

*Este exemplar foi devidamente
confirado conforme resolução CCPG/036/85
Piracicaba 27/03/96*

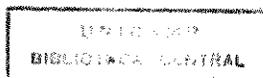
Seif
RICARDO DELLA COLETTA

**CARACTERIZAÇÃO DAS METALOPROTEINASES
ASSOCIADAS AO DESENVOLVIMENTO DO GERME
DENTAL DO PRIMEIRO MOLAR DE RATOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Odontologia na Área de Biologia e Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

PIRACICABA-SP

-1996-



RICARDO DELLA COLETTA

**CARACTERIZAÇÃO DAS METALOPROTEINASES
ASSOCIADAS AO DESENVOLVIMENTO DO GERME
DENTAL DO PRIMEIRO MOLAR DE RATOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Odontologia na Área de Biologia e Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO ROBERTO PERES LINE

PIRACICABA-SP

-1996-



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Mestrado, em sessão pública realizada em 22/03/96, considerou o candidato aprovado.

1. Sérgio Roberto Peres Line

2. Gregório Santiago Montes

3. Silvio Sanches Veiga

Handwritten signature of Sérgio Roberto Peres Line, written in cursive and underlined.

Handwritten signature of Gregório Santiago Montes, written in cursive and underlined.

Handwritten signature of Silvio Sanches Veiga, written in cursive and underlined.

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais, OSWALDO E APARECIDA, que
atentos acompanharam cada passo da minha vida.**

À MÁRCIA,

pelo incentivo e apoio constantes.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Frab Norberto Boscolo, coordenador geral dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, coordenador do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

Aos Profs. do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida, responsável pela Área de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela competência e segurança que sempre nos orientou.

Aos Profs. Drs. Lourenço Bozzo e Mário Roberto Viziole, pelo exemplo de dedicação à vida acadêmica.

Aos Profs. e Amigos Jacks Jorge Junior, Márcio Ajudarte Lopes, Alexandre Augusto Zaia e Edgard Graner, pelo companherismo, estímulo e apoio constantes.

Aos colegas da Disciplina de Patologia Maria Helena de Vasconcelos Peron, Ana Cristina do Amaral Godoy, Rosa Maria Fornasier e Adriano Luis Martins, pela rica convivência e apoio indispensável durante a realização deste trabalho.

Aos colegas de turma do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental.

Ao Prof. Dr. SÉRGIO ROBERTO PERES LINE,
pelos ensinamentos científicos e humanos e
amizade com que orientou este trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Glossário	01
Resumo	03
Introdução	05
Proposição	08
Revisão da Literatura	10
Material e Métodos	20
Resultados	25
Discussão	42
Conclusões	52
Summary	54
Referências Bibliográficas	56

GLOSSÁRIO

GLOSSÁRIO

EDTA -Ácido Etilenodiamino Tetracético

NEM - N- Etilmaleimida

PMSF - Fluoreto de Fenilmetilsufonil

TRIS - Tris-hidroximetil aminometano

RESUMO

RESUMO

A participação das metaloproteínas durante o desenvolvimento dental ainda não está bem estabelecida. Neste trabalho foram realizados estudos no intuito de caracterizar e determinar o sítio principal de atuação dos grupos de metaloproteínas associadas ao germe dental do primeiro molar em desenvolvimento. Verificou-se a presença de enzimas gelatinolíticas e caseinolíticas com comportamento, quanto à ação de inibidores específicos, ação colagenolítica e peso molecular, semelhante ao das enzimas pertencentes ao grupo das metaloproteínas. A análise nos diversos períodos do desenvolvimento do germe dental mostrou que a maturação dental é acompanhada por um aumento na secreção dessas proteínas. Quando analisado o sítio de atuação dessas metaloproteínas, observou-se maior ação gelatinolítica na papila dental quando comparado com o órgão do esmalte. A ação caseinolítica foi maior no órgão do esmalte. Estes resultados indicam que enzimas pertencentes ao grupo das metaloproteínas estão associadas ao desenvolvimento e crescimento do órgão dental. A presença de caseínases, principalmente no órgão do esmalte, pode estar relacionada ao processo de mineralização dental.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A matriz extracelular é uma estrutura biologicamente ativa formada por duas classes de macromoléculas: polissacarídeos e proteínas. O primeiro grupo, é formado pelos glicosaminoglicanos que, usualmente, apresentam-se complexados a um core protéico, na forma de proteoglicanos. Os componentes fibrosos são divididos em dois grupos, componentes estruturais (por exemplo, colágeno e elastina) e componentes adesivos (fibronectina e laminina). Além de servir como suporte para as células, a matriz extracelular também exerce influência no desenvolvimento, migração, polarização, proliferação, forma e funções metabólicas das células (Alberts et al., 1989).

O desenvolvimento do germe dental é acompanhado de uma rápida degradação e remodelação das macromoléculas da matriz extracelular. Esta degradação e remodelação está associada com o crescimento e desenvolvimento do órgão dental e parece ser feita pelas metaloproteinases (Thesleff et al., 1981). As metaloproteinases têm uma participação importante na remodelação tecidual durante o desenvolvimento embrionário e em outras condições onde a matriz extracelular é remodelada. Embora muitas sejam as evidências do papel das metaloproteinases no desenvolvimento do germe dental, a literatura sobre o assunto é bastante restrita.

Sahlberg et al. (1992) observaram através de análises de hibridização “in situ” para gelatinase de 72 kDa que a expressão do gene, nos estágios iniciais (fase de botão), era positiva em toda extensão da papila dentária. Após três dias, com a diferenciação dos odontoblastos, houve um aumento na expressão, principalmente nas regiões formadoras de cúspides. Na área do epitélio do órgão do esmalte, em todos os estágios do desenvolvimento, a expressão de gelatinase de 72 kDa foi negativa. Breckon et al. (1995) obtiveram resultados semelhantes em estudo da expressão de gelatinase de 72 e 92 kDa e TIMP nos sítios de mineralização da região craniofacial de coelhos, através de análises imunohistoquímicas. Estes autores observaram um aumento na expressão de gelatinases durante a odontogênese e a associação com o desaparecimento da membrana basal dental interna. Desta forma, foi sugerido que as gelatinases de 72 e 92 kDa desempenham papel importante na remodelação da membrana basal, principalmente do colágeno tipo IV.

Fukae et al. (1991), através de análises em eletroforese de gel de poliacrilamida, identificaram a existência de diversas enzimas com atividades gelatinolíticas, durante o processo de mineralização da dentina. No intuito de caracterizar estas proteinases em componentes do grupo das metaloproteinases, fizeram uso de inibidores de metaloproteinases, EDTA (quelante de íons bivalentes), 1,10-fenantrolina (quelante de íons bivalentes) e PMSF, e analisaram a influência do pH na atividade proteolítica. Estes autores concluíram que as enzimas exibiram comportamento semelhante àquelas pertencentes ao grupo das metaloproteinases.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi analisar e caracterizar as metaloproteinases associadas ao germe dental do primeiro molar de ratos, através de técnica zimográfica, durante os diversos períodos de formação do órgão dental, e determinar o sítio principal de atuação desse grupo de enzimas.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

GERME DENTAL

Quando o embrião humano atinge a sexta semana de vida, células do ectoderma oral proliferam mais rapidamente que as células das áreas adjacentes. Essa proliferação leva à formação da lâmina dentária. A formação do germe dental pode ser dividida em três estágios: de botão, de capuz e de campânula, embora alguns autores dividam a formação do germe dental em mais uma fase, fase de campânula avançada.

Fase de Botão

Nesse estágio, as células epiteliais mostram pouca ou nenhuma diferenciação. A proliferação celular resulta em um aumento de volume e tamanho da lâmina dentária.

Fase de Capuz

Conforme o botão de células continua a proliferar, a densidade da área aumenta, levando as células do germe dental a adquirirem uma forma grosseira de capuz, o qual é caracterizado por uma invaginação pouco profunda das células epiteliais.

Durante o estágio de capuz começa a diferenciação celular. No órgão do esmalte, as células mais periféricas são denominadas epitélio externo do órgão do esmalte. As células da concavidade do capuz são denominadas células do epitélio interno do órgão do esmalte. As células no interior do órgão do esmalte são células poligonais, que adquirem forma de estrela e se dispõem na forma de rede. São denominadas células do retículo estrelado. A principal função do retículo estrelado é fornecer nutrientes para o epitélio interno e externo do órgão do esmalte. As células em proliferação localizadas no interior da invaginação são denominadas células da papila dentária. A papila dentária é o órgão formador da dentina, através da diferenciação dos odontoblastos, e da polpa. Concomitantemente ao desenvolvimento do órgão do esmalte e da papila dentária, surge uma condensação de células nas margens do epitélio externo que originará o folículo dentário. As células do folículo dentário darão origem ao ligamento periodontal, osso alveolar e cimento dental.

Fase de Campânula

Nessa fase, a invaginação do órgão do esmalte se aprofunda e o germe dental adquire uma forma de campânula de sino. Antes que as células do epitélio interno se diferenciem em ameloblastos e comecem a secretar matriz do esmalte, células da periferia da papila dentária se diferenciam em odontoblastos e começam a sintetizar pré-dentina, que é matriz orgânica da dentina. É composta basicamente por colágeno tipo I, glicosaminoglicanos e algumas glicoproteínas.

A formação da raiz do germe dental só se inicia após a formação do esmalte e da dentina da junção cimento-esmalte. A orientação da raiz é dada pela bainha epitelial de Hertwig. A bainha epitelial consiste de duas camadas de células: uma proveniente do epitélio interno (células cubóides) e outra proveniente do epitélio externo (células achatadas). A raiz dental é recoberta por cimento. O cimento é uma matriz mineralizada sintetizada pelos cementoblastos. Duas formas de cimento são conhecidas, i-e, celular e acelular. A diferença fundamental entre essas duas formas é que o cimento acelular não apresenta células incluídas na matriz mineralizada e está localizado na porção cervical da raiz. O cimento celular está localizado na porção apical da raiz.

A mineralização das estruturas dentais é um fenômeno complexo e distinto para o esmalte e dentina. A mineralização do esmalte é dividida em dois estágios. No primeiro estágio, ocorre a mineralização imediata e parcial dos segmentos da matriz, conforme vão sendo secretadas. No segundo estágio, a mineralização é gradual e progride até a completa mineralização (estágio de maturação). Essa mineralização inicia-se nas cúspides da coroa e progride apicalmente. A deposição de cristais de apatita é acompanhada de uma reabsorção das proteínas do esmalte, principalmente amelogenina, por proteases específicas (Robinson et al., 1978). A mineralização da dentina é iniciada logo após a síntese da matriz orgânica. Essa mineralização é gradual e contínua.

METALOPROTEINASES

Com o surgimento dos organismos multicelulares, houve a necessidade do desenvolvimento de uma matriz intercelular capaz de unir as células e servir de arcabouço. A matriz extracelular participa de muitos fenômenos celulares como diferenciação e crescimento. Esta matriz está constantemente sendo sintetizada e degradada. Membros das famílias das metaloproteinasas e dos ativadores de plasminogênio são os principais reguladores da degradação da matriz extracelular (Bikerdal-Hansen, 1993).

As metaloproteinasas compreendem uma família de enzimas que apresentam especificidades pelas macromoléculas da matriz extracelular. A família das metaloproteinasas é formada por pelo, menos nove, membros que exibem similaridades estruturais e funcionais. Todas as metaloproteinasas são secretadas na forma de um zimógeno ou como um complexo enzima inibidor (Emonar e Grimaud, 1990), sendo que sua ativação se dá em duas etapas. Inicialmente o zimógeno sofre clivagem proteolítica que resulta na remoção da porção amino-terminal. A clivagem pode ser feita por várias enzimas como a tripsina, plasmina, catepsina B e elastase. Numa segunda etapa, a enzima sofre autodigestão que resulta na sua forma ativada (Van Wart e Birkedal-Hansen, 1990). Acredita-se que a ativação é causada pela ruptura da ponte existente entre o aminoácido cisteína e o íon zinco, que bloqueia o sítio ativo da molécula. Outra característica comum entre as metaloproteinasas é a dependência do íon zinco e do íon cálcio. A interação do zinco com dois resíduos de histidina

presentes no domínio catalítico da molécula tem importância crucial para o funcionamento adequado das metaloproteinases. Os dois átomos de cálcio conferem uma estabilidade para a estrutura terciária da proteína (Dioszegi et al., 1995).

As metaloproteinases desempenham papel importante em vários processos fisiológicos e patológicos, como na involução pós-parto (Weeks et al., 1976; Souza et al., 1976), na reabsorção óssea (Shapiro et al., 1993 e Okada et al., 1995), na inflamação através da migração leucocitária (Knauper et al., 1993), na osteoartrite (Woessner, 1994 e Vijaykumar et al., 1995), na doença periodontal (Biekedal-Hansen, 1993), no crescimento e expansão de tumores benignos (Autio-Hermainen et al., 1993) e na invasão e metástase (Declerck et al., 1992).

Têm-se dividido as metaloproteinases em três subclasses: collagenases intersticiais, gelatinases e estromelisinases. Esta subclassificação baseia-se na especificidade ao substrato. Esta classificação tem sido contestada por alguns autores, pois embora satisfatória para o grupo das collagenases, todas elas apresentando especificidades ao colágeno tipo I, II e III, é insatisfatória ao grupo das gelatinases, também chamadas de collagenases tipo IV. Isto se deve ao fato de que as estromelisinases também digerem colágeno tipo IV. Os outros dois componentes da família das metaloproteinases são menos estudados e caracterizados: elastase de macrófago (Banda e Werb, 1981) e PUMP (Quantin et al., 1989).

Dentre as metaloproteinases as collagenases intersticiais são as mais específicas. Foram as primeiras a serem descritas em 1962 e, durante as últimas décadas, têm sido objeto de muitos estudos que versam desde sua

expressão e distribuição, estrutura química e molecular, até participação em processos normais e patológicos. Estas enzimas são as únicas com capacidade de clivar as triplas hélices dos colágenos tipo I, II, III em condições fisiológicas, tornando estas moléculas susceptíveis à ação de outras enzimas (Souza et al., 1993). Existem dois tipos de collagenases intersticiais que, apesar de exibirem grande semelhança estrutural e de especificidade, são codificadas por genes distintos. A do primeiro tipo, que exibe uma distribuição ambígua, é sintetizada por fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, macrófagos, osteoblastos, condrócitos e osteoclastos (Bikedal-Hansen, 1993). Quando analisada em eletroforese de gel de poliacrilamida a collagenase de fibroblastos aparece como várias bandas com peso molecular variando entre 57 e 52 kDa. Esta variação provavelmente se deve à proteólise parcial da molécula. A do segundo tipo é produzida exclusivamente por leucócitos polimorfonucleares. Apesar de possuir um núcleo protéico muito semelhante à collagenase de fibroblastos, a alta taxa de glicosilação faz com que esta molécula possua um peso molecular de 75 kDa. Ao contrário da collagenase de fibroblastos, que é rapidamente secretada após a sua síntese, a collagenase de polimorfonucleares é armazenada em grânulos intracelulares que só são liberados após a ativação das células (Hibbs e Bainton, 1989). Existem também as collagenases bacterianas que, clivam as cadeias alfa do colágeno nos inúmeros sítios ricos no aminoácido glicina. Elas são muito utilizadas em laboratórios devido a sua grande especificidade a tripla hélice da molécula do colágeno.

As gelatinases são enzimas capazes de clivar a região helicoidal do colágeno tipo IV em dois fragmentos proporcionais a $\frac{1}{4}$ e $\frac{3}{4}$ do tamanho da molécula (Murphy et al., 1989). Estas enzimas também são capazes de degradar colágeno tipo V e VII, elastina e gelatina (colágeno desnaturado). A gelatinase de 72 kDa parece ser capaz de clivar também o colágeno tipo X (Welgus et al., 1990), porém, não é ativa sobre o colágeno tipo I, II e III, laminina e proteoglicanos. A especificidade dessas enzimas sobre o colágeno tipo IV parece indicar que elas participam da remodelação e degradação da membrana basal. É também possível que a atividade galatinolítica dessas enzimas esteja relacionada com a remoção de fragmentos de colágeno desnaturado que sofreram ação de outras metaloproteinases (Reponen et al., 1992 e Reponen et al., 1994).

A gelatinase de 72 kDa é, talvez, a metaloproteinase mais abundante, sendo secretada por fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, macrófagos, osteoblastos e condrócitos, estando também presente no plasma sanguíneo (Birkedal-Hansen, 1993). A gelatinase de 92 kDa é produzida por neutrófilos polimorfonucleares, queratinócitos e macrófagos, e, ocasionalmente, por fibroblastos. Estudos por hibridização "in situ" têm demonstrado que as gelatinases de 92 kDa são fortemente expressas nos tecidos, embrionários de ratos (Reponen et al., 1994).

O terceiro grupo de metaloproteinases é formado pelas estromelisinases. As estromelisinases dos tipos 1 e 2 são capazes de digerir várias proteínas da matriz extracelular como a laminina, fibronectina, proteoglicano (core protéico), colágeno tipo IV, V, VII e X, colágeno desnaturado (gelatina) e caseína (Chin et al., 1985). A estromelisinase 1 é expressa por várias células

do estroma conjuntivo quando induzidas por fatores do crescimento e citocinas (IL-1, EGF, TNF- α e PDGF) (MacNaul et al., 1990 e Ken et al., 1988), e, quando analisada em gel de poliacrilamida, apresenta um peso molecular entre 60 e 53 kDa. Esta enzima parece não ser expressa por leucócitos ou queratinócitos. A estromelina 2 é expressa em menor quantidade e, aparentemente, pelas mesmas células que expressam estromelina 1. Apresenta um peso molecular semelhante à estromelina 1. Parece não responder a fatores de crescimento (Birkedal-Hansen, 1993).

A regulação da atividade proteolítica das metaloproteinases ocorre a nível extracelular através da ação de uma enzima inibidora específica de tecidos, a TIMP (inibidor tecidual de metaloproteinase). Dois membros da família TIMP: TIMP-1 e TIMP-2, já foram caracterizados (Herron et al., 1986). Estes inibidores estão distribuídos pelos tecidos e fluidos e são secretados por diversos tipos celulares, incluindo fibroblastos, neutrófilos polimorfonucleares, células endoteliais, condrócitos e células neoplásicas.

O mecanismo de ação da TIMP é complexo, e envolve numerosos pontos de interação com as metaloproteinases. O evento principal parece ser resultado da ligação ao domínio catalítico N-terminal, do sítio ativo da metaloproteinase (Murphy et al., 1994). TIMP-1 parece ser mais efetivo na regulação das collagenases, enquanto que TIMP-2 é mais efetivo com o grupo das gelatinases (Howard et al., 1991).

Tabela com os membros da família das metaloproteinases com respectivos, peso molecular e substratos.

ENZIMAS	ABREV.	PM (kDa)	SUBSTRATO
Colagenase de fibroblastos	MMP-1	57/52	Colágeno tipo I, II, III VII, VIII, X e gelatina
Colagenase de PMN	MMP-8	75	Colágeno tipo I, II, III VII, VIII, X e gelatina
Estromelisina-1	MMP-3	60/55	Fibronectina, Laminina, Elastina Colágeno tipo IV, V, IX, X, Proteoglicanos e Caseína
Estromelisina-2	MMP-10	60/55	Fibronectina, Laminina, Elastina Colágeno tipo IV, V, IX, X, Proteoglicanos e Caseína
Estromelisina-3	MMP-11	—	—
Gelatinase A	MMP-2	72	Gelatina, Fibronectina, Elastina Colágeno tipo IV, V, VII, X
Gelatinase B	MMP-9	92	Gelatina, Elastina, Colágeno tipo IV, V
Matrilisina	MMP-7	28	Fibronectina, Laminina, Elastina, Proteoglicanos, Colágeno tipo IV
Metaloelastase de macrófagos	MMP-12	55	Elastina

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Germes dentais dos primeiros molares da maxila e mandíbula de ratos Wistar recém-nascidos e com 01, 03, 05, 07, 10 e 15 dias após o nascimento foram usados para análises bioquímicas. Grupos de 03 animais foram sacrificados por decapitação, e os primeiros molares da maxila e mandíbula removidos cuidadosamente sob lupa.

EXTRAÇÃO DAS METALOPROTEINASES

As metaloproteinases foram extraídas segundo o protocolo modificado de Robinson et al, 1992. Os germes dentais foram homogeneizados em tampão contendo 0,25% Triton X-100, 10 mM CaCl₂, 2 mM PMSF e 2mM NEM pH 7,4 a 4 °C e centrifugados 20 min a 6000g. O precipitado foi ressuspensão no mesmo tampão e centrifugado novamente. As metaloproteinases foram extraídas com tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM CaCl₂, 2 mM PMSF e 2mM NEN por 30 min a 40 °C. O extrato foi aliquoteado e armazenado em freezer -20 °C.

ANÁLISE DAS METALOPROTEINASES

a) Zimograma.

Extrato de germe dental (0,4 ug, concentração protéica determinada método de Bradford) foi incubado com tampão de amostra (2 % SDS; 125

mM Tris-HCl pH 6,8; 10 % glicerol; 0,001 % azul de bromofenol) e submetido a eletroforese em gel 10 % e 12 % de poliacrilamida (Laemmli, 1970) contendo 1,6 mg/ml e 0,5 mg/ml de gelatina e caseína, respectivamente. Após eletroforese, o gel foi lavado duas vezes por 20 min em solução aquosa de 2 % Triton X-100 e incubado em tampão 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 5mM CaCl₂ por 16 h a 37 °C (Heussen and Dowdle, 1980). A seguir, o gel foi corado com Coomassie blue (0,05 %). As proteínas com atividades gelatinolíticas e caseinolíticas foram observadas como bandas negativas. O gel foi “escaneado” em um densitômetro Bio Rad modelo GS-700 e analisado no software análise molecular (Bio Rad).

b) Ensaio de inativação das metaloproteinases.

As amostras de extrato de germe dental foram submetidas a eletroforese e lavadas nas mesmas condições mencionadas anteriormente; em seguida, foram incubadas por 16 h a 37 °C em tampão Tris-HCl/CaCl₂ contendo um dos seguintes inibidores de proteinases: 0,5 mM 1,10-fenantrolina (Sigma Chem. Co., St Louis, MO), 0,5 mM EDTA, 0,5 mM PMSF (Sigma). Posteriormente, o gel foi corado com Coomassie blue (0,05 %) por 4 h e descorado em solução 50 % metanol e 10 % ácido acético.

c) Efeito do pH na atividade enzimática.

Após eletroforese, os geis foram lavados e incubados por 16 h em tampão 10 mM Tris-HCl e 5 mM CaCl₂ com o pH variando de 7,0 a 10,0 e em tampão 50 mM acetato de sódio e 5 mM CaCl₂ para os pHs 5.0 e 6.0.

ENSAIO DE DEGRADAÇÃO DO COLÁGENO

a) Extração e Purificação do Colágeno tipo I.

O colágeno foi extraído segundo o protocolo modificado de Guis et al., 1973. Resumidamente, caudas de quatro ratos Wistar foram seccionadas na raiz e o couro, que a envolvia, removido. Após a remoção do couro, os tendões foram homogeneizados em tampão contendo 0,45 M NaCl e centrifugados por 5 min a 2000 g. O precipitado foi ressuspensão no mesmo tampão e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em 100 ml de 0,2 M NaCl e centrifugado por 5 min a 2000g. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. A extração do colágeno foi realizada com tampão contendo 0,5 M ácido acético por 15 h a 4 °C. O extrato foi centrifugado e o sobrenadante dializado extensivamente contra água deionizada a 4 °C. Em seguida, o colágeno foi liofilizado para estocagem.

b) Degradação analisada por eletroforese.

Ativação das metaloproteínases: Alíquotas de extrato de germe dental contendo atividade gelatinolítica foram tratadas com tampão Tris-HCl pH 8,0 acrescido de 5 mg/ml tripsina por 20 min a 37 °C. Após ativação, adicionou-se inibidor de tripsina na concentração final de 400 ug/ml e 1,0 mM PMSF, Stricklin et al., (1983). Ao extrato ativado foi adicionado 20 ul de colágeno (1,0 ug/ml) e 10 ul tampão 1,0 M Tris-HCl pH 9,1. Incubou-se a mistura a 37 °C por 30 min. A ação das metaloproteínases foi terminada pela adição de tampão de amostra em condições redutoras acrescido de 0,5 mM EDTA, em igual volume, e fervido por 5 min. Os

produtos da clivagem foram analisados em gel de poliacrilamida 7,5 % (Okada et al., 1992). Comassie blue (0,5 %) foi usado como corante para análise das bandas protéicas.

c) Degradação analisada por marcação com o corante “Sirius Red”.

Alíquotas de 50 ul colágeno tipo I diluído em 0,5 M ácido acético (1,6 ug/ul) foram plaqueadas em “Microtiter Wells”, em duplicatas, e deixadas a 4 °C por 16 h. Em seguida, lavadas três vezes por 5 min com TBS e adicionou-se 20 ul de extrato de germe dental ativado por tripsina, que foi mantido por 30, 45, 60 e 90 min a 37 °C. A ação das metaloproteinasas terminou após lavagem com TBS e adição do corante “Sirius Red” por 1 h. A seguir, a amostra foi lavada com 0,01 N HCl por 1 min e o corante eluído por 1 h com 0,1 M NaOH. Absorbância foi lida em 490 nm no aparelho Microplate Reader Model 450- BioRad, segundo o protocolo modificado de Walsh et al., 1992.

LOCALIZAÇÃO DAS METALOPROTEINASES

Os germes dentais de ratos com 10 dias após o nascimento foram removidos e a papila dental e o órgão do esmalte separados cuidadosamente sob lupa. Em seguida, as porções separadas foram homogeneizadas em tampão de extração de metaloproteinasas. As proteases extraídas foram analisadas em zimograma.

RESULTADOS

RESULTADOS

Quando o extrato de germe dental foi analisado em eletroforese de gel de poliacrilamida, contendo gelatina como substrato, e a seguir incubado por 16 h em tampão Tris-HCl contendo íons cálcio, três bandas negativas foram detectadas. O peso molecular estimado em 65, 63, 55 kDa. Contudo, quando o extrato foi incubado em tampão Tris-HCl na ausência de íons cálcio, apenas a banda de 55 kDa pôde ser observada (fig. 1).

A análise em diversos períodos do desenvolvimento do germe dental mostrou que a maturação dental é acompanhada por um aumento na secreção de proteinases. Essas proteinases apresentaram um peso molecular semelhante ao da collagenase de fibroblastos, entre 57 e 52 kDa (Bikerdal-Hansen, 1993) (fig. 2a). A análise densitométrica do gel co-polimerizado com gelatina confirmou a observação anterior (fig. 2b). No intuito de caracterizar essas proteinases em componentes do grupo das metaloproteinases, acrescentou-se, ao tampão de incubação, um dos seguintes inibidores de proteinases: EDTA, PMSF e 1,10-fenantrolina. A atividade enzimática foi parcialmente inibida com 0,5 mM EDTA e completamente inibida com 0,5 mM 1,10-fenantrolina, mas não com 0,5 mM PMSF (fig. 3).

A influência do pH sob a atividade do extrato foi analisada após eletroforese de gel de poliacrilamida polimerizado com gelatina. A atividade

enzimática foi observada com o pH variando entre 7,0 e 9,0. O máximo de atividade foi observado com o pH 8,0 (fig. 4).

A associação maturação e secreção de metaloproteinasas pelas células do órgão dental também foi analisada em eletroforese de gel de poliacrilamida co-polimerizado com caseína. Diversas bandas negativas, com atividades caseinolíticas, foram detectadas. O peso molecular das bandas principais foi estimado em 47, 32, 29 e 25 kDa (fig. 5a). Não foi observado a secreção dessas proteinasas nos períodos de 0 e 1 dia após o nascimento. A máxima secreção foi observada no período de 10 dias após o nascimento. A análise densitométrica, mostrou um aumento na produção enzimática até o período de 10 dias, e um decréscimo na produção no período de 15 dias após o nascimento (fig. 5b).

Figura 6 mostra a influência dos inibidores enzimáticos EDTA, PMSF e 1,10-fenantrolina, sobre as metaloproteinasas do extrato de germe dental, quando submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida com 0,5 mg/ml de caseína. Foi observado que 0,5 mM EDTA e 0,5 mM 1,10-fenantrolina foram capazes de inibir as atividades enzimáticas, mas 0,5 mM PMSF não foi.

A influência do pH também foi analisada em gel co-polimerizado com caseína. A máxima atividade foi observada com pH 8,0 (fig. 7).

A degradação do colágeno pelo extrato de germe dental foi analisada por eletroforese e por marcação com o corante "Sirius Red". Os resultados demonstraram que as enzimas do extrato foram capazes de degradar rapidamente colágeno nativo. Após 30 min de incubação cerca de 70,92 % de colágeno tinha sido degradado (fig. 8a e 8b). A atividade proteolítica do

extrato de germe dental foi analisada por um segundo método, que utiliza o corante "Sirius Red" como marcado de colágeno. Os resultados desse ensaio confirmaram a capacidade do extrato em degradar colágeno (fig. 9).

No intuito de caracterizar o sítio de atuação das metaloproteinases do extrato, a papila dental e o órgão esmalte foram separados e as proteinases extraídas. Após eletroforese, foi observada maior ação gelatinolítica no extrato da papila dental quando comparada com o extrato feito a partir do órgão do esmalte. A ação caseinolítica foi maior na região do órgão do esmalte (fig. 10).

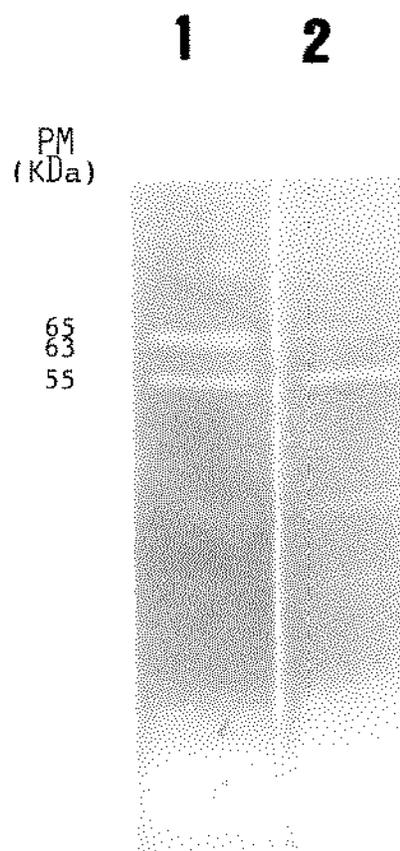


Fig. 1. Atividade gelatinolítica do extrato de germe dental. Após eletroforese, o gel foi lavado e incubado em tampão Tris-HCl com e sem íons cálcio por 16 h a 37 °C. 1) com 5 mM CaCl₂. 2) sem Ca⁺².

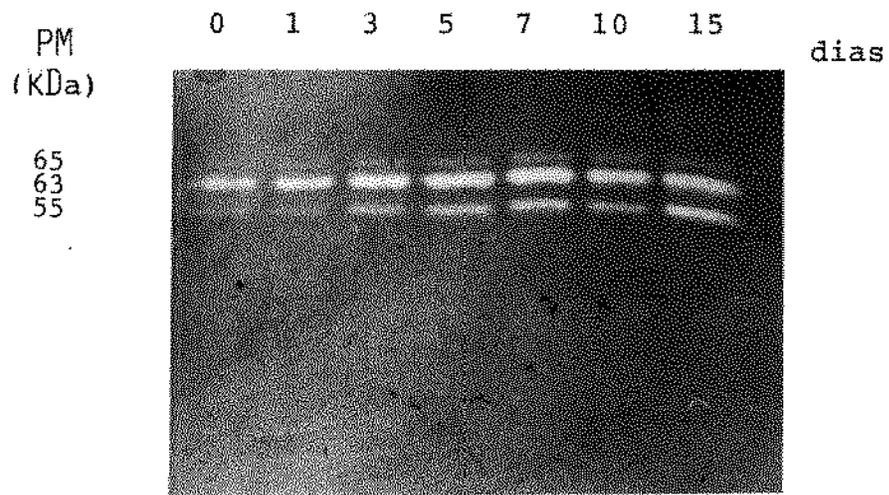


Fig. 2a. Atividade gelatinolítica do extrato de germe dental. Os números correspondem a dias após o nascimento. O peso molecular estimado das bandas protéicas foi de 65, 63 e 55 kDa. Notar um aumento na expressão de collagenase associada com a maturação dental.

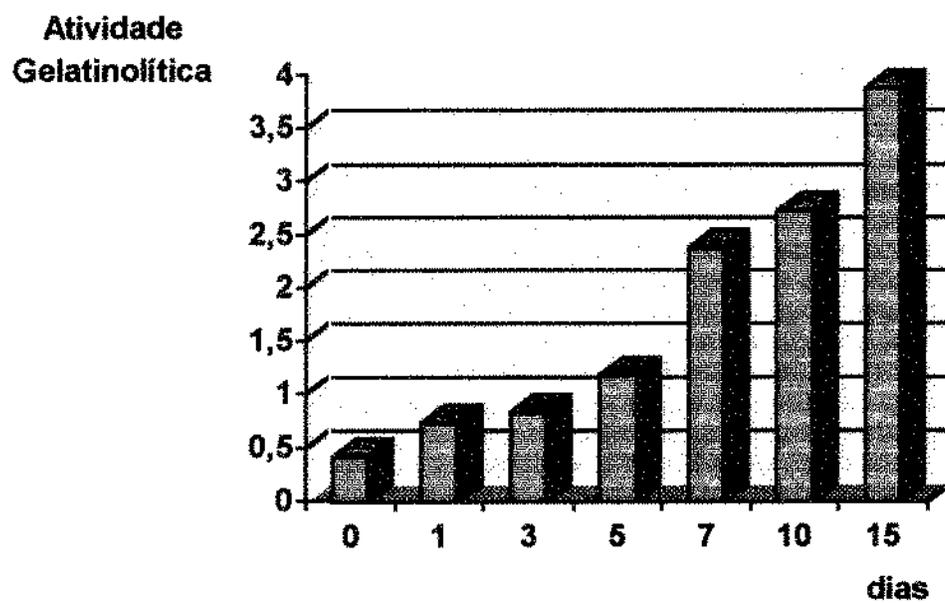


Fig. 2b. Análise densitométrica da atividade gelatinolítica. Notar o aumento na atividade das enzimas gelatinolíticas durante o desenvolvimento dental.

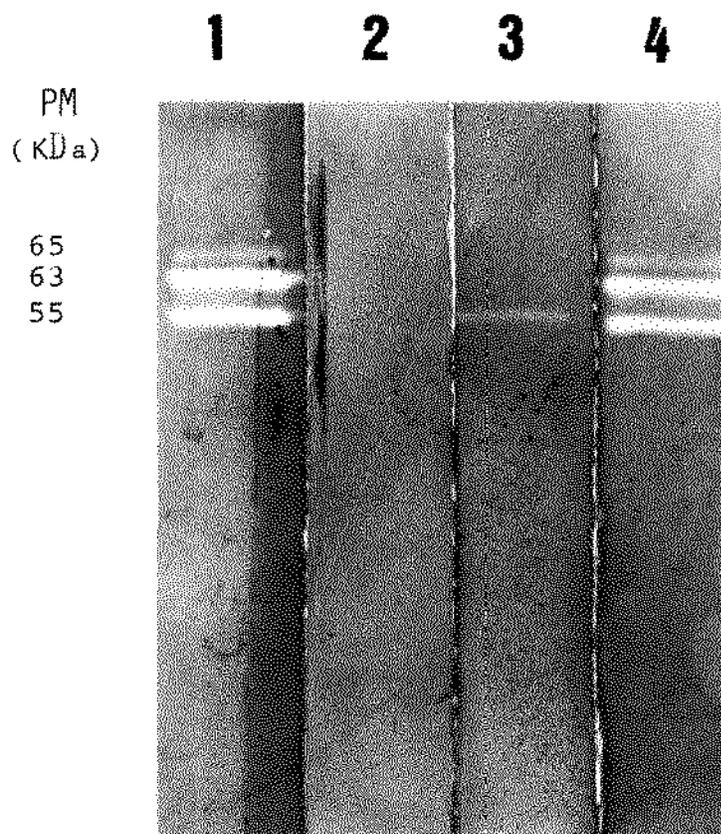


Fig. 3. Efeito dos inibidores de proteinases nas enzimas gelatinolíticas. 1) controle positivo ; 2) 0,5 mM 1,10-fenantrolina ; 3) 0,5 mM EDTA ; 4) 0,5 mM PMSF. Notar a ação inibidora da fenantrolina (quelante de íons zinco) e do EDTA (quelante de íons bivalentes) sobre as metaloproteinases.

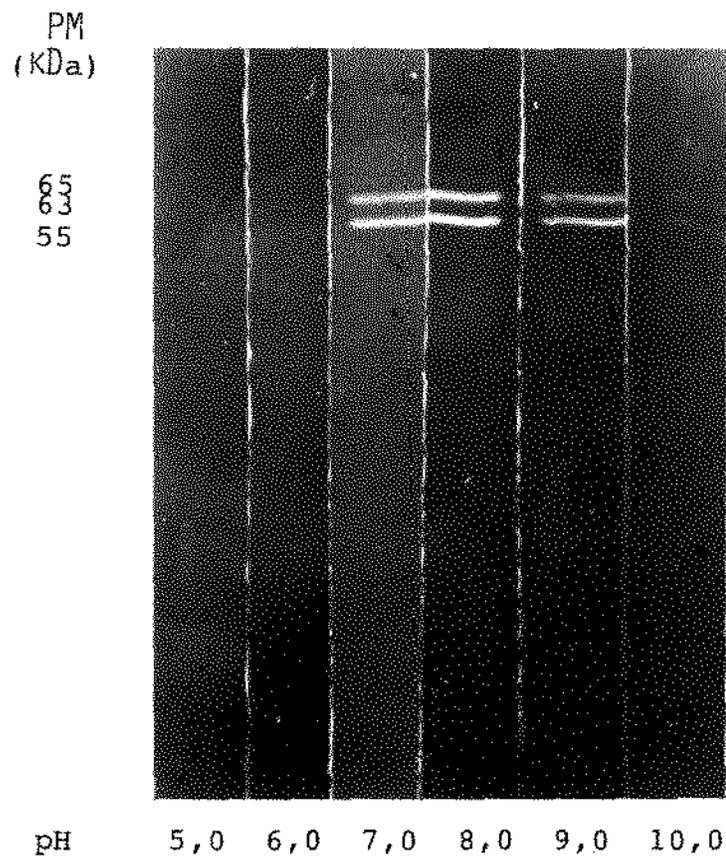


Fig. 4. Efeito do pH na atividade das collagenases. Os números indicam o valor correspondente ao pH. Notar máxima ação gelatinolítica com o pH 8,0.

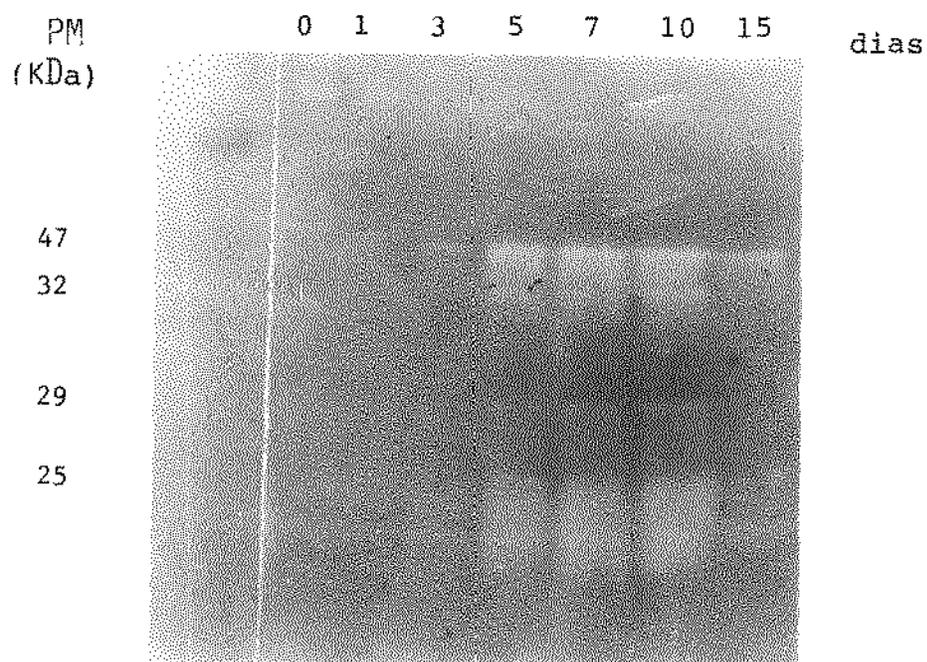


Fig. 5a. Atividade caseinolítica do extrato de germe dental. Os números correspondem aos dias após o nascimento. Observar o aumento da secreção das proteinases com peso molecular estimado em 47, 32, 29 e 25 kDa até o período de 10 dias após o nascimento.

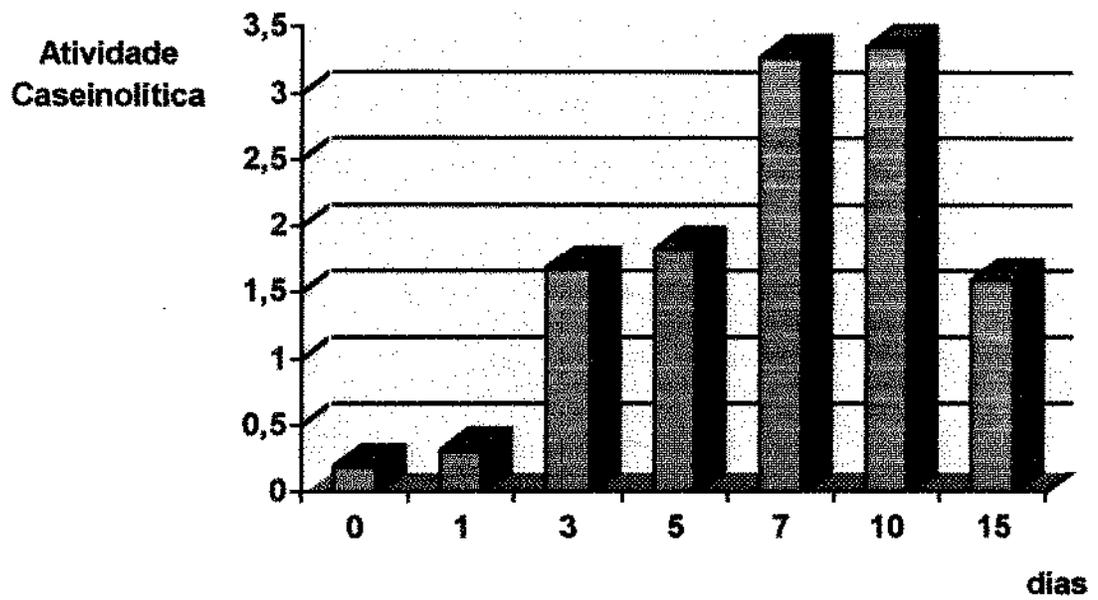


Fig. 5b. Análise densitométrica da atividade caseinolítica. Notar o aumento na produção de caseínases até o período de 10 dias após o nascimento.

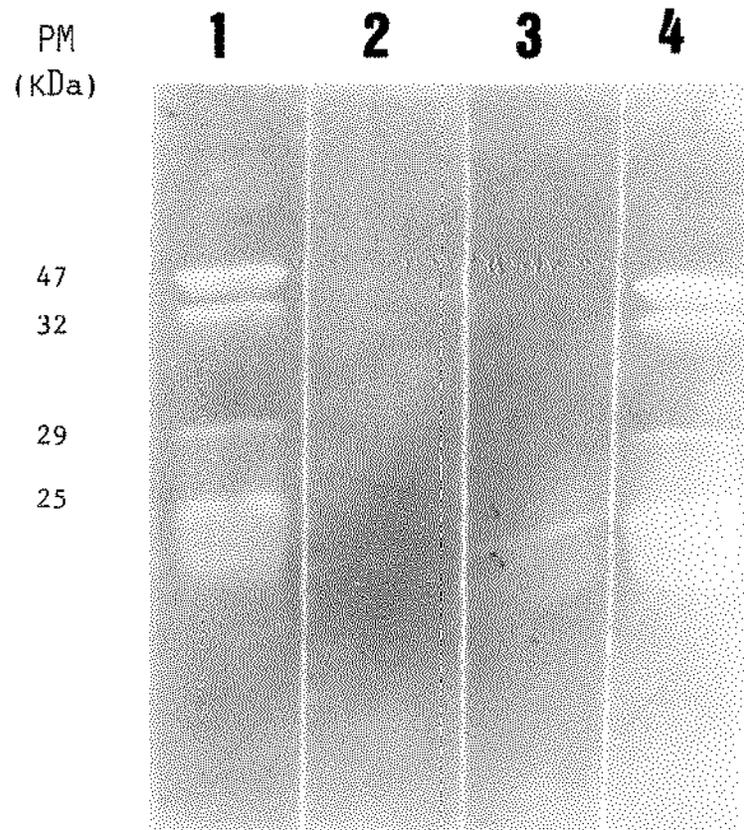


Fig. 6. Ação dos inibidores de proteinases nas enzimas caseinolíticas. 1) controle positivo ; 2) 0,5 mM 1,10-fenantrolina ; 3) 0,5 mM EDTA ; 4) 0,5 mM PMSF. Ação proteolítica completamente inibida pela fenantrolina e EDTA, mas não pelo PMSF.

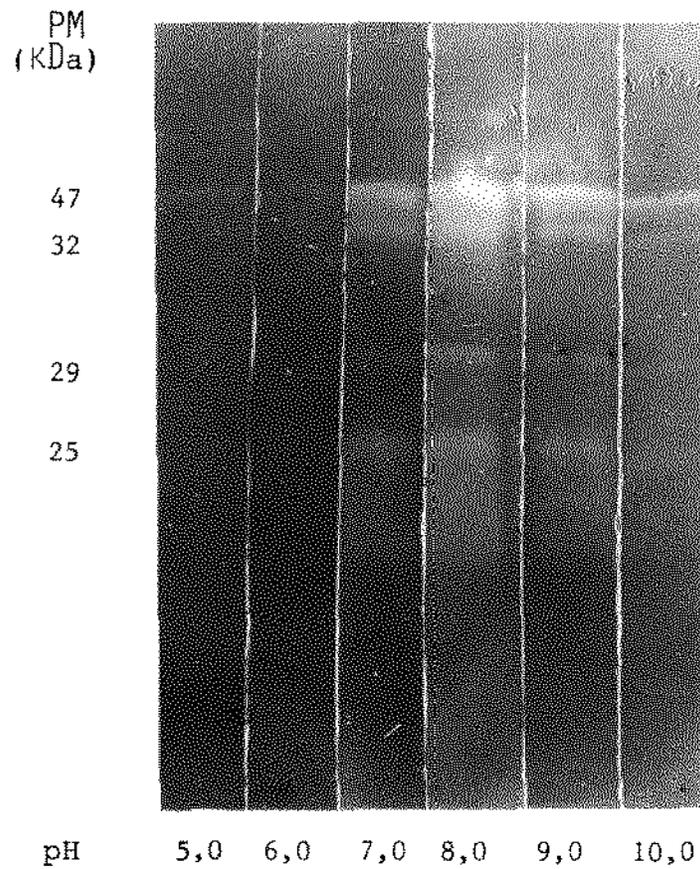


Fig. 7. Efeito do pH na ação enzimática do extrato de germe dental após eletroforese em gel de poliacrilamida com caseína como substrato. Os números indicam o valor do pH. pH 5,0 e 6,0: tampão acetato de sódio acrescido de 5 mM CaCl₂. pH 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0: tampão Tris-HCl acrescido de 5 mM CaCl₂.

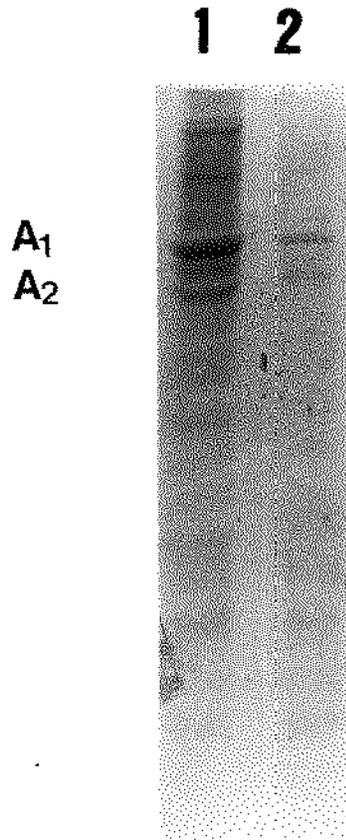


Fig. 8a. Degradação do colágeno pelas proteinases do extrato. O colágeno tipo I (20 ug) foi incubado com extrato de germe dental ativado por tripsina. A incubação foi feita a 37 °C por 30 min. 1) controle negativo: substrato sem extrato de germe dental ; 2) substrato incubado com extrato de germe dental.

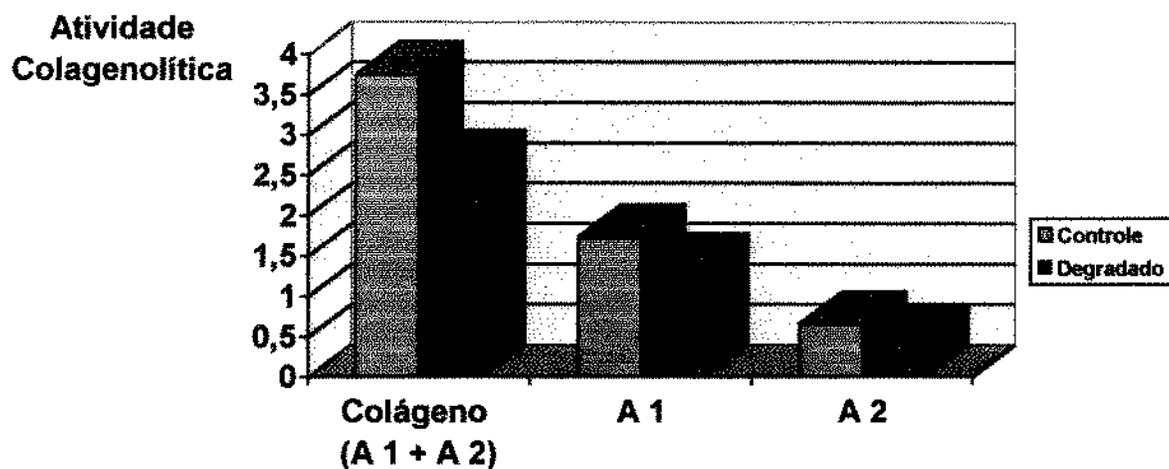


Fig. 8b. Análise densitométrica da atividade colagenolítica do extrato de germe dental mostrando a ação das metaloproteinases sobre o colágeno tipo I. Observar que a degradação das cadeias α_1 e α_2 ocorre em padrão proporcional à estequiometria das cadeias do colágeno ($\alpha_1/\alpha_2 = 2/1$).

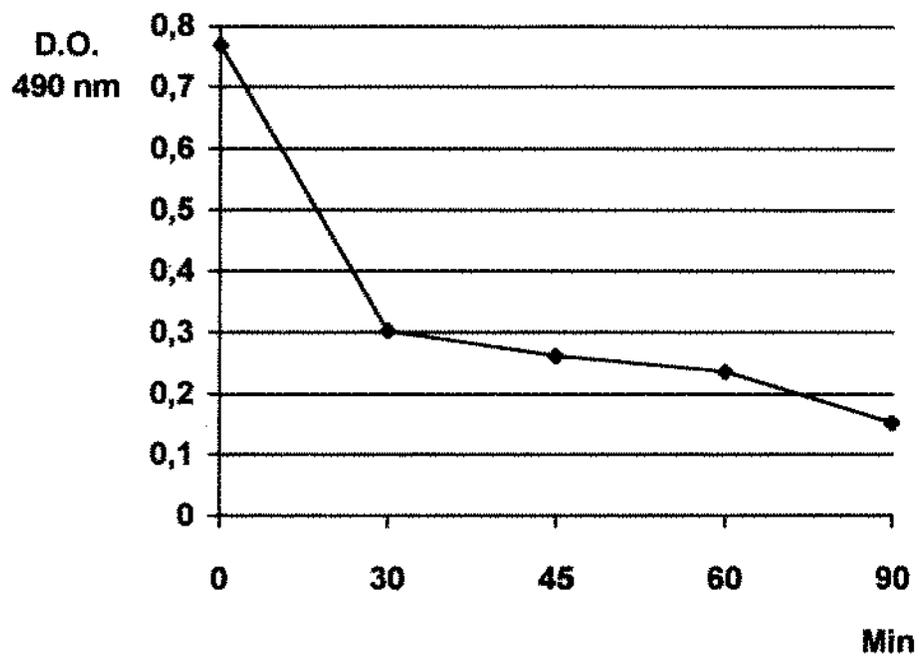


Fig. 9. Degradação do colágeno analisado por marcação com o corante "Sirius Red".

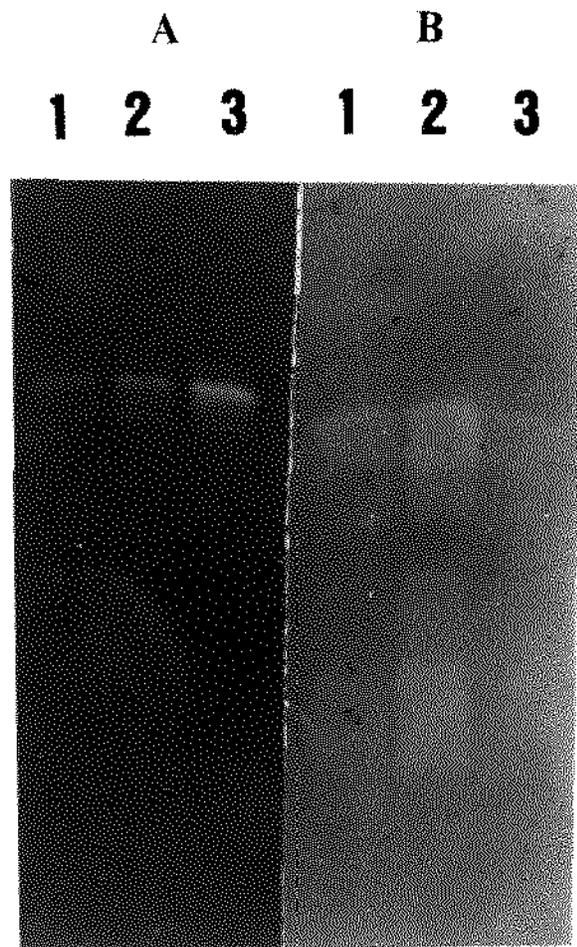


Fig. 10. Sítio principal de ação das metaloproteinases. 1) extrato de germe dental com 10 dias após o nascimento; 2) extrato do órgão do esmalte com 10 dias após o nascimento; 3) extrato da papila dental com 10 dias após o nascimento.

A: zimograma co-polimerizado com gelatina, mostrando maior atividade gelatinolítica no extrato da papila dental.

B: zimograma co-polimerizado com caseína, onde se observa maior ação caseinolítica no extrato feito a partir do órgão do esmalte.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Ainda não está estabelecido o papel das metaloproteinasas durante o desenvolvimento dental. No presente estudo, verificou-se a presença de inúmeras enzimas com atividades gelatinolíticas e caseinolíticas associadas ao germe dental em desenvolvimento. Os dados obtidos indicam a presença de gelatinases e caseinases de diferentes pesos moleculares. Suga (1970) foi o primeiro a observar a existência de enzimas proteolíticas dependentes de cálcio durante a formação dos tecidos dentais mineralizados. Segundo esse autor, esta atividade proteolítica da matriz, ao longo da junção dentina-pré-dentina, poderia estar relacionada com o processo de mineralização dental em desenvolvimento. Moe e Bikerdal-Hansen (1979) analisaram a matriz orgânica do esmalte bovino em mineralização utilizando zimografia, sendo que os resultados indicaram uma ação enzimática dependente de íons bivalentes. De acordo com os resultados desses autores, uma ação proteolítica estaria envolvida na remodelação da matriz durante a maturação do esmalte dental. Fukae et al. (1991) obtiveram resultados semelhantes ao detectarem e caracterizarem algumas proteases associadas com a mineralização da matriz orgânica da dentina. Verificaram que a ação enzimática sobre os componentes da matriz extracelular constitui-se num evento importante para o desenvolvimento dental, sugerindo que essas enzimas proteolíticas atuariam diretamente na remodelação e degradação de macromoléculas da matriz dental.

Outros autores (Dayan et al., 1983) sugeriram que as colagenases intersticiais secretadas durante a formação dental estariam na forma inativada, e sua ativação ocorreria apenas em processos cariogênicos, onde os produtos ácidos bacterianos clivariam e ativariam as colagenases intersticiais. Os dados desses autores não estão de acordo com os observados por Fukae et al. (1991), que descrevem a participação das metaloproteinases durante o desenvolvimento dental. A grande variação na expressão e atividade das metaloproteinases, observadas no presente estudo, sugere que estas enzimas possuem um papel ativo durante o desenvolvimento do germe dental.

As metaloproteinases estão envolvidas na fisiopatologia dos tecidos e no desenvolvimento e crescimento de alguns órgãos, como é o caso do pulmão (Rolland et al., 1995). Estes autores sugeriram que as gelatinases de 72 e 92 kDa participariam na remodelação e degradação da membrana basal durante a embriogênese pulmonar. Regiões descontínuas encontradas na membrana basal seriam importantes promotoras da citodiferenciação celular, pois promoveriam o contato do tecido mesenquimal com o tecido epitelial. Em todos os períodos do desenvolvimento dental, detectou-se a presença de uma gelatinase com peso molecular entre 65 e 55 kDa, cujo peso molecular corresponde à colagenase de fibroblastos. Esta variação no peso molecular, provavelmente, deve-se à proteólise parcial da molécula durante a sua ativação (Strickilin et al., 1983). A ativação das metaloproteinases é dividida em duas etapas. Na primeira etapa, ocorre uma clivagem proteolítica que resulta na remoção da porção propeptídica (porção amino-terminal) da enzima. A clivagem da porção propeptídica da molécula

não ocorre sempre em um mesmo ponto, resultando em enzimas de peso molecular diferentes. O aumento gradativo na produção dessa gelatinase acompanha o desenvolvimento do germe dental e corresponde a uma maior remodelação e degradação dos componentes da matriz extracelular e a um maior crescimento da papila dental. O aumento da concentração de enzimas gelatinolíticas na papila dental pode estar relacionado com as rápidas alterações que ocorrem na matriz extracelular desta região, durante o desenvolvimento do germe dental. Além da formação da matriz do esmalte e dentina, o desenvolvimento do germe dental também é acompanhado por uma maturação da papila dental, que passa de um tecido conjuntivo frouxo, assemelhando-se a um tecido mixoide, para um tecido fibroso nas fases pré-eruptivas.

O aumento na produção das enzimas caseinolíticas até o período de 10 dias após o nascimento pode estar associado ao processo de mineralização dental. Aoba et al. (1987) demonstraram que a mineralização do esmalte dental é antecedida por uma degradação e quase completa remoção das proteínas da matriz orgânica do esmalte (amelogenina e enamelinina). Estes autores observaram que a amelogenina apresenta atividade inibitória sobre cristais de hidroxiapatita em crescimento, sugerindo, portanto, que a clivagem e degradação da amelogenina são fatores desencadeadores para a mineralização dental. Resultados semelhantes foram observados por Tanabe et al. (1994) e DenBesten e Hefferman (1989).

DenBesten e Hefferman (1989) detectaram, durante os estágios iniciais do desenvolvimento do esmalte dental de ratos, sete gelatinases com

pesos moleculares entre 92 e 43 kDa. Quando testadas sobre a matriz do esmalte bovino, apenas duas delas, as com peso molecular estimado em 28 e 33 kDa, mostraram ser capazes de degradar amelogenina e enamelinina. Segundo Tanabe et al. (1994), os ameloblastos estão envolvidos na degradação da amelogenina e da enamelinina durante a mineralização dental. Estes autores detectaram duas proteinases com peso molecular estimado em 78 e 76 kDa capazes de degradar a matriz orgânica do esmalte.

Neste trabalho, observou-se que o aumento na produção da matriz orgânica do esmalte, pelos ameloblastos, e o início do processo de mineralização, foram acompanhados por um aumento na expressão de caseínases. Porém, as proteinases detectadas em nossos testes mostraram-se diferentes das citadas anteriormente, pois, além de apresentarem pesos moleculares diferentes, apresentaram atividades degradatórias em substrato de caseína. A maioria dos estudos utiliza germes dentais de bovinos e suínos. Os animais utilizados em nossos experimentos foram ratos Wistar, que são os mais comuns em nosso meio, motivo pelo qual foram utilizados neste trabalho. O fato da diferença entre as proteinases pode estar relacionado com a espécie animal utilizada. No período de 15 dias após o nascimento, a mineralização pré-eruptiva do esmalte dental está concluída e tem início a erupção dental. A isto pode estar relacionado o fato da diminuição na concentração de enzimas caseinolíticas no extrato de germe dental.

Durante a osteogênese, que em muitos aspectos assemelha-se à odontogênese, osteoblastos produzem vários dos componentes da família das metaloproteinases e seus inibidores. Essas enzimas são responsáveis

pela remodelação óssea e parecem também degradar seletivamente as proteínas da matriz e contribuir para a mineralização (Otsuka et al., 1984 e Overalland and Sodek, 1987).

A remodelação da matriz dental durante a morfogênese pode ser controlada em três níveis: produção de metaloproteinases, ativação das metaloproteinases e produção de TIMPs. TIMPs são considerados importantes reguladores da atividade proteolítica das metaloproteinases. Estes inibidores são expressos em muitos tecidos embrionários, como no pulmão, rim, fígado, pele, cérebro e em vários sítios osteogênicos (Nomura et al., 1989). Nos tecidos dentais ainda não foi investigada. Desta forma, TIMP pode estar envolvido na regulação da atividade das metaloproteinases durante o desenvolvimento e crescimento dental.

As metaloproteinases são uma família de enzimas que apresentam similaridades estruturais e funcionais. Outra característica comum é a dependência, para sua ativação, de íons zinco e cálcio. Os ensaios de inativação confirmaram que as proteinases detectadas em nossos estudos, são pertencentes ao grupo das metaloproteinases. Agentes quelantes de íons bivalentes como a 1-10-fenantrolina e o EDTA, foram capazes de inibir completamente a ação enzimática. O ensaio de influência do pH foi outro recurso utilizado no intuito de caracterizar essas proteinases, pois as enzimas pertencentes ao grupo das metaloproteinases só apresentam ação degradatória em pH neutro ou ligeiramente alcalino. A máxima ação gelatinolítica e caseinolítica foi observada em pH variando entre 6,0 e 9,0. Por outro lado, com o pH 5,0 e 10,0 a atividade enzimática foi inibida. Resultados semelhantes foram obtidos por Fukae et al. (1989), que

observaram uma ação gelatinolítica com os pHs variando entre 6,0 e 9,0. A desnaturação enzimática, que é um desarranjo da estrutura terciária da molécula, pode ocorrer em valores de pH extremamente baixo ou elevado. Em valores baixos, o sítio catalítico ativo da enzima com carga negativa, pode ser protonado, resultando na inativação da enzima. A inibição enzimática encontrada com o valor do pH igual a 10,0 pode ter ocorrido por precipitação de íons cálcio, na forma de hidróxido de cálcio. Os átomos de cálcio são importantes, pois conferem a estabilidade para a estrutura terciária da enzima (Dioszegi et al., 1995).

Optou-se nesse trabalho pela utilização, para todos os períodos, de germes dentais dos primeiros molares da maxila e mandíbula. Foi observado que a diferenciação dental e a produção de matriz orgânica de dentina e esmalte do primeiro molar são semelhantes para ambos os maxilares.

As metaloproteinases são enzimas importantes para a função dos tecidos e células, pois atuam na clivagem das moléculas da matriz extracelular, inclusive sobre o colágeno, onde é específico e indispensável (Bauer et al., 1975). Os ensaios de clivagem do colágeno tipo I confirmaram a natureza dessas proteinases e mostraram que as collagenases presentes no extrato de germe dental são capazes de degradar colágeno nativo. Acredita-se que a collagenase que atuou na clivagem inicial do colágeno seja a gelatinase detectada em nossos testes visto que, a gelatinase do extrato de germe dental é inibida por 1,10-fenantrolina e EDTA e apresenta um peso molecular semelhante à collagenase de fibroblastos.

Em ensaios de degradação do colágeno onde se utiliza collagenases purificadas, observa-se a formação de bandas correspondentes aos

fragmentos proporcionais a $\frac{1}{4}$ e $\frac{3}{4}$ de tamanho da molécula do colágeno. A ausência das bandas de $\frac{1}{4}$ e $\frac{3}{4}$ do colágeno em nossos ensaios de degradação, possivelmente, se explica pela existência de outras proteinases no extrato de germe dental que completam a digestão do colágeno. Além das enzimas com atividade caseinolítica detectadas em nossos estudos, a degradação dos fragmentos $\frac{1}{4}$ e $\frac{3}{4}$ poderia ser feita por gelatinases de 72 e 92 kDa também presentes no desenvolvimento do germe dental. Reponen et al. (1992) demonstraram por hibridização “in situ” a expressão de gelatinase de 72 kDa nas regiões adjacentes a membrana basal do epitélio interno do órgão do esmalte. Segundo esses autores, a gelatinase participaria, provavelmente, no “turnover” da membrana basal e na remoção de fragmentos de colágeno desnaturado, clivado por outras metaloproteinases. Resultados semelhantes foram observados por Sahlberg et al. (1992), estudando a expressão de gelatinase de 72 kDa em camundongos, por análise de hibridização “in situ”, e por Breckon et al. (1995), que analisaram a expressão de gelatinase de 92 kDa em germes dentais de coelhos em desenvolvimento. Reponen et al. (1994) observaram a expressão de gelatinase de 92 kDa apenas nas regiões circundantes do germe dental. Desta forma, sugeriram que as gelatinases de 92 kDa seriam importantes para a degradação óssea responsável pela acomodação do germe dental durante o seu crescimento.

No intuito de determinar o sítio principal de ação das diferentes metaloproteinases no desenvolvimento dental, analisaram-se os extratos obtidos a partir da separação da papila dental e do órgão do esmalte do germe dental com 10 dias após o nascimento. A escolha desse período se

deve ao fato da alta concentração de metaloproteinases e por ser um período onde se encontrou uma facilidade para a separação mecânica da papila dental do órgão do esmalte. A pequena expressão de colagenase encontrada na região do órgão do esmalte talvez esteja relacionada com pequenos fragmentos da papila dental que permaneceram aderidos ao órgão do esmalte após a separação. A função exata dessas metaloproteinases encontradas no órgão do esmalte em desenvolvimento ainda não está clara. Contudo, os resultados indicam que algumas dessas metaloproteinases, que provavelmente pertençam ao grupo das estromelinas, poderiam atuar na degradação das proteínas da matriz orgânica do esmalte, durante a amelogênese.

Alterações nessas enzimas podem estar relacionadas a patologias dentais, como na amelogênese imperfeita. Segundo Aoba et al., (1989) a clivagem enzimática da matriz orgânica do esmalte é o fator iniciador para a mineralização do esmalte dental. Na amelogênese imperfeita do tipo hipomaturada, ocorre uma deposição diminuída de cristais de hidroxiapatita. Desta forma, acredita-se que qualquer alteração genética dessas enzimas leve a uma função anormal e a uma possível inibição na deposição de cristais de apatita. Segundo Wright e Butler (1989), a causa primária da amelogênese imperfeita do tipo hipomaturada envolveria um mecanismo anormal de remoção das proteínas da matriz do esmalte.

Foi demonstrado que diversas proteinases com atividades gelatinolíticas e caseinolíticas estão presentes nos vários períodos de desenvolvimento do germe dental. É sabido que a maturação dental é acompanhada por uma remodelação e degradação dos componentes da

matriz dental (Fukae et al., 1991) e da membrana basal, principalmente de colágeno tipo IV (Salhberg et al., 1992). O presente estudo suporta a concepção de que as metaloproteinases estão envolvidas no processo de desenvolvimento, crescimento e mineralização do órgão dental, como observado por alguns autores anteriormente. Estudos adicionais devem ser realizados para elucidar o papel preciso das metaloproteinases no desenvolvimento dental e sua associação em patologias como nas hipoplasias do esmalte dental.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. O desenvolvimento do germe dental é acompanhado por rápidas mudanças na expressão das metaloproteinases.

2. A expressão de metaloproteinases com atividade gelatinolítica, ocorre principalmente na região da papila dental, estando, possivelmente, associada ao rápido “turnover” do colágeno que ocorre nesta região durante a maturação do germe dental.

3. A expressão de metaloproteinases com atividade caseinolítica, ocorre principalmente na região do órgão do esmalte, estando, principalmente, associada ao processo de mineralização da matriz orgânica do órgão dental.

SUMMARY

SUMMARY

CARACTERIZATION OF METALLOPROTEINASES ASSOCIATED WITH THE DEVELOPMENT OF THE FIRST MOLAR TOOTH GERM IN RATS.

The participation of metalloproteinases during the tooth development is not well established. This work was performed in order to determine and characterize the expression of metalloproteinases during the rat first molar development. Gelatinolytic and caseinolytic activities were analyzed by zymography on polyacrylamide gels containing one of the substrates. The maturation of the rat first molar was accompanied by changes in the expression of metalloproteinases. Gelatinolytic activity increased progressively from day 0 to 15, while caseinolytic activity increased rapidly from day 3 to 10, decreasing on day 15. Mechanical separation of compartments of tooth germ showed that caseinolytic activity was restricted mainly in the enamel organ while gelatinolytic activity was localized mainly in the papillae. All the enzymes detected were inhibited by 1,10-phenanthroline, which is a specific inhibitor for metalloproteinases. These data suggest that matrix metalloproteinases play an important role in the development and maturation of tooth germ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B; Bray, D; Lewis, J; Raff, M and Watson, JD. (1989) Molecular Biology of the Cell. 2º ed., New York and London: Garland Publishing Inc, cap 14.

AOBA, T; Tanabe, T and Moreno, EC. (1987) Function of amelogenins in porcine enamel mineralization during the secretory stage of amelogenesis. Adv. Dent. Res. 1(2): 252-260.

AUTIO-HARMAINEN, H; Karttunen, T; Hurskainen, T; Hoyhtya, M; Kauppila, A and Tryggvason, K. (1993) Expression of 72 Kilodalton type IV collagenase (gelatinase A) in benign and malignant ovarian tumors. Lab. Invest. 69(3): 312-321.

BANDA, MJ and Werb, Z (1981) Mouse macrophage elastase. Biochem. J. 193: 589-605.

BAUER, EA; Stricklin, GP; Jeffrey, JJ and Eisen, AZ (1975) Collagenase production by human skin fibroblasts. Biochem. Biophys. Res. Com. 64: 232-240.

BHASKAR, SN. (1989) Histologia e Embriologia oral de Orban. 10º ed, Editora Artes Medicas, São Paulo, cap 2.

BIEKEDAL-HANSEN, H. (1993) Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J. Periodontol* 64: 474-484.

BRADFORD, MM. (1976) A rapid and sensitive method the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Bioch.* 72: 248-254.

BRECKON, JJW; Hembry, RM; Reynolds, JJ and Meikle, MC. (1995) Matrix metalloproteinases and TIMP-1 localization at sites of osteogenesis in the craniofacial region of the rabbit embryo. *The Anat. Record* 242: 177-187.

CHIN, JR; Murphy, G and Werb, Z. (1985) Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. *J. Biol. Chem.* 260(22): 12367-12376.

DAYAN, D; Binderman, I and Mechanic, GL. (1983) A preliminary study of activation of collagenase in carious human dentine matrix. *Archs Oral Biol* 28(2): 185-187.

DECLERCK, YA; Perez, N; Shimada, H; Boone, TC; Langley, KE and Taylor, SM. (1992) Inhibition of invasion and metastasis in cells

transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res.* 52: 701-708.

DENBESTEN, PK and Hefferman, LM. (1989) Separation by polyacrylamide gel electrophoresis of multiple proteases in rat and bovine enamel. *Archs Oral Biol* 34(6): 399-404.

DIOSZEGI, M; Cannon, P and Van wart, H. (1995) Vertebrate Collagenases in *Methods in Enzymology*, vol. 248: 413-449.

EMONARD, H and Grimaud, J-A. (1990) Matrix Metalloproteinases. A review. *Cell Molec Biol* 36(2): 131-153.

FUKAE, M; Kaneko, I; Tanabe, T and Shimizu, M. (1991) Metalloproteinases in the mineralized compartments of porcine dentine as detected by substrate-gel electrophoresis. *Archs Oral Biol* 36(8): 567-573.

GUIS, MB; Sloomweg, RN and Tonino, GJM. (1973) A biochemical study of collagen in the periodontal ligament from erupting and non-erupting bovine incisors. *Archs Oral Biol* 18: 253-263.

HERRON, GS; Banda, MJ; Clack, EJ; Gavrilovic, J and Werb, Z. (1986) Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 76: 219-224.

HEUSSEN, C and Dowdle, EB. (1980) Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analyt. Biochem.* 102: 196-202.

HIBBS, MS and Bainton, DF. (1989) Human neutrophil collagenase is a component of specific granules. *J. Clin. Invest.* 84:1395-1402.

HOWARD, EW; Bullen, EC and Banda, MJ. (1991) Preferential inhibition of 72 and 92 kDa gelatinases by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J. Biol. Chem.* 266: 13070-13075.

KERR, LD; Holt, JT and Matrisian, LM. (1988) Growth factors regulate transin gene expression by c-fos-dependent and c-fos-independent pathways. *Science* 242: 1424-1427.

KNAUPER, V; Osthues, A; DeClerck, YA; Langley, KE, Blasser, J and Tschesche, H. (1993) Fragmentation of human polymorphonuclear-leucocyte collagenase. *Biochem. J.* 291: 847-854.

LAEMMLI, UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

MACNAUL, KL; Chartrain, N; Lark, M; Tocci, MJ and Hutchinson, NI. (1990) Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue

inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid synovial fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 265: 17238-17245.

MOE, D and Bikerdal-Hansen, H. (1979) Proteolytic activity in developing bovine enamel. *J. Dent. Res.* 58(3): 1012-1013.

MURPHY, G; Ward, R; Hembry, RM; Reynolds, JJ; Kuhn, K and Tryggvason, K. (1989) Characterization of gelatinase from pig polymorphonuclear leucocytes. *Biochem. J.* 258: 463-472.

MURPHY, G; Willenbrock, F; Crabre, T; O'Shea, M; Ward, R; Atkinson, S; O'Connell, J and Docherty. (1994) Regulation of matrix metalloproteinase activity. In *Inhibition of matrix metalloproteinases: therapeutic potential.* *Annals of The NY Academy of Sciences* 732: 31-41.

MURRAY, RK; Granner, DK; Mayer, PA and Rodwell, VW. (1990) Harper; bioquímica. 6° ed, Editora Atheneu, São Paulo, cap 1.

NOMURA, S; Hogan, BLM; Willis, AJ; Heath, JK and Edwards, DR. (1989) Development expression of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) RNA. *Development* 105: 575-583.

OKADA, Y; Gonoji, Y; Naka, K; Tomita, K; Nakanishi, I, Iwata, K; Yamashita, K and Hayakawa, T. (1992) Matrix metalloproteinases 9 (92-

kDa Gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. *J. Biol. Chem.* 267: 21712-21719.

OKADA, Y; Naka, K; Kawamura, K; Matsumoto, T; Nakanishi, I; Fujimoto, N, Sato, H and Seiki, M. (1995) Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase=gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. *Lab. Invest.* 72(3): 311-322.

OTSUKA, K; Sodek, J and Limeback, H. (1984) Synthesis of collagenase and collagenase inhibitors by osteoblast-like cells in culture. *Eur. J. Biochem.* 145: 123-129.

OVERALL, CM and Sodek, J. (1987) Initial characterization of a neutral metalloproteinase, active on native $\frac{3}{4}$ -collagen fragments, synthesized by ROS 17/2.8 osteoblastic cells, periodontal fibroblasts and identified in gingival crevicular fluid. *J. Dent. Res.* 66: 1271-1282.

PIEZ, KA and Reddi, AH. (1984) Mammalian Collagenases in *Extracellular Matrix Biochemistry*. New York/Elsevier Science Publishing Co., cap 4.

QUANTIN, B; Murphy, G and Breathnach, R. (1989) PUMP-1 cDNA codes for a protein with characteristics similar to those of classical collagenase family members. *Biochemistry* 28: 5327-5334.

REPONEN, P; Sahlberg, C; Huhtala, P; Hurskainen, T; Thesleff, I and Tryggvason, K. (1992) Molecular cloning of murine 72-kDa type IV collagenase and its expression during mouse development. *J. Biol. Chem.* 267(11): 7856-7862.

REPONEN, P; Sahlberg, C; Munaut, C; Thesleff, I and Tryggvason, K. (1994) High expression of 92- kDa type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. *J. Cell Biol.* 124 (6): 1091-1102.

ROBINSON, C; Fuchs, P; Deutsch, D and Weatherell, JA. (1978) Four chemically distinct stages in developing enamel from bovine incisor teeth. *Caries Res.* 12: 1-11.

ROBINSON, PJ; Siew, C; Gruninger, SE; Chang, SB; Turner, DW and Harper, DS. (1992) Transamidase and collagenase activity in healthy and diseased human gingival tissues. *J. Oral Pathol Med.* 21: 471-476.

ROLLAND, G; Xu, J; Dupret, J-M and Post, M. (1995) Expression and Characterization of type IV collagenases in rat lung cells during development. *Exp. Cell Res.* 218: 346-350.

SAHLBERG, C; Reponen, P; Tryggvason, K and Thesleff, I. (1992) Association between the expression of murine 72 kDa type IV collagenase

by odontoblasts and basement membrane degradation during mouse tooth development. *Archs Oral Biol* 37(12): 1021-1031.

SHAPIRO, SD; Kobayashi, DK and Ley, TJ. (1993) Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* 268: 23824-23829.

SOUZA, SJ de; Pacheco, MM; Sonohara, S; Brentani, MM and Brentani, RR. (1993) Regulation of extracellular matrix-degrading proteases. *Ciência e Cultura* 45(5): 313-318.

STRICKLIN, GP; Jeffrey, JJ; Roswit, WT and Eisen, AZ. (1983) Human skin fibroblast procollagenase: mechanisms of activation by organomercurials and trypsin. *Biochemistry* 22: 61-68.

SUGA, S. (1970) Histochemical observation of proteolytic enzyme activity in the developing dental hard tissues of the rat. *Archs Oral Biol* 15: 555-558.

TANABE, T; Fukae, M and Shimizu, M. (1994) Degradation of enamelins by proteinases found in porcine secretory enamel *in vitro*. *Archs Oral Biol* 39(4): 277-281.

TEN CATE, AR. (1988) *Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função*. 2º ed, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, cap 4.

THESLEFF, I; Barrach, JM; Vaheri, A; Pratt, RM and Martin, GR. (1981) Changes in the distribution of type IV collagen, laminin, proteoglycan and fibronectin during mouse tooth development. *Dev. Biol.* 81: 182-192.

VIJAYKUMAR, MB; Brott, DA; Qiu, L; Conroy, MC and Lalwani, ND. (1995) Immunofluorescence quantitation of stromelysin in human synovial fibroblasts by confocal laser scanning microscopy. *Lab. Invest.* 72(4): 484-490.

VAN WART, HE and Bikerdal-Hansen, H. (1990) The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinases activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87: 5578-5582.

WALSH, BJ; Thornton, SC; Penny, R and Breit, SN. (1992) Microplate reader-based quantitation of collagens. *Anal. Biochem.* 203: 187-190.

WEEKS, JG; Halme, J and Woessner, JF Jr. (1976) Extraction of collagenase from the involuting rat uterus. *Biochem. Biophys. Acta* 445: 205-214.

WELGUS, HG; Fliszar, CJ; Seltzer, JL; Schmid, TM and Jeffrey, JJ. (1990) Differential susceptibility of type IV collagen to cleavage by two

mammalian interstitial collagenases an 72-kDa type IV collagenase. *J. Biol. Chem.* 265: 13521-13527.

WOESSNER, JF Jr. (1994) The family of matrix metalloproteinases. In *Inhibition of matrix metalloproteinases: therapeutic potential*. Annals of the NY Academy of Sciences 732: 31-41.

WRIGHT, JT and BUTLER, WT. (1989) Alteration of enamel proteins in hypomaturational amelogenesis imperfecta. *J. Dent. Res.* 68(9): 1328-1330.