

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

JULIANA ISABELITA CYRINO PESSOA

ESTUDO DA ATIVIDADE DE GELATINASES EM DENTINA SADIA EM
MOLARES DE RATOS, POR MEIO DA TÉCNICA DE ZIMOGRÁFIA
IN SITU

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Odontologia de Piracicaba da
UNICAMP, para obtenção do título de
Mestre em Biologia Buco-Dental, na Área
de Histologia e Embriologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques.

Este exemplar corresponde à
versão final da Dissertação
defendida por Juliana Isabelita
Cyrino Pessoa e orientada pelo
Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques

Assinatura do Orientador

PIRACICABA, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

P439e Pessoa, Juliana Isabelita Cyrino, 1982-
Estudo da atividade de gelatinases em dentina sadia de
molares de ratos, por meio da técnica de zimografia *in situ* /
Juliana Isabelita Cyrino Pessoa. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Marcelo Rocha Marques.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Colágeno. 2. Metaloproteinases da matriz. 3.
Odontoblastos. 4. Matriz extracelular. 5. Dentinogênese. I.
Marques, Marcelo Rocha. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: *In situ* study of the gelatinases activity in dentin from molar teeth

Palavras-chave em Inglês:

Collagen

Matrix metalloproteinases

Odontoblasts

Extracellular matrix

Dentinogenesis

Área de concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Mestre em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora:

Marcelo Rocha Marques [Orientador]

Adriana Fernandes da Silva

Sergio Roberto Peres Line

Data da defesa: 27-02-2012

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 27 de Fevereiro de 2012, considerou a candidata JULIANA ISABELITA CYRINO PESSOA aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Marcelo", written over a horizontal line.

Prof. Dr. MARCELO ROCHA MARQUES

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Adriana", written over a horizontal line.

Profa. Dra. ADRIANA FERNANDES DA SILVA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Sergio", written over a horizontal line.

Prof. Dr. SERGIO ROBERTO PERES LINE

Dedico essa obra a toda minha família pelo apoio nesse reinício de vida, por toda atenção. Obrigada por estarmos juntas e acreditar em meu potencial. Dedico, também, a todos que de alguma forma participaram da minha formação acadêmica e aos meus amigos que muito contribuíram para que eu pudesse chegar aqui hoje.

Dedico, também, aos animais usados nesta pesquisa, indefesos, mas muito importantes para a humanidade, esperando que suas efêmeras vidas possam, por meio desse trabalho, ser de grande valia para odontologia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha vida, saúde, força de vontade e oportunidade de aprender.

A minha família, tantas vezes subtraída de minha presença, porém, não do meu amor, durante este trabalho, realizado com muita seriedade e dedicação. Sem você, servindo de âncora e esteio, não teria conseguido superar todos os maus momentos durante a recuperação da cirurgia que necessitei e das seqüelas pós-cirúrgicas, podendo recomeçar e voltar aos meus objetivos, indo atrás de meus sonhos. Obrigada, hoje faço acontecer a primeira etapa deles, vocês serão expectadores de vários outros e terão oportunidade de me acompanharem na caminhada.

Não posso esquecer-me de agradecer a dois anjos que a vida enviou-me: Dr. Takasu Satu, neuroclínico e Dr. Jose Romeu Luiz Boullosa, neurocirurgião, pois, sem vocês, talvez não estivesse aqui, quando necessitei de seus préstimos e conhecimentos para salvarem minha vida.

Aos meus avós por terem sido a base de toda minha formação. Obrigada por me ensinarem o valor da humildade e da educação, que me fortalece em nossa família que me proporciona apoio incondicional. Aos meus avós maternos (em memória) pelo empenho em garantir a base de toda minha educação, por terem sido pessoas maravilhosas e por terem passado a experiência de vida, ensinando-me a viver nessa sociedade frágil em valores humanos.

Aos meus pais, exemplos de perseverança, todo meu amor. Obrigada pela dedicação incondicional, em todos os momentos, por serem meus anjos da guarda e pelo esforço para tornar este sonho realidade. Obrigada a Ana Carolina, irmã querida, minha inspiração sempre, que em sua tenra idade, esbanja sabedoria e inteligência e, mesmo estando longe, nossos corações estão muito perto.

Ao Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques, professor e orientador, pelas inestimáveis dedicação e contribuição, com sua sabedoria e inteligência. Por todos os conselhos, incentivos e motivações, graças aos quais foi possível a realização deste trabalho.

As funcionárias do Departamento de Morfologia, pelo brilho especial que me proporcionaram durante o aprendizado, pela amizade e solidariedade e por terem me ensinado as técnicas do laboratório.

Aos Professores do Departamento Dr. Pedro Duarte Novaes, Dr. Sergio Roberto Line e Dra. Ana Paula Prado, pela sabedoria e esforço em formar novos mestres. Aos professores Prof. Dr. Jorge Esquiche Leon, Profa. Dra. Adriana Fernandes da Silva e Prof. Dr. Alan Roger dos Santos Silva, por aceitarem participar da banca de defesa desta dissertação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq - pela bolsa concedida.

Ser feliz é encontrar força no perdão, esperanças nas batalhas, segurança no palco do medo,
amor nos desencontros. É agradecer a Deus a cada minuto pelo milagre da vida.

(Fernando Pessoa)

RESUMO

Gelatinases são endopeptidases zinco-dependentes que formam uma das classes das metaloproteinases da matriz (MMPs). O objetivo deste estudo foi localizar, em dentina saudável de molares de ratos, onde há atividade de gelatinases por meio da técnica de zimografia *in situ*. Para tanto, 10 ratos Wistar com 8 semanas de idade foram sacrificados, suas hemimandíbulas foram removidas, fixadas em paraformaldeído, lavadas em PBS+glicerol e descalcificadas em EDTA+glicerol. E, seguida as peças foram lavadas em PBS+glicerol+sucrose e incluídas em Paraplast. Cortes longitudinais da região de molares foram incubados com *Dq Gelatin* (Invitrogen) diluído em tampão Tris/HCl/CaCl₂. Com os controles, cortes foram incubados com *Dq Gelatin (Invitrogen)*+inibidor de MMPs ou apenas com tampão Tris/HCl/CaCl₂. Após a incubação foi possível observar, por meio de microscopia de fluorescência confocal, atividade gelatinolítica em praticamente toda a dentina, inclusive nos prolongamentos dos odontoblastos. Próximo ao limite amelo-dentinário e também na pré-dentina, observou-se maior atividade gelatinolítica em relação a toda dentina analisada. Pode-se concluir que é possível detectar atividade de gelatinases em dentina de molares de ratos por meio da técnica de zimografia *in situ* e que tal atividade varia em diferentes regiões da dentina. Portanto, zimografia *in situ* pode ser útil na investigação do papel das gelatinases de dentina em eventos como o processo de desmineralização-remineralização da dentina, a cárie dentária e a degradação da camada híbrida, formada em procedimentos restauradores adesivos.

Palavras-chave: Dentina, Metaloproteinases da Matriz, Microscopia de fluorescência.

ABSTRACT

Objective: The purpose of this study was to evaluate the gelatinases activity in decalcified rat molars crowns by *in situ* zymography. **Methods:** Five male Wistar rats were killed and their hemimandibles were fixed in paraformaldehyde, decalcified in EDTA+Glycerol solution and embedded in paraffin. Section from the region of molars teeth were incubated with DQ gelatin (*Invitrogen*) and observed under confocal microscopy. **Results:** By using *in situ* zymography was possible detected gelatinolytic activity in whole crown dentin. High activity of the gelatinases was observed in the odontoblastic process, dentin-enamel junction (DEJ) and predentin. **Conclusions:** It was possible to evidence gelatinases activity in fixed and decalcified dentin from rat molars, and its activity was not uniformly distributed over different compartments of the dentin. *In situ* zymography could be a tool in studies investigating the role of the gelatinases in the dentin development and degradation.

Keywords: *dentin, MMPs, gelatinases, in situ zymography*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 PROPOSIÇÃO	6
3 CAPÍTULO 1 : <i>In situ</i> study of the gelatinases activity in dentin from molar teeth	7
4 CONCLUSÃO.....	20
REFERÊNCIAS	21
ANEXOS.....	23

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dentina

A dentina é um tecido conjuntivo duro que forma a maior parte do dente, e é formada a partir da deposição de uma camada de matriz não mineralizada chamada pré-dentina; esta gradualmente se mineraliza em dentina à medida que as proteínas não colágenas da matriz são incorporadas na frente de mineralização (Ten Cate, 2008). Uma importante propriedade física, a elasticidade, confere à dentina flexibilidade e previne fratura do esmalte subjacente. Na raiz a dentina é coberta por cimento; na coroa a dentina e o esmalte forma uma firme união, denominada junção amelodentinária (Ten Cate, 2008).

A dentina é constituída por aproximadamente 10 % de água (Ten Cate, 2008), 70% de tecido mineralizado e 20% de matriz orgânica. Sua porção inorgânica é composta de cristais de hidroxiapatita (Mazzoni *et al.*, 2008; Polasaari, 2003). A maior parte da dentina circumpulpar é composta de dentina inter e peri-tubular, permeada pela matriz contendo os túbulos dentinários com os processos odontoblásticos. Sua porção orgânica é constituída principalmente por fibras colágenas, principalmente do tipo I (90%), as quais conferem as propriedades bioquímicas e funcionais de sua estrutura (Mazzoni *et al.*, 2008).

Proteínas fosforiladas, não colágenas, representam cerca de 10% da matriz protéica da dentina. Dentre as proteínas não colágenas encontradas na porção orgânica da pré-dentina e dentina, destaca-se um grupo de certas proteínas que são denominadas Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glicoproteínas (SIBLINGs) (Fisher & Ferdarcho, 2003). Os elementos desta família incluem: fosfosialoproteína de dentina (DSPP) e, conseqüentemente, sialoproteína de dentina (DSP) e fosfoproteína de dentina (DPP), proteína de matriz da dentina 1 (DMP-1), sialoproteína óssea (BSP) e osteopontina (OPN).

BSP e OPN são encontradas principalmente no osso, mas também estão presentes em odontoblastos e dentina (Fisher & Ferdarcho, 2003). Além das SIBLINGs, proteínas como decorin, biglican, lumican, fibromodulina, fator de TGF β -1 osteoaderina,

osteonectina, osteocalcina, amelogenina e metaloproteínas da matriz extracelular (MMPs), também são encontradas no tecido dentinário (Chaussain Miller *et al.*, 2006).

1.2 Metaloproteínas da Matriz Extracelular (MMPs)

As MMPs formam um grupo de endopeptidases zinco-cálcio dependentes que, em pH fisiológico, têm capacidade de degradar as proteínas da matriz extracelular (Polasaari, 2003; Hannas, 2007; Granjeiro; Tjardhane, 2007; Stamenkovic, 2003; Navarro *et al.*, 2006; Freitas, 2006; Arakaki, 2009). A particular dependência destes metais é justificável, já que o Zn^{++} e o Ca^{++} são responsáveis pela estabilidade e atividade destas enzimas. As MMPs regulam eventos patológicos e fisiológicos como: organogênese, remodelação tecidual e o reparo de feridas, onde exerce a função de regulação da comunicação celular do processamento de moléculas bioativas, como receptores de superfície celular, citocinas, hormônios, moléculas de adesão e fatores de crescimento (Nonaka, 2006).

A classificação das MMPs foi feita em subgrupos de acordo com a capacidade de degradar substratos específicos pelos quais têm afinidade. Os subgrupos são: collagenases intersticiais (MMP-1 e MMP-8), estromelinas (MMP-3 e MMP-10), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), MMPs de membrana (MT-MMPs) e outras enzimas (Woessner, 1998).

As MMPs são produzidas por diversas células do organismo, e sua estrutura básica é formada por um peptídeo de sinalização, um pró-peptídeo, um domínio catalítico e um domínio hemopoxim-like (Hannas, 2007; Coimbra, 2010; Stamekovic, 2003; Hoff, 2005), com exceção das gelatinases que possuem um domínio fibronectin-like no seu sítio catalítico, o que sugere seu envolvimento na união com as gelatinas (Coimbra, 2010).

Nos processos biológicos essas enzimas atuam na angiogênese. Assim, partindo de estruturas vasculares pré-existent participam da neoformação de vasos sanguíneos; este evento é necessário em processos como a embriogênese, os reparos e também no crescimento de tumores (Hannas, 2007). As MMPs também exercem importante papel na regulação de atividades biológicas como: a transcrição gênica, a ativação pró-enzimática e

a inibição da atividade enzimática; a ação conjunta destes é responsável pelo confinamento da atividade das MMPs em sítios e situações biologicamente necessárias. Vale ressaltar que, pela maior expressão gênica das MMPs durante a remodelação fisiológica tecidual ou na presença de processos patológicos, provavelmente, a transcrição gênica representa o seu principal mecanismo regulatório.

Citocina e os fatores de crescimento controlam, de uma forma geral, os promotores dos genes das MMPs. Esse controle ocorre através de vias de sinalização intracelulares, dentre as quais, podem-se destacar ao menos três vias de sinalização: proteína-quinase mitógeno-ativada (MAPKs), c-Jun N-terminal quinase (JNK) e quinase regulada por sinal extracelular (ERK) (Nonaka, 2006, apud Huang *et al.*, 2004).

MMPs também estão implicadas no desenvolvimento do câncer, ajudando a promover o crescimento, a invasão e a metástase (Stamekoovik, 2003). Exercem ainda efeitos no sistema imune, de defesa do organismo (Arakaki, 2009). Além disso, participa de processos patológicos bucais: como periodontite, cárie, metástase de alguns tipos de tumores e nas desordens da articulação têmporo- mandibular. (Navarro *et al.*, 2006).

O pH baixo do microambiente é um estímulo importante para ativação das MMPs, que em sua presença estas promovem a degradação da matriz extracelular. Especificando, pode-se dizer que ocorre uma alteração na conformação do pró-peptídeo, induzindo a cisteína flexível; passo este considerado crítico no processo de ativação enzimática (Mazzoni *et al.*, 2008).

As MMPs são secretadas na forma de pró-enzimas inativas, denominadas zimógenos, que no ambiente Pericelular são ativadas por segmentação de uma parte do zimógeno denominada pró-peptídeo, ocorrendo à quebra de uma ligação de cisteína e íons Zn^{++} bloqueando a reatividade do local ativo. Assim, neste processo, zimógenos inativos tornam-se MMPs ativas (Navarro *et al.*, 2006). O processo de ativação das MMPs é resultado da interação que ocorre no agrupamento sulfidrila da cisteína, que se encontra no domínio pró-peptídico e no domínio catalítico que contém o íon zinco, e este processo pode ser diretamente controlado pelo pH do microambiente em que se encontra estas proteases (Nonaka, 2006).

A atividade das metaloproteinases é regulada por meio de inibidores endógenos como a α 2- macroglobulina, que inativa as MMPs no plasma e em outros fluidos tissulares. (Nonaka, 2006). As MMPs, também são controladas por meio de inibidores específicos conhecidos como inibidores teciduais (TIMPs). As TIMPs são proteínas pequenas e multifuncionais que regulam as MMPs na sua função, no nível de ativação e na habilidade de hidrolisar um determinado substrato (Navarro, 2006; Hannas, 2007; Palassari, 2003; Hoff, 2003; Arakaki, 2009). Em estudos *in vivo*, o controle da atividade das MMPs e /ou TIMPs ocorrem em diferentes níveis e estão envolvidos com fatores como: regulação da expressão gênica, ativação do zimógeno e inibição da atividade de enzimas por inibidores específicos. Contudo, muito das MMPs e TIMPs são reguladas pelo nível de transcrição, por fatores de crescimento e citocinas (Arakaki, 2009).

O equilíbrio entre a produção de MMPs e de inibidores TIMPs é importante para manter a homeostase da matriz extracelular. O desequilíbrio destes fatores, onde a atividade da MMPS nos tecidos sobrepõe a das TIMPs, esta sempre relacionado a processos patológicos da matriz extracelular (Hannas, 2007).

1.3. Dentina e Gelatinases

As MMPs são encontradas em tecidos dentais em formação, participam da biomineralização da dentina e do esmalte (Navarro *et al.*, 2006). Na dentina são encontradas várias metaloproteinases, e estas têm sido relacionadas principalmente com a regulação da organização das fibras colágenas e durante o seu processo de mineralização (Boushell *et al.*, 2011).

As gelatinases formam uma das classes das MMPs (Hannas, 2007). A MMP-2 é a gelatinase mais expressa na dentina, esta é encontrada nos odontoblastos, na porção mais profunda da dentina e na junção amelo-dentinária. As TIMPs-2 e a MMP-2 (gelatinase A) são co-localizadas, em baixas concentrações, principalmente, nos odontoblastos (Niu *et al.*, 2011). Destaca-se, também a maior concentração de MMP-2 na junção amelo-dentinária, Boushell *et al.* (2011), o que sugere ter uma importância clínica na extensão da cárie

prematura (Boushell *et al.*, 2011), e também em rede de fibras colágenas intra-tubulares (Mazzoni *et al.*, 2008).

A cárie de dentina tem sido estudada como um processo que envolve a ativação de MMPs neste tecido. Nesse caso, sugere-se que alterações no pH na superfície dentinária, viabilizaria a ativação de MMPs endógenas que atacariam a matriz orgânica, favorecendo a destruição tecidual. Além disso, têm sido discutidas possíveis atuações de MMPs no processo de degradação da interface de união entre dentina e sistemas adesivos dentinários. Neste caso, o condicionamento ácido à dentina, necessário para procedimentos restauradores, ativaria MMPs daquela superfície, e poderia então degradar o colágeno que se associa ao adesivo dentinário, favorecendo então a falha deste procedimento restaurador.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi mapear, em dentina de molares de ratos, as regiões que exibem proteases com atividade gelatinolítica.

3 CAPÍTULO 1

Title: *In situ* study of the gelatinases activity in dentin from molar teeth.

Abstract

Objective: The purpose of this study was to evaluate the gelatinases activity in decalcified rat molars crowns by *in situ* zymography. **Methods:** Five male Wistar rats were euthanized and their hemimandibles were fixed in paraformaldehyde, decalcified in EDTA+Glycerol solution and embedded in paraffin. Section from the region of molars teeth were incubated with or without DQ gelatin(Invitrogen) in 50 mM TrisCaCl₂ 37 °C for 2 hr and observed under confocal microscopy. **Results:** By using *in situ* zymography it was possible detected gelatinolytic activity in whole crown dentin. High activity of the gelatinases was observed in the dentinal tubules, dentin-enamel junction (DEJ) and predentin. Gelatinolytic activity was not uniformly distributed over different compartments of the dentin. **Conclusions:** It was possible to evidence gelatinases activity in fixed and decalcified dentin from rat molars. *In situ* zymography could be a tool in studies investigating the role of the gelatinases in the teeth development and degradation.

Keywords: *dentin, MMPs, gelatinases, in situ zymography.*

Introduction

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of structurally related but genetically distinct enzymes that are zinc (Zn)-dependent and can degrade extracellular matrix (ECM) and basement membrane (BM) components. This group of enzymes is classified into collagenases, gelatinases, stromelysins, membrane associated MMPs and other MMPs, mainly based on the substrate specificity and molecular structure^{1,2}.

MMPs are involved in physiological and pathological processes such as tissue development, tissue remodeling, wound healing, inflammation, tumor progression, caries progression, and play significant roles in the regulation of cellular communication, molecular shedding and immune functions by processing bioactive molecules including cell surface receptors, cytokines, hormones, defensins, adhesion molecules and growth factors^{2,3}.

The expression of several MMPs during dental development has been previously evaluated. MMPs were identified in human and rat sound dentin and pulp tissues. They are thought to be implicated in early stages of dentinogenesis, but their precise functions *in vivo*, in particular at the later stages of dental tissue formation, have not been totally established. Some MMPs, such as collagenase MMP-1, gelatinases MMP-2 and MMP-9, collagenase-2 (MMP-8), stromelysin-1 (MMP-3), MMP-2 activator MT1-MMP, and enamelysin (MMP-20), have all been identified in either odontoblasts or in the predentin/dentin compartments^{4,13}.

Substrate zymography, FRET-based MMP activity determination, ELISA and *in situ* zymography (ISZ) are among the methods used to assess the active and latent forms of proteolytic enzymes in biological samples.^{11,13,16} ISZ is a technique that uses an enzymatic substrate-based support or overlay to detect and localize specific protease activity in tissue sections¹⁷. In this assay, an enzymatic substrate for a specific protease(s) is deposited on the surface of a tissue section. During the incubation period, the substrate will be cleaved in a time- and dose-dependent manner by the appropriate active enzymes in their native location. After the incubation period, the lyses of the labeled substrate can be detected by light microscopy or fluorescent microscopy depending on the substrate type, thereby permitting the localization of the specific protease activity in tissue sections¹⁷. The location of active collagenases by ISZ was demonstrated in different tissues, including in both bone and dentin after decalcification¹⁴.

Although studies have already demonstrated the presence of MMPs in dentin, the implications of the presence and activity of the collagenases and gelatinases during dentin

development, as well as in non-physiological changes in the tooth, have not been totally elucidated. In addition, no literature report is found about localization of either MMP activity in histological sections from decalcified dentin molars, it was showed only in rats incisors teeth (continuously growth teeth). Therefore, the aim of this preliminary study was to evaluate, by *in situ* zymography technique, the gelatinolytic activity in decalcified dentin of rat molars, and also to map the gelatinolytic activity in the distinct regions of this tissue.

Materials and Methods

Animals

Five male Wistar rats (8-weeks old, mean weight of 234.26 g $\pm$ 18.8), obtained at the Animal Facility Center of the State University of Campinas were maintained in a room with 12 hour day/night cycles with food and drinking water *ad-libitum*. Experimental procedures were approved by the Institutional Animal Research Committee at the State University of Campinas (São Paulo, Brazil).

Tissue Preparation

The animals were euthanized by cervical dislocation and their hemimandibles were retrieved for histological evaluation. For tissue fixation, the right hemimandibles of all animals were kept in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Science - EMS, Fort. Washington, PA, U.S.A.), pH 7.4, at 4 °C for 12 hr (adapted from Porto *et al.* 2009¹⁴). After tissue fixation, the hemimandibles were decalcified using a protocol described by Begum *et al.* 2010¹⁸. The hemimandibles were washed for 12 h at 4°C in each of the following series of solutions: 0.01 M PBS (Cultilab, Campinas, SP Brazil) containing 5% glycerol (Synth, São Paulo, SP, Brazil), 0.01 M PBS containing 10% glycerol, and 0.01 M PBS containing 15% glycerol. The specimens were then decalcified in EDTA/Glycerol (EDTA-G) solution 14.5 g EDTA (Merck AG, Darmstadt, Germany), 1.25 g NaOH (Merck AG), and 15% glycerol in 100 ml distilled pH 7.3 at 4°C. The EDTA-G solution was

replaced every 2 days. After decalcification (~ 40 days), the specimen was washed at 4°C for 12 h in successive washes of 15% sucrose and 15% glycerol in PBS, 20% sucrose and 10% glycerol in PBS, 20% sucrose and 5% glycerol in PBS, 20% sucrose in PBS, 10% sucrose in PBS, 5% sucrose in PBS, and 100% PBS. Region from the first and second molars was selected and included in a paraffin of lower fusion point (EMS). Longitudinal sections (thickness: 5µm) in the middle of the crown molar teeth were done in a microtome (Leica, Nussloch, Germany) and put on silanized microscope slides. Some sections were stained with hematoxylin and eosin (HE).

In situ Zymography

In order to detect gelatinases activity in dentin from rat molars, a protocol, based on study from Porto *et al*, 2009¹⁴, was used. For samples deparaffinization, the following washes were performed: 1. Xylene (Synth) - 2 x 1 min; Xylene 1:1 with 100% ethanol (Synth) - 3'; 100% ethanol- 2 x 3'; 95% ethanol - 3'; 70 % ethanol – 3'; 50 % ethanol – 3'; 100% distilled water. After to dry partially the slices, eighty mL of (1:10) of DQ-gelatin (DQ-gelatin, E12055; Invitrogen) in 50 mM Tris-CaCl₂ (Definir Tris-Cacl2, ex: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 and 5 mM CaCl₂) was applied on top of the tissue sections, which were incubated at 37 °C for 2 hr in a dark humid chamber. The gelatinolytic activity was observed as green fluorescence (absorption maxima, ~ 495 nm; fluorescence emission maxima, ~515 nm) by confocal fluorescence microscopy (Leica TCS SP5, Leica Microsystem, Heidelberg, Germany). Negative control sections were incubated with 50 mM Tris-CaCl₂ as described above, but without DQ-gelatin. In order to confirm that the observed activity is due to MMP enzymes, some sections were incubated either with an metalloproteinase inhibitor, 1,10-phenanthroline (Phe) (Sigma Chemicals; St. Louis, MO) at 2mM in 50 mM TrisCaCl₂.

Results

Sections from rat molars were incubated with DQ-gelatin, or with DQ-gelatin + Phe or without DQ-gelatin, and then were observed by confocal fluorescence microscopy. It was possible to verify that fixed and decalcified dentin from rat molars can be evaluated by *in situ* zymography technique. In the sections incubated with DQ-gelatin, the gelatinolytic activity was observed by the fluorescence throughout the dentin (Figs. 1 -3). Negative controls (sections without DQ-gelatin) showed only faint fluorescence (Fig. 1B). Dentin auto-fluorescence was easily discriminated from the fluorescence caused by the degradation of labeled gelatin. Sections incubated with DQ-gelatin + MMPs inhibitor (Fig. 1D) had a loss of fluorescence as compared with samples without Phe (Fig. 1C). Although it was observed gelatinolytic activity in whole dentin, high fluorescence was found in the dentinal tubules (Figs. 2B-2D, 3B,C), in the predentin (Figs. 2C,D) and in the dentin-enamel junction – DEJ (Figs. 3B,C). All photomicrographies were obtained with the same confocal microscope calibration. High magnificence photomicrographs from negative controls or samples incubated with Phe were not fluorescent (data not shown).

Discussion

The choice of an adequate method may be a critical step to detect the actual biological activity of an enzyme. Since dentin is a calcified tissue, studies that involve activity assays are commonly difficult to be performed and reproduced, mainly because the MMPs are overlapping in mineral crystals, and the process to remove these crystals can not only cause loss but also affect the proteolytic capacity of enzymes.

Type I collagen constitutes about 90% of the dentin organic matrix. In general, collagens can be degraded by the interstitial collagenases, which include MMP-1, MMP-8, and MMP-13, resulting in the release of 3/4- to 1/4-length peptides. These peptides lose the triple-helical conformation and can then be further degraded by the gelatinases MMP-2 and

MMP-9¹². In dentin, gelatinases presumably contribute to organic matrix reorganization before mineralization. Some of these enzymes are incorporated into mineralized dentin¹³.

The presence of gelatinases in dentin has been investigated with different methods in attempts to study the biological functions of these proteases. Three different methods have been used in the major studies that assess gelatinases in dentin: substrate zymography (by using SDS Page), western blot and immunohistochemistry^{13,20}. Substrate zymography and western blot can be assessed after dentin crushing, followed by protein extraction¹³. These techniques allow evaluate the presence/activity of the some MMPs by molecular weight and specific substrate (zymography) or by molecular weight and conjugation with antibody (western blot). For both techniques it is not possible to know the exact localization of the proteases extracted from dentin. On the other hand, by using immunohistochemistry, it is possible perform an exact location of different types of proteases in dentin, but this technique does not discriminate between zymogens and active enzymes, and no information about the activity can be inferred in this case.

Previous studies have already shown gelatinolytic activity in dentin by using ISZ^{14,21}, but our results demonstrated, for the first time, the use of this technique in decalcified dentin molars teeth. In addition, in the present study, high resolution confocal fluorescence photomicrographs, evidenced more details about the regions with gelatinolytic activity in dentin, which until now had not been shown.

The results indicated that activity of the gelatinases is variable in the different regions of the dentin, and it suggests that gelatinases may have distinct functions in different regions of this tissue. The highest fluorescence related to gelatinolytic activity was found in predentin and in dentinal tubules (Figs. 2 and 3). These findings may be correlated with the presence of the MMP-2. Immunohistochemical studies indicate that MMP-2 is concentrated in the predentin, dentinal tubules and the inner dentin area adjacent to the predentin^{15,22}, which is consistent with the hypothesis that MMP-2 is actively involved in the organization of pre-mineralized matrix formation as well as its subsequent mineralization^{23,25}.

In a similar way, the high fluorescence related to gelatinolytic activity observed in the region of the DEJ (Fig. 3) may also be correlated with MMP-2 presence. High concentrations of MMP-2 in close proximity to the DEJ by immunohistochemistry have already been reported^{15,20}. MMP-2 may be involved in establishment of the DEJ and initiation of dentin formation as other studies have suggested^{24,26}. As dental caries progresses through the enamel and into dentin there is an initial spread at the DEJ. The high concentration of MMP-2 near the DEJ could be in part responsible for this clinical phenomenon^{15,25,32}.

The role of the dentinal MMPs in caries progression has been extensively studied^{22,27}. It is generally regarded that MMPs, although activated, cannot degrade the organic matrix of dentin at acidic pH. However, as caries progress, acids are neutralized by salivary buffer systems. Therefore, a momentary increase in pH, occurring at the spots of demineralized dentin, allows the pH-activated MMPs to degrade the organic matrix²⁷. The protocol used in our study, certainly can be reproduced in teeth with dentin caries, and an *in situ* evaluation of the gelatinases activity could be helpful to understand better the caries development and prevention mechanisms.

Dentinal proteases, such as gelatinases, are involved in adhesives restoration failure²⁸. In this case, these enzymes would participate of the degradation of collagen fibrils at adhesive layer of dental composite restoration, being therefore, at least, partially responsible for restoration failure^{28,29}. The major studies that report the possibility of participation of the gelatinases in the hybrid layer degradation were done *in vitro* or by using scan electron microscopy^{30,31}. ISZ may allow observing changes in gelatinolytic activity on the resin-dentin interface. This new approach may, therefore, contribute both to understanding the causes of failure in adhesive restorative procedures, and also it will allow a new way to assess potential inhibitors of the degradation of collagen in hybrid layer.

In conclusion, gelatinases from decalcified dentin can be evaluated by *in situ* zymography technique. The results showed that these enzymes keep their activities after

dentin decalcification by EDTA and are differently concentrated in compartments of the dentinal tissue. This method, potentially, will help in the news investigations to understand the roles of gelatinases during teeth development and also in the dentin organic matrix degradation.

References

1. Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000. 2003;31:77-104.
2. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis*. 2004 Nov;10(6):311-8.
3. Arakaki PA, Marques MR, Santos MC. MMP-1 polymorphism and its relationship to pathological processes. *J Biosci*. 2009 Jun;34(2):313-20.
4. Heikinheimo K, Salo T. Expression of basement membrane type IV collagen and type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in human fetal teeth. *J Dent Res*. 1995 May;74(5):1226-34.
5. Caron C, Xue J, Bartlett JD. Expression and localization of membrane type 1 matrix metalloproteinase in tooth tissues. *Matrix Biol*. 1998 Nov;17(7):501-11.
6. Caron C, Xue J, Sun X, Simmer JP, Bartlett JD. Gelatinase A (MMP-2) in developing tooth tissues and amelogenin hydrolysis. *J Dent Res*. 2001 Jul;80(7):1660-4.
7. Hall R, Septier D, Embery G, Goldberg M. Stromelysin-1 (MMP-3) in forming enamel and predentine in rat incisor-coordinated distribution with proteoglycans suggests a functional role. *Histochem J*. 1999 Dec;31(12):761-70.
8. Sahlberg C, Reponen P, Tryggvason K, Thesleff I. Timp-1, -2 and -3 show coexpression with gelatinases A and B during mouse tooth morphogenesis. *Eur J Oral Sci*. 1999 Apr;107(2):121-30.
9. Randall LE, Hall RC. Temperospatial expression of matrix metalloproteinases 1, 2, 3, and 9 during early tooth development. *Connect Tissue Res*. 2002;43(2-3):205-11.
10. Goldberg M, Rapoport O, Septier D, Palmier K, Hall R, Embery G, Young M, Ameye L. Proteoglycans in predentin: the last 15 micrometers before mineralization. *Connect Tissue Res*. 2003;44 Suppl 1:184-8.
11. Bourd-Boittin K, Septier D, Hall R, Goldberg M, Menashi S. Immunolocalization of enamelysin (matrix metalloproteinase-20) in the forming rat incisor. *J Histochem Cytochem*. 2004 Apr;52(4):437-45.
12. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res*. 2006 Jan;85(1):22-32.

13. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol.* 2007 Feb;52(2):121-7.
14. Porto IM, Rocha LB, Rossi MA, Gerlach RF. *In situ* zymography and immunolabeling in fixed and decalcified craniofacial tissues. *J Histochem Cytochem.* 2009 Jul;57(7):615-22.
15. Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Bagnell R, Yamauchi M. Immunohistochemical localization of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin. *Arch Oral Biol.* 2008 Feb;53(2):109-16.
16. Marques MR, dos Santos MC, da Silva AF, Nociti FH Jr, Barros SP. Parathyroid hormone administration may modulate periodontal tissue levels of interleukin-6, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in experimental periodontitis. *J Periodontal Res.* 2009 Dec;44(6):744-50. Epub 2009 May 18.
17. Kupai K, Szucs G, Cseh S, Hajdu I, Csonka C, Csont T, Ferdinandy P. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2010 Mar-Apr;61(2):205-9.
18. Begum F, Zhu W, Namaka MP, Frost EE. A novel decalcification method for adult rodent bone for histological analysis of peripheral-central nervous system connections. *J Neurosci Methods.* 2010 Mar 15;187(1):59-66. Epub 2009 Dec 28.
19. Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol.* 2000 Sep;45(9):757-65.
20. Niu LN, Zhang L, Jiao K, Li F, Ding YX, Wang DY, Wang MQ, Tay FR, Chen JH. Localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. *J Dent.* 2011 Aug;39(8):536-42.
21. Sakuraba I, Hatakeyama J, Hatakeyama Y, Takahashi I, Mayanagi H, Sasano Y. The MMP activity in developing rat molar roots and incisors demonstrated by *in situ* zymography. *J Mol Histol.* 2006 Jan;37(1-2):87-93.
22. Boushell LW, Nagaoka H, Nagaoka H, Yamauchi M. Increased matrix metalloproteinase-2 and bone sialoprotein response to human coronal caries. *Caries Res.* 2011;45(5):453-9. Epub 2011 Aug 26.
23. Dumas J, Hurion N, Weill R, Keil B. Collagenase in mineralized tissues of human teeth. *FEBS Lett.* 1985 Jul 22;187(1):51-5.
24. Satoyoshi M, Kawata A, Koizumi T, Inoue K, Itohara S, Teranaka T, Mikuni-Takagaki Y. Matrix metalloproteinase-2 in dentin matrix mineralization. *J Endod.* 2001 Jul;27(7):462-6.
25. Goldberg M, Septier D, Bourd K, Hall R, George A, Goldberg H, Menashi S. Immunohistochemical localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in the forming rat incisor. *Connect Tissue Res.* 2003;44(3-4):143-53.

26. Fanchon S, Bourd K, Septier D, et al. Involvement of matrix metalloproteinases in the onset of dentin mineralization. *Eur J Oral Sci* 2004;112:171–6.
27. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res*. 1998 Aug;77(8):1622-9.
28. Hashimoto M, Tay FR, Ohno H, Sano H, Kaga M, Yiu C, Kumagai H, Kudou Y, Kubota M, Oguchi H. SEM and TEM analysis of water degradation of human dentinal collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2003 Jul 15;66(1):287-98.
29. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res*. 2004 Mar;83(3):216-21.
30. Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L, Visintini E, Cadenaro M, Tay FR, De Stefano Dorigo E, Pashley DH. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dent Mater*. 2010 Jun;26(6):571-8. Epub 2010 Mar 17.
31. Chlorhexidine preserves dentin bond *in vitro*. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldini S, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L. *J Dent Res*. 2007 Jan;86(1):90-4.
32. Goldberg M, Septier D, Bourd K, Hall R, Jeanny JC, Jonet L, Colin S, Tager F, Chaussain-Miller C, Garabédian M, George A, Goldberg H, Menashi S. The dentino-enamel junction revisited *Connect Tissue Res*. 2002;43(2-3):482-9.

FIGURES

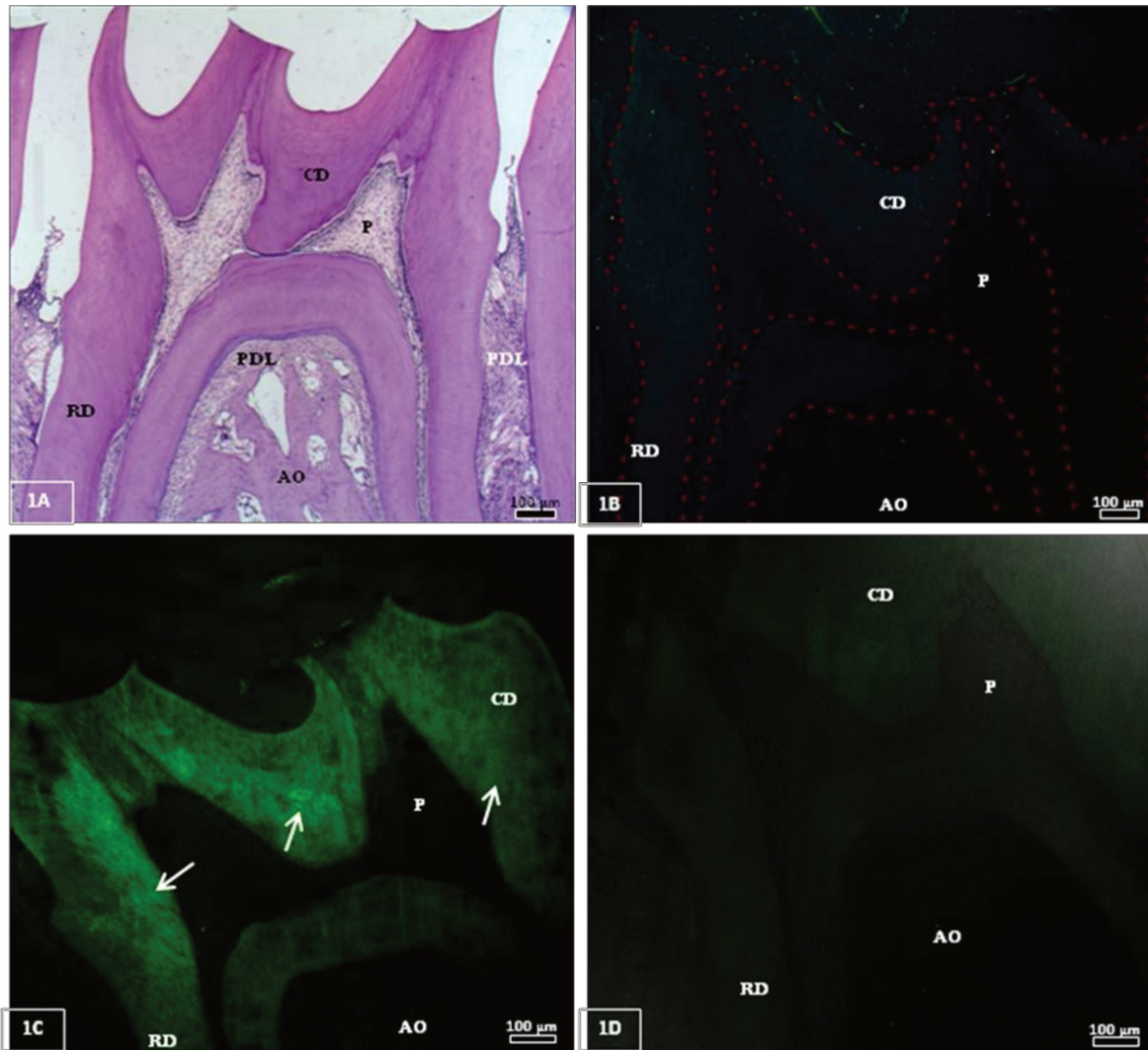


Figure 1. Photomicrographs of longitudinal slices from molar teeth representing: **1A** - H&E stain, **1B** - negative control for *in situ* zymography (ISZ), **1C** – ISZ and **1D** - ISZ with 1,10 phenantroline (MMP inhibitor). White arrows in **1C** indicate fluorescence caused by gelatinases activity. A little of dentin autofluorescence is evidenced in **1D**. Partial gelatinases activity inhibition can be checked comparing **1D** (white arrows) with **1B**, **1C** and **1D** were done with the same confocal microscopy calibration. **P**: pulp tissue. **CD**: dentin of the tooth crown, **RD**: dentine of the tooth root, **AO**: alveolar bone between tooth roots, **PDL**: periodontal ligament.

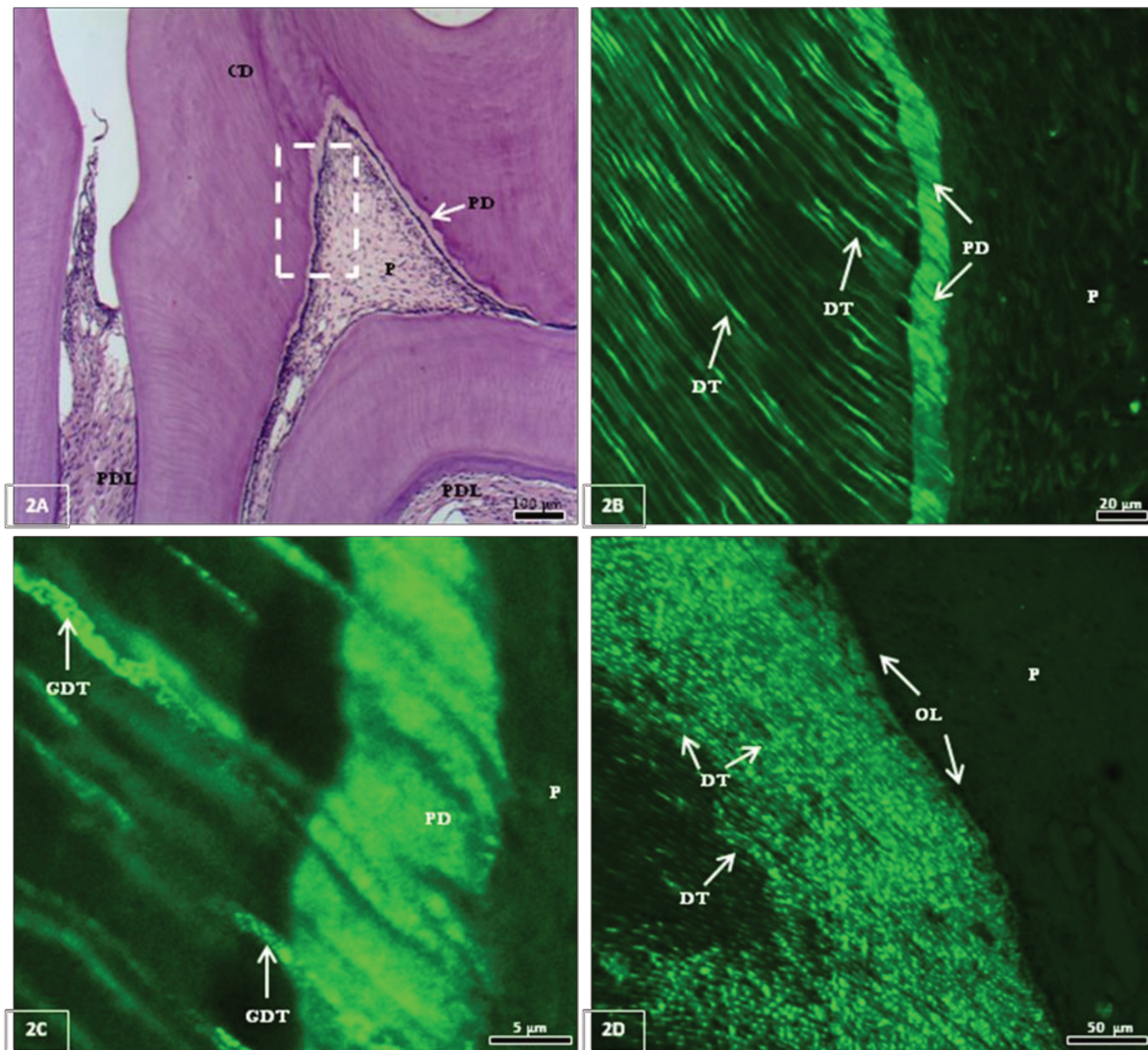


Figure 2. Photomicrographies of longitudinal slices from molar teeth representing: **2A** - H&E stain, **2B**, **2C** and **2D** - *in situ* zymography (ISZ). The photomicrographies **2B**, **2C** and **2D** were done in an area similar as indicated in the dotted rectangle drawled in **2A**. The figure **2C** represents high magnificence image from part of figure **2B**. Fluorescence caused by gelatinases activity is shown in **2B** and **2C** by dental tubules (DT) and by predentin (PD). And **2D** by dental tubules in an oblique dentin slice. GDT: granules in the dental tubules, P: pulp tissue, CD: dentin of the tooth crown; PDL: alveolar bone between tooth roots, PDL: periodontal ligament, OL: odontoblasts layer.

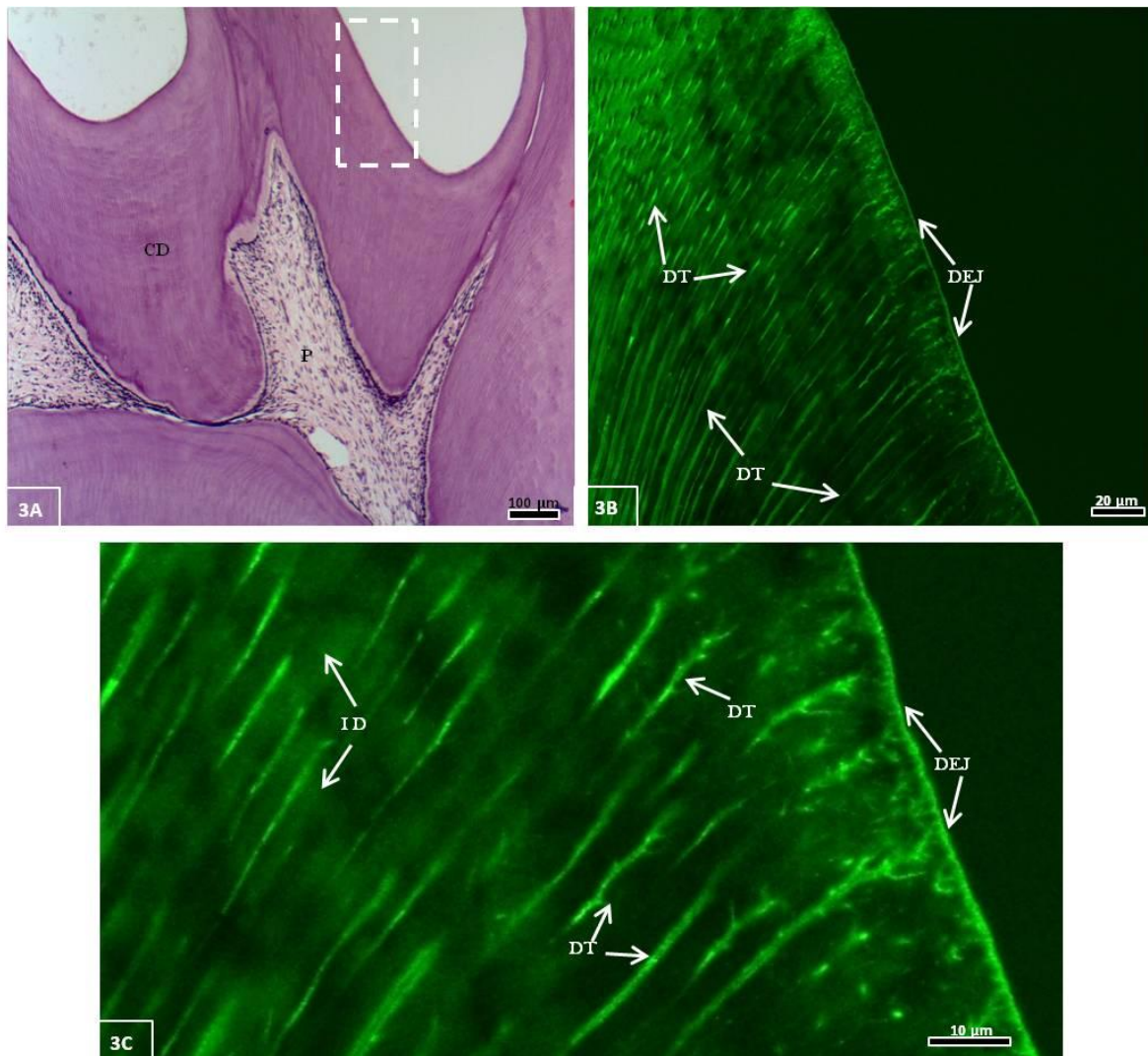


Figure 3. Photomicrographies of longitudinal slices from molar teeth representing: **3A** - H&E stain, **3B** - *in situ* zymography (ISZ), photomicrographie done in an area similar as indicated in the dotted rectangle drawled in **3A**. The figure **3C** represents high magnificence image from part of **3B** image. Fluorescence caused by gelatinolytic activity is shown in **3B** by the dental enamel junction (**DEJ**) and by the deninal tubules (**DT**), in **3C** by the **DT**, **DEJ** and intertubular dentin (**ID**). **P**: pulp tissue. **CD**: dentin of the tooth crown.

4 CONCLUSÃO

Por meio da técnica de zimografia *in situ*, foi possível mapear a atividade de gelatinases em dentina descalcificada de molares de ratos. Tal atividade pôde ser detectada em diferentes regiões deste tecido, as quais demonstraram diferentes padrões de atividade gelatinolítica.

REFERÊNCIAS¹

- Arakaki PA, Marques MP, Santos MCLG. MMP-1 polymorphism and its relationship to pathological processes. *J Biosci.* 2009; 34(2): 313-20.
- Boushell LW, Nagaoka H, Nagaoka^b H, Yamauchi. Increased Matrix Metalloproteinase-2 and bone sialoprotein response to human coronal caries. *Caries Res.* 2011; 45: 453-9.
- Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Yamauchi M. Distribution and relative activity of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin. *J Oral Sci.* 2011; 3: 192-9.
- Carrilho MRO, Carvalho RM, Goes MF, Hipólito VD, Geraldewli S, Tay FR. *et al.* Chlorhexidine preserves dentin bone in vitro. *J Dent Res.* 2007; 86(1): 90-4.
- Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjäderhane L, Mazzoni A. *et al.* Wiley interscience. 2008, Host-derived loss of dentin Matrix Stiffness Associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 90(1): 373-80.
- Coimbra LS. Influência de drogas antiplaquetárias na reparação da doença periodontal experimental em ratos [dissertação]. Araraquara: UNESP/Faculdade de Odontologia de Araraquara; 2010.
- Fisher LW, Fedarko NS. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res.* 2003; 44: 33-40.
- Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro J, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in oral environment. *Acta Odontol Scand.* 2007; 65: 1-13.
- Navarro VP, Nelson Filho P, Silva LAB, Freitas AC. A participação das metaloproteinases nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. *Rev Odontol UNESP.* 2006; 35(4): 233-8.
- Niu LN, Zhang L, Jiao K, Li F, Ding YX, Wang DY. *et al.* Localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. *J Dent.* 2011; 39: 536-42.
- Nonaka CFW. Expressão imunohistoquímica de collagenase-1 e gelatinases A e B em mixomas odontogênicos e papilas de germes dentários [tese]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2006.

¹ De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri A Jr *et al.* Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: Correlative FEI-SEM/TEM analysis. *J Biomed Mater Res A*. 2009; 88(3): 697-703.

Polasaari H. Matriz. metalloproteinases (MMPs) and their specific tissue inhibitors (TIMPs) in mature human odontoblasts and pulp tissue. The regulation of expressions of fibrillar collagens, MMPs and TIMPs by growth factors, transforming growth- β 1 and bone morphogenetic protein-2(BMP-2) [dissertação]. Oulu: University of Oulu; 2003.

Polassari H, Pennongton CJ, Lamas MDRE, Tjäderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature odontoblasts and pulp tissue. *Eur Oral J Sci*. 2003; 111(2): 117-27.

Porto I, Rocha LB, Rossi M, Gerlach R. In situ Zymography and imunolabeling in fixed and decalcified craniofacial tissue. *J Histochem*. 2009; 57: 615.

Stamenkovic I. Extracelular matriz remodeling: the role of matriz metalloproteinase. *J Pathol*. 2003; 200: 448-64.

Ten Cate, Nanci A. Histologia oral desenvolvimento, estrutura e função. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

ANEXOS

ANEXO 1. COMITE DE ÉTICA ANIMAL



Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Estudo da atividade de gelatinases em dentina sadia de molares de ratos, por meio da técnica de zimografia *in situ*" (protocolo nº 2569-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques / Juliana Isabelita Cyrino Pessoa, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 12 de dezembro de 2011.

Campinas, 12 de dezembro de 2011.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO 2: COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

De: "Archives of Oral Biology" <AOB@elsevier.com>
Data: Seg, Fevereiro 6, 2012 6:54 pm
Para: marques.mr@fop.unicamp.br
Prioridade: Normal
Opções: [Ver cabeçalho completo](#) | [Ver Versão para Impressão](#) | [Baixar como um arquivo](#)

Archives of Oral Biology

Title: In situ study of the gelatinases activity in dentin from molar teeth.

Authors: Juliana Isabelita C Pessoa, Ms; Naiana V Viola, PhD Student; Gustavo N Guimarães, PhD Student; Wander J da Silva, Professor; Ana Paula de Souza, Professor; Leo Tjäderhane, Professor; Sergio R Line, Professor; Marcelo Rocha Marques, Ph.D

Article Type: Original Paper

Dear Marcelo Marques,

Your submission entitled "In situ study of the gelatinases activity in dentin from molar teeth." has been received by Archives of Oral Biology.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/aob/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal. Please do not hesitate to contact me if you have any queries.

Kind regards,

(On behalf of the Editors)

Archives of Oral Biology