history questionnaires and, within a protocol approved by an Institutional Review Board, signed a consent form after being advised of the nature of the study. All patients were asked to complete a pain questionnaire, and a clinical examination was performed by an experienced operating oral and maxillofacial surgeon. The clinical examination consisted of palpation of the TMJ region, the occurrence of painful opening/closing mouth, and crepitation. The patients were considered to be affected and treated surgically when presenting painful clinical signs of disc displacement after unsuccessful non-surgical treatment for at least 6 months. Patients presenting pain related to muscular spasm were not included in this research. Regarding complementary exams, all patients had a panorex. These patients were from the Brazilian public health system; therefore, a few of them had financial conditions to afford other exams such as computerized tomography (CT) scan or a TMJ magnetic resonance imaging.

Accordingly, the diagnoses were primarily clinical. Subjects were included in clinical categories, according to the presence or absence of disc displacement:

- 1) *Test group* was composed of 36 samples, all patients diagnosed with one of the two TMJ dysfunctions: i) *Disc displacement with reduction* (ADDwR, n=29); ii) *Disc displacement without reduction* (ADDwoR, n=07), being considered the more severe condition;
- 2) *Control group* (n=9), composed of patients with no signs or symptoms of TMJ dysfunction, such as pain, mouth opening limitation. Out of the control patients, 4 individuals presented condyle fracture (CFx), confirmed by radiographs and CT scan, which needed to be operated for the fracture reduction and four subjects displayed active condyle hyperplasia (CH).

Thus, a wedge of the posterior region of the disc of all subjects was removed to physiologically adapt the disc on the condyle head.

MMP-2 and MMP-9 Immunohistochemical Analysis

The TMJ disc sections were deparaffinized with xylol (2 x 10 min) and rehydrated with absolute ethylic alcohol (3 x 1 min) and 80% ethylic alcohol (1 x 1 min).

Endogenous peroxidase activity was quenched by treatment with H₂O₂ (5% in methanol) for 10 min. Target Retrieval Solution™ (Dako, DK-2600 Glostrup, Denmark) was used prior to slide staining for heat-inducing epitope retrieval (for formalin-fixed, paraffin-embedded material), according to the manufacturer's instructions.

The sections were incubated with monoclonal MMP-2 and MMP-9 antibody (Novocastra, New Castle, UK), diluted 1:50 in phosphate buffered saline (PBS), 0.1% bovine serum albumin (BSA). This monoclonal antibody immunostains only the cellular fraction of MMP-2 and MMP-9.

For negative controls, the primary antibody was not added. PBS was used instead. The secondary antibody, Advance™ (Dako, DK-2600 Glostrup, Denmark) was applied for 30 min, according to the manufacturer.

The immunoreactions were visualized by incubating the sections using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) chromogen (OriGene, Rockville, MD), 1 drop in 1mL distilled water. The sections were lightly counterstained with Harris haematoxylin for 5 min and finally mounted. Immunostaining was considered to be specific to MMP-2 and MMP-9 because immunoreactivity was not observed in the negative controls.

The positive areas were marked using the color morphometry method, which consisted of an analysis of the anti-MMP-2 and MMP-9 reaction area with the TMJ disc tissue. For this purpose, images of consecutive fields were captured by the 40x objective lens coupled to the BX50 Olympus microscope with the Sony camera, Model DXC-107A, and image analysis was performed with specific software called Image Pro Plus software (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA). This software allows an observer to select and paint the positive areas to obtain an image model and make the mask for the staining other slides. This procedure was performed by a single observer with a blind study. Moreover, it automatically calculates the area of the positive reaction. The data was entered into a spread sheet and Microsoft Excel (Redmond, WA) was used to obtain the statistical analysis. The variable area was measured in square micrometers (μm^2) and was obtained with the mean of all positive areas.

Statistical Analysis

SPSS version 14.0 (SPSS Institute, Inc., Chicago, IL, USA) was used for statistical analyses. To analyze the area and density, the average of the results from

all available samples of each patient was considered. Descriptive statistical values are presented as mean and standard deviation, median, minimum and maximum. Comparisons among the three groups were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) and LSD (least significant difference) for multiple comparisons. To achieve the symmetric condition, data was previously submitted to a logarithmic transformation. $p < 0.05$ indicated statistical significance.

RESULTS

MMP-2 expression analysis

A significant difference was found between the groups with and without TMJ dysfunction ($p=0.030$) in terms of MMP-2 area of expression (Table 2). There was an increased MMP-2 immunostaining in the group ADDwR in comparison with the control group ($p=0.048$). Also, it was observed an augmented level of expression in the group ADDwoR when compared with the group ADDwR ($p=0.029$) (Table 2).

MMP-9 expression analysis

Comparing control with affected groups (with or without reduction), no statistically difference was found for MMP-9 area of immunostaining ($p=0.476$).

DISCUSSION

The articular disc of human TMJ is susceptible to adaptive and remodeling actions when submitted to loading. When the loading pressure exceeds, inflammatory process initiates and might entails degradation and sometimes replacement of natural matrix by abnormal tissue (Buckwalker & Mankin, 1998). The

upregulation of some of MMPs has been observed in pathological conditions in TMJ synovial fluid, resulting in tissue destruction and have been considered the main enzymes involved in matrix turnover (Kubota et al, 1997; Kubota et al., 1998; Ishimaru et al., 2000; Leonardi et al., 2008). MMP gene polymorphisms have been associated with temporomandibular joint degeneration (Planello, Campos et al. 2011), while MMP-9 gene promoter polymorphisms were associated with degenerative diseases such as arthritis and atherosclerosis (Ye et al., 1995; Barlas et al., 2009).

MMP-2 and -9 expressions are regulated by several growth factors such as platelet derived growth factor, tumor necrosis factor α , interleukine-1, among others. The latent presence of MMP-2 has been identified in healthy joints, being produced by fibroblasts, while MMP-9 is produced in large quantities by inflammatory cells, especially in patients with osteoarthritis (Yoshida, Takatsuka et al. 2006). Both MMP-2 and MMP-9 are considered to play multiple roles in TMJ pathogenesis, since MMP-2 activates MMP-13 and an increased expression of MMP-2, concomitant with MMP-9, was observed in pathologic conditions (Clegg & Carter, 1999; Marchetti et al., 1999). Nevertheless, the studies over these two enzymes are either in animal model, cadavers or synovial fluid of human pathologic TMJ. To our knowledge, this is the first study to investigate the presence of MMP-2 and MMP-9 in human temporomandibular discs.

Our results showed statistically significant differences between CG and ADDwR and between DDwoR and ADDwR. It is noteworthy the expression of MMP-2 was also clearly increased in the group with disc displacement without reduction when compared to the group of disc displacement with reduction and with controls. No difference was observed between the control group and ADDwR. Although the

absence of difference might be due to the small sample size and the great variability in the expression of MMP-2 in these groups, it may indicate the association of the increased expression of MMP-2 with a more severe TMJ disorder. The MMP-9 analysis showed no statistically significant difference between the groups in relation to area expression. In this study, the findings are different to what was found by Yoshida et al. (2006) in synovial fluid, who found higher levels of MMP-9 in advanced TMJ disease. Those results may be due to the fact that our patients were not diagnosed with osteoarthritis, or there may be a difference between MMP-2 and -9 expression in synovial fluid and disc during TMJ dysfunction. Moreover, the absence of MMP-9 expression difference between the groups might be due to the small sample size or to the fact that the control group was composed by discs of patients with condyle fracture.

Even though the sample size seems to be small, to the authors' knowledge, this is the study with the largest sample with human beings alive, instead of human discs from cadavers or from animals. Moreover, in the cases of human cadavers, no previous clinical records were available, which made it impossible to evaluate if the subjects presented any inflammatory-degenerative alterations.

With the increasing number of patients presenting TMJ dysfunction, the identification of the disease stage is a priority, to target a proper treatment. In this study, an elevation in the expression of MMP-2 was observed in patients with disc displacement without reduction by immunohistochemistry analysis. No statistically significant difference was found in area expression of MMP-9, maybe because of high interindividual variation in its expression, needing a higher number of individuals to clarify whether or not this protease level is increased in individuals with TMJ dysfunction.

Future analysis of other MMPs, along with the results of this study, might contribute to a better understanding of their role on tissue remodeling and destruction, contributing to an improvement of the understanding of TMJ dysfunction and consequently a better patient handling.

Table 1. Baseline clinical characteristics of the study group with and without TMJ dysfunction.

Patient (n=33)	Race	Sex	Age (years)	Diagnoses	Affected Side (Right)	Affected Side (Left)
1.						
	Caucasian	Female	35	DDwoR	X	X
2.	Caucasian	Female	24	DDwoR		X
3.	Caucasian	Female	23	DDwoR	X	X
4.	Caucasian	Female	45	DDwoR	X	
5.	Caucasian	Female	32	DDwoR	X	
6.	Caucasian	Female	30	ADDwR		X
7.	Afro-American	Female	20	ADDwR		X
8.	Afro-American	Female	57	ADDwR		X
9.	Caucasian	Female	33	ADDwR	X	
10.	Caucasian	Female	25	ADDwR	X	X
11.	Caucasian	Female	22	ADDwR	X	X
12.	Caucasian	Female	42	ADDwR	X	
13.	Caucasian	Female	56	ADDwR	X	
14.	Caucasian	Female	26	ADDwR	X	X
15.	Caucasian	Female	38	ADDwR	X	X
16.	Caucasian	Female	37	ADDwR	X	X
17.	Caucasian	Female	36	ADDwR	X	X
18.	Caucasian	Female	34	ADDwR		X
19.	Caucasian	Female	46	ADDwR	X	X
20.	Caucasian	Female	26	ADDwR	X	X
21.	Caucasian	Female	30	ADDwR	X	X
22.	Caucasian	Female	36	ADDwR	X	
23.	Caucasian	Female	44	ADDwR	X	
24.	Caucasian	Female	26	ADDwR	X	X
25.	Caucasian	Female	17	CH		X
26.	Caucasian	Female	43	C FX		X
27.	Caucasian	Female	40	CH		X
28.	Caucasian	Female	18	CH		X
29.	Caucasian	Male	26	C FX	X	
30.	Caucasian	Female	30	CH		X
31.	Afro American	Male	26	CH	X	
32.	Caucasian	Male	27	C FX	X	
33.	Caucasian	Male	18	C FX		X

DDwoR = Anterior disc displacement without reduction

ADDwR = Anterior disc displacement with reduction

C FX = Condylar fracture

CH = Condylar hyperplasia

Figure 1. Microphotographs showing the negative control (A) and positive immunohistochemical reaction for MMP-2 in brown, used as the mask. (B)

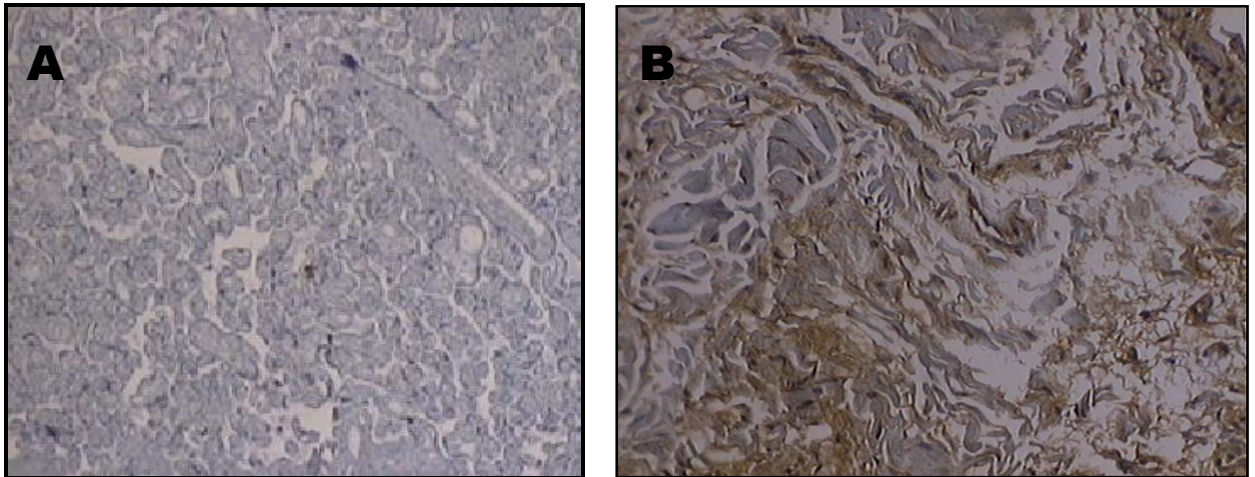


Table 2. Analysis of MMP-2 expression area between the groups.

Variable	Group*	n	Media	Median	Minimum	Maximum	Standard Deviation	<i>p</i> -value†
Area (μm^2)	CG	9	23.11	16.61	14.15	39.14	9.55	0.030
	ADDwR	29	16.16	15.18	7.90	31.28	5.77	
	DDwoR	7	28.98	26.15	6.68	58.05	19.09	

*

Groups: CG – control group, DDwoR – disc displacement without reduction, ADDwR – disc displacement with reduction

† One-way ANOVA, $p < 0.05$

Area: CG x DDwR: $p = 0.048$; CG x DDwoR: $p = 0.725$; ADDwR x DDwoR: $p = 0.029$

Table 3. Analysis of MMP-9 expression area between the groups.

Variable	Group*	n	Media	Median	Minimum	Maximum	Standard Deviation	<i>p</i> -value**
Area (μm^2)	CG	9	21.2	15.8	6.8	53.9	15.7	0.476
	ADDwR	31	18.1	16.1	2.1	102.6	17.6	
	DDwoR	7	29.5	21.8	6.8	101.3	32.8	

* Groups: CG – control group, DDwoR – disc displacement without reduction, ADDwR – disc displacement with reduction

** One-way ANOVA, $p < 0.05$

REFERENCES

Beek M, Aarnts MP, Koolstra JH, Feilzer AJ, van Eijden TM. Dynamic properties of the human temporomandibular joint disc. *J Dent Res* 2001;80:876–880.

Tanaka A, Kumagai S, Kawashiri S, Takatsuka S, Nakagawa K, Yamamoto E, Matsumoto N. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in synovial fluid of the temporomandibular joint accompanied by anterior disc displacement. *J Oral Pathol Med* 2001; 30: 59-64.

Westesson P-L, Bronstein SL, Liedberg J. Internal derangement of poromandibular joint: morphologic description with correlation to function. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985; 59: 323–31.

Marchetti C, Cornaglia I, Casasco A, Bernasconi G, Baciliero U, Stetler-Stevenson WG. Immunolocalization of gelatinase-A(matrix metalloproteinase-2) in damaged human temporomandibular joint discs. *Archives of Oral Biology* 44 (1999) 297-304.

Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000;14:2123–33.

Kozaci LD, Buttle DJ, Hollander AP. Degradation of type II collagen, but not proteoglycan, correlates with matrix metalloproteinase activity in cartilage explant cultures. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 164-74.

Makowski GS, Ramsby ML. Zymographic analysis of latent and activated forms of matrix metalloproteinase-2 and -9 in synovial fluid: correlation to polymorphonuclear leukocyte infiltration and in response to infection. *Clin Chim Acta* 2003; 329: 77-81.

Makowski GS, Ramsby ML. Autoactivation profiles of calcium-dependent matrix metalloproteinase-2 and -9 in inflammatory synovial fluid: effect of pyrophosphate and bisphosphonates. *Clin Chim Acta* 2005; 358(1-2): 182-91.

Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477: 267-83.

Wilkes C. Arthrography of the temporomandibular joint in patients with the TMJ pain-dysfunction syndrome. *Minutesn Med* 1978;61:645-52.

Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-4.

Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* 1998;47:477–86.

Leonardi R, Loreto C, Barbato E, Caltabiano R, Lombardo C, Musumeci G, Lo Muzio L. MMP-13 (collagenase 3) localization in human temporomandibular joint discs with internal derangement. *Acta Histochem.* 2008;110(4):314-8.

Kubota E, Kubota T, Matsumoto J, Shibata T, Murakami KI. Synovial fluid cytokines and proteinases as markers of temporomandibular joint disease. *J Oral Maxillofac Surg* 1998;56:192-8.

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

Ishimaru JI, Oguma Y, Goss AN. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in serum and lavage fluid of patients with temporomandibular joint disorders. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2000;38:354-9.

Clegg PD, Carter SD. Matrix metalloproteinase-2 and -9 are activated in joint diseases. *Equine Vet J* 1999;31:324-30.

Leonardi, R., L. E. Almeida, et al. (2011). "Lubricin immunohistochemical expression in human temporomandibular joint disc with internal derangement." *J Oral Pathol Med* **40**(7): 587-92.

Mizui, T., J. Ishimaru, et al. (2001). "Matrix metalloproteinase-2 in synovial lavage fluid of patients with disorders of the temporomandibular joint." *Br J Oral Maxillofac Surg* **39**(4): 310-4.

Planello, A. C., M. I. Campos, et al. (2011). "Association of matrix metalloproteinase gene polymorphism with temporomandibular joint degeneration." *Eur J Oral Sci* **119**(1): 1-6.

Puzas, J. E., J. M. Landeau, et al. (2001). "Degradative pathways in tissues of the temporomandibular joint. Use of in vitro and in vivo models to characterize matrix metalloproteinase and cytokine activity." *Cells Tissues Organs* **169**(3): 248-56.

Yoshida, K., S. Takatsuka, et al. (2006). "Expression of matrix metalloproteinases and aggrecanase in the synovial fluids of patients with symptomatic temporomandibular disorders." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **102**(1): 22-7.

Conclusão

Foi observado um aumento de expressão da MMP-2 no disco de pacientes com deslocamento de disco sem redução (alteração mais severa).

Não foi observada diferença significativa na variável área em expressão de MMP-9 no disco de pacientes com e sem deslocamento de disco (com ou sem redução), por meio de análise imuno-histoquímica.

Análises em outras MMPs futuramente podem contribuir para o melhor entendimento da associação da remodelação tecidual na disfunção temporomandibular com a expressão das MMPs.

Referências

1. ALLEN KD, ATHANASIOU KA. Tissue engineering of the TMJ disc: a review. **TISSUE ENG** 2006;12:1183-96.
2. AKAMINE Y, KAKUDO K, KONDO M, OTA K, MUROI Y, YOSHIKAWA H, NAKATA K. Prolonged matrix metalloproteinase-3 high expression after cyclic compressive load on human synovial cells in three-dimensional cultured tissue. **INT J ORAL MAXILLOFAC SURG**. 2012 Jul;41(7):874-81. doi: 10.1016/j.ijom. 2011.10.027. Epub 2012 Jan 20.
3. BAR-OR A, NUTTALL RK, DUDDY M, ALTER A, KIM HJ, IFERGAN I, PENNINGTON CJ, BOURGOIN P, EDWARDS DR, YONG VW. 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. Epub 2003 Sep 23.
4. BIRKEDAL-HANSEN H. et al. Matrix metalloproteinases: a review. **CRIT REV ORAL BIOL MED** 1993; 4:197-250.
5. BROUSSARD JS JR. Derangement, osteoarthritis, and rheumatoid arthritis of the temporomandibular joint: implications, diagnosis, and management. **DENT CLIN NORTH AM**. 2005 Apr;49(2):327-42.
6. CHRISTO JE, BENNETT S, WILKINSON TM, TOWNSEND GC. Discal attachments of the human temporomandibular joint. **AUST DENT J**. 2005; 50:152-60.
7. DECLERCK YA, PEREZ N, SHIMADA H, BOONE TC, LANGLEY KE, TAYLOR SM. Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. **CANCER RES**. 1992 Feb 1;52(3):701-8.
8. DETAMORE MS, HEGDE JN, WAGLE RR, ALMARZA AJ, et al. Cell type and distribution in the porcine temporomandibular joint disc. **J ORAL MAXILLOFAC SURG** 2006; 64: 243-8.
9. DIMITROULIS G. Condylar injuries in growing patients. **AUST DENT J** 1997; 42: 367-71.
10. DOLWICK MF, NITZAN DW. The role of disc repositioning surgery for internal derangements of the temporomandibular joint. **ORAL MAXILLOFAC SURG CLIN NORTH AM** 1994; 6:271.

- 11.DOLWICK MF, SANDERS B. **TMJ INTERNAL DERANGEMENT AND ARTHROSIS - SURGICAL ATLAS**. St. Louis. CV Mosby Co 1985.
- 12.FARRAR WB. Diagnosis and treatment of anterior dislocation of articular disc. **NEW YORK J DENT**. 1971; 41: 348-5.
- 13.GATTORNO M, GERLONI V, MORANDO A, COMANDUCCI F,BUONCOMPAGNI A, PICCO P, FANTINI F, PISTOIA V, GAMBINI C. Synovialmembrane expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor 1 injuvenile idiopathic arthritides.**J RHEUMATOL**. 2002 Aug;29(8):1774-9.
- 14.GEPSTEIN A. et al. Association of metalloproteinase, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, and proteoglycans with development, aging, and osteoarthritis processes in mouse temporomandibular joint. **HISTOCHEM CELL BIOL** 2003; 120-23-32.
- 15.GROSS J., NAGAY Y. Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme. **PROC. NATL. ACAD. SCI**. 1962; 1197-1203.
- 16.HALL HD, NICKERSON JW. Is it time to pay more attention to disc position ? **J OROFACIAL PAIN**. 1994; 8: 90-5.
- 17.ISHIMARU JI, OGUMA Y, GOSS AN. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in serum and lavage synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders. **BR J ORAL MAXILLOFAC SURG**. 2000 Aug;38(4):354-9.
- 18.KAI H. et al. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and 9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. **J. AM. COLL. CARDIOL**. 1998;32, 368-372.
- 19.KANEKO M, TOMITA T, NAKASE T, OHSAWA Y, SEKI H, TAKEUCHI E, TAKANO H, SHI K, TAKAHI K, KOMINAMI E, UCHIYAMA Y, YOSHIKAWA H, OCHI T. Expression of proteinases and inflammatory cytokines in subchondral bone regions in the destructive joint of rheumatoid arthritis. **RHEUMATOLOGY**(Oxford). 2001 Mar;40(3):247-55.
- 20.KEITH DA. Elastin in the bovine mandibular joint. **ARCH ORAL BIOL**. 1979; 24:211-4.
- 21.KNAUPER V. et al. Fragmentation of human polymorphonuclear-leucocyte collagenase. **BIOCHEM J** 1993; 847-854.
- 22.KUBOTA T, KUBOTA E, MATSUMOTO A, KAWAI Y, SAITO H, MIKUNI-TAKAGAKI Y, SATO S. Identification of matrix metalloproteinases (MMPs) in synovial fluid from patients with temporomandibular disorder. **EUR J ORAL SCI**. 1998 Dec;106(6):992-8.

23. LEIN M, JUNG K, LAUBE C, HÜBNER T, WINKELMANN B, STEPHAN C, HAUPTMANN S, RUDOLPH B, SCHNORR D, LOENING SA. Matrix-metalloproteinases and their inhibitors in plasma and tumor tissue of patients with renal cell carcinoma. **INT J CANCER**. 2000 Mar 15;85(6):801-4.
24. LEONARDI R, LORETO C, BARBATO E, CALTABIANO R, LOMBARDO C, MUSUMECI G, LO MUZIO L. MMP-13 (collagenase 3) localization in human temporomandibular joint discs with internal derangement. **ACTA HISTOCHEM**. 2008;110(4):314-8. doi: 10.1016/j.acthis.2007.11.010. Epub 2008 Feb 8.
25. LINDY O, KONTTINEN YT, SORSA T, DING Y, SANTAVIRTA S, CEPONIS A, LÓPEZ-OTÍN C. Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) in human rheumatoid synovium. **ARTHRITIS RHEUM**. 1997 Aug;40 (8): 1391-9.
26. MACNAUL K.L. et al. Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid synovial fibroblasts. **J BIOL CHEM** 1990; 17238-17245.
27. MALEMUND C.J., GOLDBERG V.M. Future directions for research and treatment of the osteoarthritis. **FRONT BIOSCI** 1999; 15: D762-71.
28. MARGUELLES-BONNET R, YUNG JP, CARPENTIER P, MEUNISSIER M. Temporomandibular joint serial sections made with mandible in intercuspal position. **CRANIO** 1989; 7: 97-106.
29. MARCHETTI C, CORNAGLIA I, CASASCO A, BERNASCONI G, BACILIERO U, STETLER-STEVENSON WG. Immunolocalization of gelatinase-A (matrix metalloproteinase-2) in damaged human temporomandibular joint discs. **ARCH ORAL BIOL**. 1999 Apr;44(4):297-304.
30. McCARTY WL, FARRAR WB. Surgery for internal derangement of the temporomandibular joint. **J PROSTHET DENT** 1979; 42: 191-6.
31. McMILLAN, W.D., PEARCE, W.H. Increased plasma levels of metalloproteinase-9 are associated with abdominal aortic aneurysms. **J VASC SURG** 1999; 29, 122-127.
32. MILAM SB, KLEBE RJ, TRIPLETT RG, HERBERT D. Characterization of the extracellular matrix of the primate temporomandibular joint. **J ORAL MAXILLOFAC SURG** 1991; 49:381-6.
33. NAITO K, TAKAHASHI M, KUSHIDA K, SUZUKI M, OHISHI T, MIURA M, INOUE T, NAGANO A. Measurement of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in patients with knee osteoarthritis: comparison with generalized osteoarthritis. **RHEUMATOLOGY** (Oxford). 1999 Jun;38(6):510-5.

34. NATHAN C. Points of control in inflammation. **NATURE** 2002; 420: 846-52.
35. NINOMIYA et al. Matrix metalloproteinase-1 polymorphism of promoter in sarcoidosis and tuberculosis patients. **SARCODIOSIS VASC DIFFUSE LUNG DIS.** 2004 Mar;21 (1): 19-24.
36. OKADA Y. et al. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase/ gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. **LAB INVEST** 1995; 311-312.
37. OKESON JP. **OROFACIAL PAIN: GUIDELINES FOR ASSESSMENT, DIAGNOSIS & MANAGEMENT.** 1996.
38. PAP T, SHIGEYAMA Y, KUCHEN S, FERNIHOUGH JK, SIMMEN B, GAY RE, BILLINGHAM M, GAY S. Differential expression pattern of membrane-type matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. **ARTHRITIS RHEUM.** 2000 Jun;43(6):1226-32.
39. PRINGLE JH. Displacement of the mandibular meniscus and its treatment. **BR J SURG** 1918; 6: 385.
40. PUZAS JE, LANDEAU JM, TALLENTS R, ALBRIGHT J, SCHWARZ EM, LANDESBURG R. Degradative pathways in tissues of the temporomandibular joint. Use of in vitro and in vivo models to characterize matrix metalloproteinase and cytokine activity. **CELLS TISSUES ORGANS.** 2001;169(3):248-56.
41. REES LA. The structure and function of the mandibular joint. **BR DENT J** 1954; 96: 125-33.
42. SCAPINO RP. The posterior attachment: its structure, function and appearance in TM imaging studies. Part 1. **J CRANIOMAND DISORD** 1991; 5:83-95.
43. SCHMOLKE C. The relationship between the temporomandibular joint capsule, articular disc and jaw muscles. **J ANAT** 1994; 184:335-45.
44. SOUZA S.J. et al. Regulation of extracellular matrix-degrading proteases. **CIÊNCIA E CULTURA** 1993; 313-318.
45. SRINIVAS R, SORSA T, TJÄDERHANE L, NIEMI E, RAUSTIA A, PERNU H, TERONEN O, SALO T. Matrix metalloproteinases in mild and severe temporomandibular joint internal derangement synovial fluid. **ORAL SURG ORAL MED ORAL PATHOL ORAL RADIOL ENDOD.** 2001 May;91(5):517-25.
46. SOUZA, A.P. et al. MMP-1 promoter polymorphism: Association with chronic periodontitis severity in a Brazilian population. **J CLIN PERIODONTOL** 2003.

47. TORII A., KODERA Y., UESAKA K., et al. Plasma concentration of matrix metalloproteinase-9 in gastric cancer. **BR J SURG** 1997; 84, 133-136.
48. TORRE-AMIONE G. et al. A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type $\alpha 1$ cDNA escapes immune surveillance. **PROC NATL ACAD SCI** 1990; 1486-1490.
49. VU TH. Matrix Metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **GENE DEV** 2000; 14: 2123-33.
50. WEEKS J.G., HALME J., WOESSNER J.F. Jr. Extraction of collagenase from the involuting rat uterus. **BIOCHIM BIOPHYS ACTA** 1976; 205-214.
51. WILKES CH. Arthrography of the temporomandibular joint in patients with TMJ pain dysfunction syndrome. **MINN MED** 1978; 61: 645-52.
52. WILKINSON T, CHAN EK. The anatomic relationship of the insertion of the superior lateral pterygoid muscle to the articular disc in the temporomandibular joint of human cadavers. **AUST DENT J** 1989; 34: 315-2.
53. WILKINSON T. The relationship between the disk and the lateral pterygoid muscle in the human temporomandibular joint. **J PROSTHET DENT** 1988; 60: 715-24.
54. WILKINSON T. The relationship between the disk and the lateral pterygoid muscle in the human temporomandibular joint. **J PROSTHET DENT** 1988; 60: 715-24.
55. WOESSNER JF Jr, GUNJA-SMITH Z. Role of Metalloproteinase in human osteoarthritis. **J RHEUMATOL SUPPL** 1991; 27:99-101.
56. WOESSNER JF Jr, GUNJA-SMITH Z. Role of Metalloproteinase in human osteoarthritis. **J RHEUMATOL** Suppl 1991; 27:99-101.
57. YOSHIDA H, YOSHIDA T, IIZUKA T, SAKAKURA T, FUJITA S. The localization of matrix metalloproteinase-3 and tenascin in synovial membrane of the temporomandibular joint with internal derangement. **ORAL DIS.** 1999 Jan;5(1):50-4.
58. ZARDENETA G, MILAM SB, LEE T, SCHMITZ JP Detection and preliminary characterization of matrix metalloproteinase activity in temporomandibular joint lavage fluid. **INT J ORAL MAXILLOFAC SURG.** 1998 Oct;27(5):397-403.

Histórico do trabalho e considerações finais

No ano de 2004 fui conversar com a Profa. Dra. Paula Cristina Trevilatto sobre a possibilidade de ingressar no Curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). Ela conversou comigo sobre as Linhas de Pesquisa existentes no PPGCS nas quais trabalhava.

Conversamos várias vezes sobre qual seria o tema da minha dissertação de mestrado, preferencialmente direcionado para uma das Linhas de Pesquisa da minha orientadora, as quais se relacionavam à Genética (polimorfismos genéticos).

Em uma destas inúmeras conversas que tivemos, comentei que gostaria de utilizar algo da minha vida profissional, e entre as opções, acabamos escolhendo a articulação temporomandibular. Foi então que começamos a pesquisar sobre o que já tinha sido estudado em relação à disfunção da articulação temporomandibular e seus efeitos diretos no disco articular.

Para nossa surpresa, chegamos à conclusão que muito pouco tinha sido estudado sobre o assunto, e o pouco que encontramos eram pesquisas em animais e cadáveres.

Foi então que vimos o rico material que tínhamos para pesquisa: discos articulares de pacientes com disfunção da articulação temporomandibular.

Desde então, finalizei minha dissertação com o artigo publicado em periódico internacional qualificado da área, intitulado ***Histologic and histomorphometric analysis of posterior region of the human temporomandibular disc***. Almeida LE,

Baioni CS, Martins AP, Line SR, Noronha L, Trevilatto PC, de Lima AA, de Oliveira Filho MA, Ignácio SA. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2008 Apr;105(4):e6-11. doi: 10.1016/j.tripleo.2007.10.004.

Estabeleci contato com a Universidade de Catania, Itália, mais especificamente com a Dra. Rosi Leonardi, com a qual publiquei nove artigos, desde 2010:

1. ***Expression of β -defensin 4 on temporomandibular joint discs with anterior displacement without reduction.*** Sicurezza E, Loreto C, Musumeci G, Almeida LE, Rusu M, Grasso C, Leonardi R. **J Craniomaxillofac Surg.** 2013 Feb 26. doi:pii: S1010-5182(13)00052-8. 10.1016/j.jcms.2013.01.036. [Epub ahead of print]
2. ***Apoptosis in temporomandibular joint disc with internal derangement involves mitochondrial-dependent pathways. An in vivo study*** Caltabiano R, Leonardi R, Musumeci G, Bartoloni G, Rusu MC, Almeida LE, Loreto C. **Acta Odontol Scand.** 2012 Jul 12.
3. ***Expression and localization of aquaporin-1 temporomandibular joint disc with internal derangement.*** Loreto C, Galanti C, Almeida LE, Leonardi R, Pannone G, Musumeci G, Carnazza ML, Caltabiano R. **J Oral Pathol Med.** 2012 May 3. doi: 10.1111/j.1600-0714.2012.01156.x.
4. ***Apoptosis in displaced temporomandibular joint disc with and without reduction: an immunohistochemical study.*** Loreto, Carla; Almeida, Luis Eduardo; Trevilatto, Paula; Leonardi, Rosalia. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 40, p. 103-110, 2011.
5. ***Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Expression Correlates to Temporomandibular Joint Disk***

- Degeneration.*** Leonardi, Rosalia; Almeida, Luis Eduardo; Rusu, Mugurel; Sicurezza, Edoardo; Palazzo, Giuseppe; Loreto, Carla. **The Journal of Craniofacial Surgery (Print)**, v. 22, p. 504-508, 2011.
6. ***Lubricin immunohistochemical expression in human temporomandibular joint disc with internal derangement.*** Leonardi, Rosalia; Almeida, Luis Eduardo; Loreto, Carla. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, 40:587-592, 2011.
7. ***Occurrence and regional distribution of TRAIL and DR5 on temporomandibular joint discs: comparison of disc derangement with and without reduction.*** Leonardi, Rosalia; Almeida, Luis Eduardo; Trevilatto, Paula C.; Loreto, Carla. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 109, p. 244-251, 2010.
8. ***Limited Fatty Infiltration Due to Apoptosis in Human Degenerated Temporomandibular Joint Disks.*** Leonardi, Rosalia ; Migliore, Maria Rita; Almeida, Luis Eduardo; Trevilatto, Paula C.; Loreto, Carla. **The Journal of Craniofacial Surgery (Print)**, v. 21, p. 1508-1511, 2010.
9. ***TRAIL, DR5 and caspase 3-dependent apoptosis in vessels of diseased human temporomandibular joint disc.*** An immunohistochemical study. Loreto, Carla; Almeida, Luís Eduardo; Migliore, Maria Rita; Leonardi, Rosalia. **European Journal of Histochemistry**, v. 54, p. 175-179, 2010.

O aluno de mestrado, também orientado pela Profa. Paula Cristina Trevilatto, Flavio Camejo, ex-residente do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, defendeu seu mestrado em dezembro de 2012, utilizando as mesmas amostras e,

recentemente, um artigo com os resultados do seu trabalho de mestrado, intitulado ***FASL Expression In Articular Discs Of Human Temporomandibular Joint And Association With Osteoarthritis***, foi aceito para publicação no periódico ***Journal of Oral Pathology and Medicine***.

Para o futuro, Juliano Perotto, aluno de Mestrado, e Dra. Andrea Duarte Doetzer, em supervisão de pós-doutorado, ambos ex-residentes do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, e vinculados ao PPGCS da PUCPR, utilizarão as amostras de discos articulares para trabalhos mais amplos, envolvendo não apenas marcadores moleculares específicos, mas componentes-chave que representarão vias inflamatórias e de apoptose, para melhor compreensão dos mecanismos relacionados às disfunções articulares, com sequelas no disco articular.