

# UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Odontologia



**Tese**

**Inibição da metaloproteinase 2 por dois monômeros amplamente utilizados na formulação de adesivos dentinários**

**RODRIGO VARELLA DE CARVALHO**

**Pelotas, 2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**RODRIGO VARELLA DE CARVALHO**

**Inibição da metaloproteinase 2 por dois monômeros amplamente utilizados  
na formulação de adesivos dentinários**

TESE apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de concentração em Dentística.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Etges

Pelotas, 2009

**Banca examinadora:**

Profa. Dra. Adriana Etges

Profa. Dra. Ana Paula Nunes

Prof. Dr. Neftalí Lenin Villarreal Carreño

Prof. Dr. Rafael Bueno Orcy

Prof Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio

Profa. Dra. Ana Paula Neutzling Gomes (Suplente)

Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci (Suplente)

Dedico este trabalho aos meus pais

Tabajara e Edite e aos meus irmãos Juliano e André.

Vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Sempre presentes nos momentos bons e nos momentos difíceis. Obrigado pelo apoio.

Amo vocês!

*Isto sabemos.*

*Todas as coisas estão ligadas*

*como o sangue*

*que une uma família...*

*Tudo o que acontece com a Terra,*

*acontece com os filhos e filhas da Terra.*

*O homem não tece a teia da vida;*

*ele é apenas um fio.*

*Tudo o que faz à teia,*

*ele faz a si mesmo.*

**- excerto da carta do Cacique Seattle**

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Meu mais sincero agradecimento à minha orientadora Professora Doutora Adriana Etges. Foi um enorme prazer ter sido orientado por ti, tanto no mestrado, quanto no doutorado. Obrigado pela sua dedicação, profissionalismo e confiança. Para quem conhece a Adriana sabe que ela é, acima de tudo, uma pessoa do bem. A nossa convivência foi extremamente gratificante para mim.

Ao Professor Doutor Flávio Fernando Demarco que tem sido um exemplo de profissional para mim. Uma pessoa com muitas qualidades, talvez, a mais marcante seja a capacidade de estimular as pessoas ao seu lado a terem ambição profissional, sem perder a ética. Quem me deu ter a metade da sua energia!

À minha namorada e minha amiga Raquel. Muito tenho aprendido com a sua sinceridade e com sua forma de ver o mundo. Nas discordâncias e concordâncias acho que temos mudado um pouquinho o que nós somos. Quero, com certeza, continuar aprendendo e convivendo contigo. Te amo... Amore!

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Sergio Line que cordialmente me recebeu em Piracicaba para a realização deste trabalho. Minha convivência com o senhor foi pequena, porém em poucos dias pude perceber seu profissionalismo e a admiração de todos que o cercavam.

Ao meu amigo e colega de Pós-Graduação Fabrício Ogliari, co-autor desse trabalho e uma das pessoas mais esforçadas e inteligentes que já tive o prazer de conviver. Aprendi muito contigo, tenha muito sucesso meu velho!

À Professora Doutora Ana Paula de Sousa, co-autora deste trabalho, pela ajuda na obtenção das amostras das enzimas usadas nesse trabalho e pelas dicas para melhorar o trabalho final.

Ao Professor Doutor Evandro Piva, co-autor deste trabalho, pela ajuda nos contatos estabelecidos para a realização desta pesquisa em Piracicaba e pela ajuda na análise dos resultados.

Ao Professor Doutor Cesar Petzhold, co-autor deste trabalho, pela ajuda inestimável com as questões relacionadas à química envolvidas neste estudo.

Ao Doutor Marcelo Marques, que na ocasião deste trabalho me ajudou muito em Piracicaba. Conheci poucas pessoas com disposição para ajudar o próximo como você. Muito obrigado!

À Professora Doutora Adriana Silva, co-autora deste trabalho, principalmente pela ajuda com o inglês, nas correções finais e submissões dos artigos.

Aos meus grandes amigos da Pós-Graduação Lund, Tino, Marcos, Marcus e Sinval, nossa convivência fez dos momentos bons, muito melhores, e dos momentos ruins, um pouco melhores.

Às minhas colegas de Pós-Graduação Sandrina e Françoise, pela nossa convivência e por compartilharem comigo o estudo das metaloproteinases.

Aos meus amigos da Pós-Graduação Tiago, Silvia, Marina, Marília, Glória, Thiago, Márcio, Caroline, Giana, Luciano, Neno, Paula, Sônia e Renata, pelo que aprendi com vocês nas reuniões de sexta-feira e pela convivência.

Às minhas amigas da Graduação Luísa e Fernanda, pela ajuda e parceria em alguns trabalhos que fizemos.

Ao Rafael Moraes por me receber tão bem em Piracicaba.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Josiane Silva.

Às Professoras de Patologia Bucal, Professora Doutora Adriana Etges, Professora Doutora Ana Paula Neutzling Gomes, Professora Doutora Lenita Maria Áver de Araújo, Professora Doutora Sandra Beatriz Chaves Tarquínio, por permitirem que eu aprendesse um pouco com a convivência com vocês no sexto andar.

Às técnicas e secretárias da Patologia Bucal, Ivana, Silvana, Dona Léia, Gabriela, Renata e Sabrina, por sempre estarem dispostas a me ajudar quando precisei.

À Universidade Federal de Pelotas (UFPel), representada pelo Excelentíssimo Reitor Professor Doutor Cesar Borges.

À Faculdade de Odontologia da UFPel, representada pela Diretora Professora Doutora Márcia Bueno Pinto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPel, representado pelo Coordenador Professor Doutor Flávio Fernando Demarco.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas.

À Angelus Science and Technology pelo financiamento parcial desta pesquisa.

À Esstech Inc. pela doação dos monômeros TEGDMA e HEMA utilizados neste trabalho.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) por conceder minha bolsa de estudos.



## NOTAS PRELIMINARES

Essa Tese foi redigida de acordo com o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2006, adotando o Nível de Descrição 4 – Estruturas em Artigos, que consta no Apêndice D do referido manual.

Os trabalhos descritos nessa Tese deram origem a dois manuscritos. O manuscrito intitulado “*2-Hydroxyethyl methacrylate as an inhibitor of matrix metalloproteinase-2*” foi submetido e aceito para publicação no periódico intitulado *European Journal of Oral Sciences*. O manuscrito intitulado “*Inhibition of the activity of matrix metalloproteinase 2 by triethylene glycol dimethacrylate*” foi submetido para publicação no periódico intitulado *Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials*, no momento está sendo reformulado de acordo com as sugestões dos revisores para ser re-enviado para revisão.

Os dois manuscritos são apresentados em língua inglesa como anexos nessa Tese de acordo com as normas dos periódicos aos quais foram submetidos para publicação. No entanto, em língua portuguesa eles são apresentados em conjunto, por serem frutos da mesma metodologia, facilitando assim a coesão dessa Tese.

## RESUMO

CARVALHO, Rodrigo Varella de. **Inibição da metaloproteinase 2 por dois monômeros amplamente utilizados na formulação de adesivos dentinários**. 2009. 80f. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) e trietilenoglicol dimetacrilato (TEGDMA) na inibição da metaloproteinase da matriz 2 (MMP-2). Tecidos gengivais de ratos foram incubados em DMEM e a expressão das enzimas secretadas foi analisada por zimografia em tampões de incubação contendo 5 mM de  $\text{CaCl}_2$  (Tris- $\text{CaCl}_2$ ) em 50 mM de Tris-HCl com a adição de diferentes concentrações de HEMA e TEGDMA (0,62; 1,25; 2,5 e 5%) em volume. Para caracterizar as enzimas como MMPs foi realizado ensaio de inibição química específica com 0,5 mM de EDTA (um conhecido inibidor de MMPs) e 0,5 de NEM (um conhecido inibidor de proteinases serinas). Para caracterizar as enzimas como MMP-2 foi realizado o ensaio de imunoprecipitação. As bandas produzidas no gel foram escaneadas e os valores de transmitância foram analisados com o auxílio do programa ImageJ. Os resultados foram submetidos a regressão linear em função da concentração de HEMA e TEGDMA. Três bandas foram identificadas após a zimografia. Essas bandas foram caracterizadas como MMP-2. O zimogênio (72 kDa), a forma intermediária (66 kDa) e a forma ativa da MMP-2 (62 kDa) foram inibidas pelo HEMA e pelo TEGDMA de forma dose-dependente. Nossos resultados sugerem que o HEMA e o TEGDMA podem inibir a expressão da MMP-2 mesmo em pequenas concentrações.

**Palavras-chave:** Metaloproteinases da matriz extracelular, metaloproteinase 2, gelatinase A, 2-hidroxietil metacrilato, trietilenoglicol dimetacrilato, adesivos dentinários, colágeno, camada híbrida.

## SUMMARY

CARVALHO, Rodrigo Varella de. **Inhibition of metalloproteinase 2 by two monomers thoroughly used on the dentin bonding formulation.** 2009. 80f. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The aim of this study was to evaluate the effect of different concentrations of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) triethyleneglycol dimethacrylate (TEGDMA) on the inhibition of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). Mouse gingival explants were cultured overnight in DMEM and the expression of secreted enzymes was analyzed by gelatin zymography in buffers containing 5 mM  $\text{CaCl}_2$  (Tris- $\text{CaCl}_2$ ) in 50 mM Tris-HCl buffer with the addition of HEMA and TEGDMA at different concentrations (0.62, 1.25, 2.5 or 5.0% (v/v)). The gelatinolytic proteinase present in the conditioned media was characterized as matrix metalloproteinase by means of specific chemical inhibition with 0.5 mM of EDTA and 0.5 mM of NEM. The matrix metalloproteinases present in the conditioned media were characterized as MMP-2 by immunoprecipitation. The electrophoretic bands were scanned and the transmittance values were analyzed with ImageJ software. Data was plotted and submitted to linear regression to investigate MMP-2 inhibition as a function of HEMA and TEGDMA concentration. Three major bands were detected in the zymographic assays. Those bands were characterized as MMP-2. Zymogene (72 kDa), intermediate (66 kDa) and active forms of MMP-2 (62 kDa) were inhibited by HEMA and TEGDMA in a dose-dependent way. These findings suggest that HEMA and TEGDMA could inhibit MMP-2 expression even at small concentrations.

**Keywords:** Matrix metalloproteinases, metalloproteinase 2, gelatinase A, 2-hydroxyethyl methacrylate, triethyleneglycol dimethacrylate, dentin bonding agents, collagen, hybrid layer.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1a	Zimografia demonstrando a inibição da expressão da MMP-2 pelo HEMA de forma dose dependente. Controle demonstrando que não houve inibição quando incubado apenas em Tris-CaCl <sub>2</sub> . Caracterização das bandas como MMPs, já que as enzimas foram inibidas pelo EDTA e não-inibidas pelo NEM.....	24
Figura 1b	Zimografia demonstrando a inibição da expressão da MMP-2 pelo TEGDMA de forma dose dependente. Controle demonstrando que não houve inibição quando incubado apenas em Tris-CaCl <sub>2</sub> . Caracterização das bandas como MMPs, já que as enzimas foram inibidas pelo EDTA e não-inibidas pelo NEM.....	24
Figura 2a	Gráficos de regressão linear demonstrando a relação entre a intensidade da banda produzida pelas três formas da enzima (pró-forma, intermediária e ativa) e a concentração de HEMA em percentual.....	26
Figura 2b	Gráficos de regressão linear demonstrando a relação entre a intensidade da banda produzida pelas três formas da enzima (pró-forma, intermediária e ativa) e a concentração de TEGDMA em percentual.....	27
Figura 3a	Mecanismo de inibição hipotético proposto para explicar a inibição da MMP-2 pelo HEMA.....	30
Figura 3b	Dois mecanismos propostos para explicar a inibição da MMP-2 pelo TEGDMA. Formação de complexos entre os grupamentos éter presentes no TEGDMA e o cátion bivalente Zn <sup>2+</sup> e formação de complexos entre o Zn <sup>2+</sup> e as duas carbonilas através da interação ácido-base do tipo Lewis.....	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Diferentes concentrações dos monômeros testados em percentual diluídos no tampão de incubação.....	22
----------	--	----

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

% - por cento

> - maior

°C - graus Celsius

μL - microlitro

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

cm<sup>2</sup> - centímetro quadrado

DMEM - meio Essencial de Eagle Modificado por Dubelcco's

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

h – hora

HEMA – 2-Hidroxietil metacrilato

mL – mililitro

mM – mili Molar

mm<sup>2</sup> - milímetro quadrado

MMPs – metaloproteinases da matriz extracelular

MMP-2 – metaloproteinase 2

N – normal

NEM – n-etil maleimida

PBS - tampão fosfato salino

s - segundos

TEGDMA - trietileno glicol dimetacrilato

x – vezes

## SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>18</b>
<b>3 OBJETIVO .....</b>	<b>19</b>
3.1 Objetivo geral .....	19
3.2. Objetivos específicos .....	19
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
4.1 Reagentes.....	20
4.2 Extração das Metaloproteinases da Matriz 2.....	20
4.3 Zimografia.....	21
4.4 Identificação da MMP por inibição química específica.....	21
4.5 Caracterização da MMP por imunoprecipitação.....	21
4.6 Inibição das MMPs pelos monômeros TEGDMA e HEMA.....	22
4.7 Análise Estatística .....	23
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>33</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>34</b>
ANEXO A: Artigo aceito no European Journal of Oral Sciences.....	24
ANEXO B: Artigo submetido ao Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials.....	

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar do desempenho satisfatória da maioria dos adesivos dentinários em estudos de curto prazo de avaliação, esses materiais deterioram drasticamente quando avaliados em estudos de longevidade (DE MUNCK *et al.*, 2005; BRESCHI *et al.*, 2008). Essa característica tem sido atribuída à degradação que ocorre com o envelhecimento da camada híbrida, que tem sido considerado o principal responsável pela queda da resistência adesiva entre o dente e a restauração (DE MUNCK *et al.*, 2005; BRESCHI *et al.*, 2008), resultando na perda da restauração.

A degradação hidrolítica do polímero resinoso constituinte da camada híbrida é considerada um fator primordial para a queda da resistência adesiva entre o dente e a restauração (DE MUNCK *et al.*, 2005; BRESCHI *et al.*, 2008). Entretanto, atualmente estudos associam a esse fator a degradação enzimática do colágeno dentinário (PASHLEY *et al.*, 2004; HEBLING *et al.*, 2005; CARRILHO, CARVALHO *et al.*, 2007; CARRILHO, GERALDELI *et al.*, 2007). Um crescente número de estudos tem avaliado o efeito de enzimas proteolíticas na degradação do colágeno presente na camada híbrida (NISHITANI *et al.*, 2006; TAY *et al.*, 2006; CARRILHO, GERALDELI *et al.*, 2007). Muitos destes estudos têm atribuído um papel importante nesse tipo de degradação a um grupo de enzimas chamado de metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) (PASHLEY *et al.*, 2004; NISHITANI *et al.*, 2006; TAY *et al.*, 2006). Dentre as MMPs, a metaloproteinase da matriz 2 (MMP-2) é a que está presente em maior quantidade na dentina humana (BOUSHELL *et al.*, 2008; MARTIN-DE LAS HERAS *et al.*, 2000; MAZZONI *et al.*, 2007; MAZZONI *et al.*, 2008).



As MMPs constituem uma família de 24 endopeptidases zinco-dependentes identificadas até o presente momento, relacionadas estrutural e funcionalmente (RAFFETTO e KHALIL, 2008). Coletivamente elas possuem a habilidade de degradar, *in vitro* e *in vivo*, todas as proteínas estruturais da matriz celular, assim como, colágeno intersticial, proteoglicanas e fibronectina (BODE e MASKOS, 2003). São também implicadas nos processos de remodelamento do tecido conjuntivo, no desenvolvimento embrionário, gravidez, crescimento, reparo tecidual, entre outros (STERNLICHT e WERB, 2001; EGEBLAD e WERB, 2002; BODE e MASKOS, 2003).

Tendo em vista as características relatadas anteriormente, estratégias para o desenvolvimento e identificação de materiais inibidores de MMPs têm sido consideradas importantes para o entendimento e intervenção em uma série de processos fisiológicos e patológicos em que as MMPs estão envolvidas. E nesse sentido, o estudo da formação e longevidade da camada híbrida tem sido influenciado por produtos com potencial de inibição de MMPs, com o intuito de melhorar a manutenção e a estabilidade do colágeno constituinte da camada híbrida (HEBLING *et al.*, 2005; CARRILHO, CARVALHO *et al.*, 2007; CARRILHO, GERALDELI *et al.*, 2007).

A clorexidina é uma substância que tem sido usada atualmente com o intuito de aumentar a longevidade das restaurações adesivas. Ela é conhecidamente inibidora das MMPs (GENDRON *et al.*, 1999). Por isso, tem sido aplicada na cavidade a ser restaurada com resina composta após o condicionamento total da dentina com o ácido fosfórico a 37%. A

clorexidina é aplicada abundantemente sobre a dentina desmineralizada, e após o sistema adesivo é aplicado, sem a prévia lavagem da clorexidina aplicada. Esse procedimento tem produzido um aumento e manutenção da resistência adesiva em testes de microtração, tanto em estudos *in vivo*, quanto *in vitro* (CARRILHO, CARVALHO *et al.*, 2007; CARRILHO, GERALDELI *et al.*, 2007). A grande desvantagem da clorexidina é que ele não pode ser co-polimerizada dentro de um sistema adesivo, assim, não pode garantir uma maior estabilidade ao polímero formado.

Grupamentos éteres (presentes no TEGDMA) vêm sendo amplamente estudados devido à sua capacidade de formar complexos com cátions bivalentes como o zinco ou o cálcio (WILLIAMS *et al.*, 2003; CHITTA *et al.*, 2004; GAO *et al.*, 2005). Por outro lado, a coordenação do oxigênio de hidroxilas (presentes no HEMA) com cátions bivalentes também tem sido relatada. Tendo em vista que o sítio catalítico das MMPs possui dois cátions bivalentes, o cálcio e o zinco em sua constituição, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial inibitório da metaloproteinase 2 por dois monômeros metacrilatos, 2-Hidroxiethyl Metacrilato (HEMA) e Trietilenoglicol Dimetacrilato (TEGDMA).

## 2 JUSTIFICATIVA

O maior desafio da odontologia restauradora adesiva atual é a manutenção e melhoramento da estabilidade da camada híbrida, o que conseqüentemente aumentaria a durabilidade das restaurações adesivas. A estabilidade do polímero formado pela polimerização do sistema adesivo tem sido considerada a porção mais susceptível à degradação entre os componentes da camada híbrida.

Porém, com o intuito de melhorar a estabilidade do outro polímero formador da camada híbrida, o colágeno, atualmente têm sido pesquisados inibidores de enzimas envolvidas na degradação do colágeno, como as MMPs. Tendo em vista que o sítio catalítico das MMPs possui cálcio e zinco em sua constituição, e que o monômero metacrilato TEGDMA possui grupamentos éteres (formadores de complexos com cátions bivalentes) e o monômero HEMA possui os oxigênios presentes no seu grupamento hidroxila com possibilidade de formar complexos com cátions bivalentes. O presente estudo pode ajudar no estabelecimento de dois novos grupos de agentes inibidores de MMPs, até então não relatados na literatura. A grande vantagem é que essas substâncias podem ser co-polimerizadas dentro de um sistema adesivo, garantindo uma maior estabilidade ao polímero formado, ao contrário do que acontece com a utilização da clorexidina na forma atual.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial inibitório da metaloproteinase da matriz 2 (MMP-2) por dois monômeros metacrilatos, 2-Hidroxietil Metacrilato (HEMA) e Trietilenoglicol Dimetacrilato (TEGDMA).

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- a) Avaliar a inibição da MMP-2 por 0,62; 1,25; 2,5 e 5% de HEMA.
- b) Avaliar a inibição da MMP-2 por 0,62; 1,25; 2,5 e 5% de TEGDMA.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

O projeto de pesquisa do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas. O estudo foi desenvolvido de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação com Animais adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

### **5.1 Reagentes**

Os monômeros 2-Hidroxietil Metacrilato (HEMA) e Trietilenoglicol Dimetacrilato (TEGDMA) testados no presente estudo foram doados pela empresa Esstech (Essington, PA, USA). O meio de cultivo para extração das MMPs foi comprado da GIBCO (Grand Island, NY, USA). Todos os outros reagentes foram comprados da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA), exceto aqueles citados no corpo do texto.

### **5.2 Extração das metaloproteinases da matriz 2**

Fragmentos de tecido gengival do palato, da porção vestibular e lingual do osso maxilar e mandibular, foram dissecados da boca de dois ratos com quatro semanas de vida. Os fragmentos foram lavados em 10 mL de PBS (tampão fosfato salino) por 30 min. em temperatura ambiente (24°C). Os fragmentos foram levados a uma capela de fluxo laminar, fragmentados com o auxílio de lâminas de bisturi em uma placa de vidro, e logo após, acondicionados em um tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultivo em estufa a 37°C por 24h. Os fragmentos foram descartados e o meio de cultivo foi centrifugado a 1.000 rpm em temperatura ambiente. O

sobrenadante foi armazenado a uma temperatura de - 80°C até o momento dos experimentos.

### **5.3 Zimografia**

A atividade proteolítica foi examinada em gel de poliacrilamida a 10% contendo 0,05% de gelatina. O meio armazenado a - 80°C foi misturado ao tampão de amostra (2% SDS; 125 mM Tris-HCl (pH 6,8); 10% de glicerol e 0,001% de azul de bromofenol) e então a eletroforese foi realizada. Após a eletroforese, o gel foi lavado duas vezes em Triton X-100 (2%) por 60 min a temperatura ambiente e então incubado a 37°C por 24 h em tampão 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) contendo 5 mM CaCl<sub>2</sub> (Tris-CaCl<sub>2</sub>). Após a incubação, os géis foram corados com Azul de Coomassie G-250 a 0,05% (Bio Rad, Richmond, CA). A atividade gelatinolítica foi detectada como bandas não coradas no gel corado em azul.

### **5.4 Identificação da MMP por inibição química específica**

Para identificar as enzimas presentes no meio como MMPs, experimentos paralelos de inibição foram realizados. Tiras do gel de gelatina com mais ou menos 1 cm de largura foram incubados em tampão de Tris–CaCl<sub>2</sub> a 37°C por 24 h com a adição de 0,5 mM de EDTA (Reagen, Brazil) um conhecido e poderoso inibidor de MMPs, enquanto 0,5 mM de NEM (N-etil-maleimida) foi usado para inibir a atividade das proteinases serinas.

### **5.5. Caracterização da MMP por imunoprecipitação**

O meio de cultivo contendo MMPs foi submetido a uma reação de imunoprecipitação com anticorpo anti-humano MMP-2 IgG (The Binding Site, Birmingham, UK) por 4 h à temperatura ambiente. O imuno-complexo (anticorpo MMP-2 + proteinase MMP-2) foi precipitado usando a proteína A-Sepharose Beads (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) por 14 h à temperatura ambiente. Após a lavagem do material não adsorvido à Sepharose com 50 mM Tris pH 7,4 (200 mM NaCl), o material imunoprecipitado foi homogeneizado em um tampão não redutor para zimografia por 10 minutos a 70°C e foi submetido a zimografia.

### 5.6 Inibição das MMPs pelos monômeros TEGDMA e HEMA

Para examinar o efeito dos diferentes tipos e concentrações de monômeros na atividade enzimática, o meio condicionado contendo MMPs foi carregado em um gel de poliacrilamida contendo gelatina. Após a eletroforese, os géis foram cortados em tiras de aproximadamente 1 cm de largura e cada tira foi incubada a 37°C por 24 h em tampão Tris-CaCl<sub>2</sub> com a adição de diferentes concentrações dos monômeros (Tabela 1). Após a adição dos monômeros no tampão de incubação, o pH foi ajustado para 7,4 e, então, as tiras foram incubadas a 37°C por 24 h em tampão 50 mM Tris-HCl; pH 7,4; contendo 5 mM CaCl<sub>2</sub> (Tris-CaCl<sub>2</sub>). Após a incubação, os géis foram corados com 0,05% de azul de Coomassie (Brilliant Blue G-250) por 30 min.

<b>Monômeros</b>	<b>Concentrações dos monômeros em percentual</b>			
TEGDMA	0,62	1,25	2,5	5
HEMA	0,62	1,25	2,5	5

Tabela 1 – Diferentes concentrações dos monômeros em percentual diluídos no tampão de incubação.

Para quantificar a inibição relativa da MMP pelos diferentes tipos e concentrações dos monômeros, as bandas foram digitalizadas e a transmitância (os valores de transmitância do zimogênio, da forma intermediária e da forma ativa) foram analisadas com o programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). O percentual da inibição da atividade enzimática foi relacionado com o tipo e concentração do monômero.

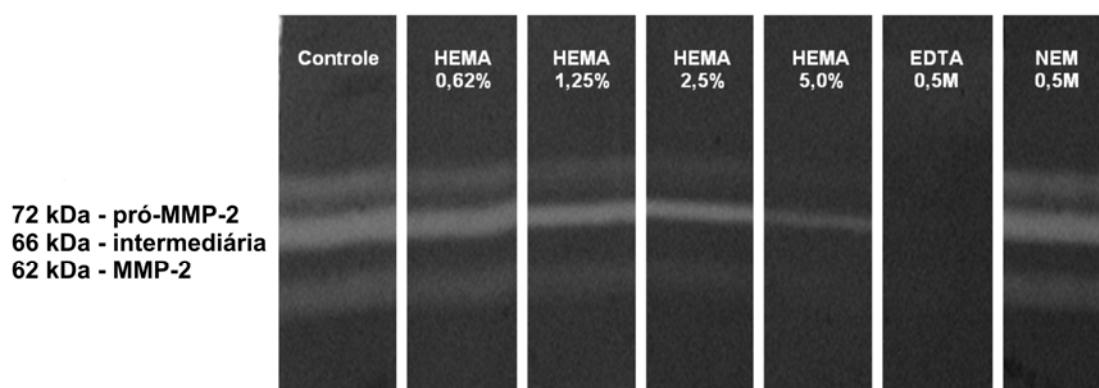
### **5.7 Análise Estatística**

A intensidade de transmitância das bandas do gel foram quantificadas em *pixels* na escala de cinza com auxílio do programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). A partir disso, os dados foram transformados em valores numéricos. E então, submetidos à regressão linear para investigar a inibição da MMP-2 como função da concentração de HEMA e de TEGDMA no software SigmaPlot 9.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

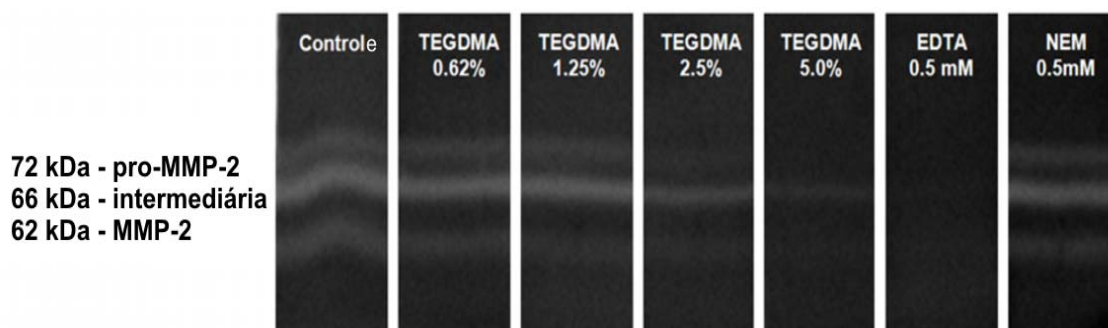


## 6. RESULTADOS

Foram detectadas três bandas com a zimografia (Figuras 1a e 1b). A banda de maior intensidade correspondia a um peso molecular de aproximadamente 66 kDa (banda intermediária). Duas bandas de menor intensidade correspondiam aos pesos moleculares de 72 e 62 kDa. A banda de 72 kDa foi caracterizada como pro-MMP-2, enquanto a banda de 62 kDa representava a forma ativa da MMP-2.



**Figura 1a** - Zimografia demonstrando a inibição da expressão da MMP-2 pelo HEMA de forma dose dependente. Controle demonstrando que não houve inibição quando incubado apenas em Tris-CaCl<sub>2</sub>. Caracterização das bandas como MMPs, já que as enzimas foram inibidas pelo EDTA e não-inibidas pelo NEM.

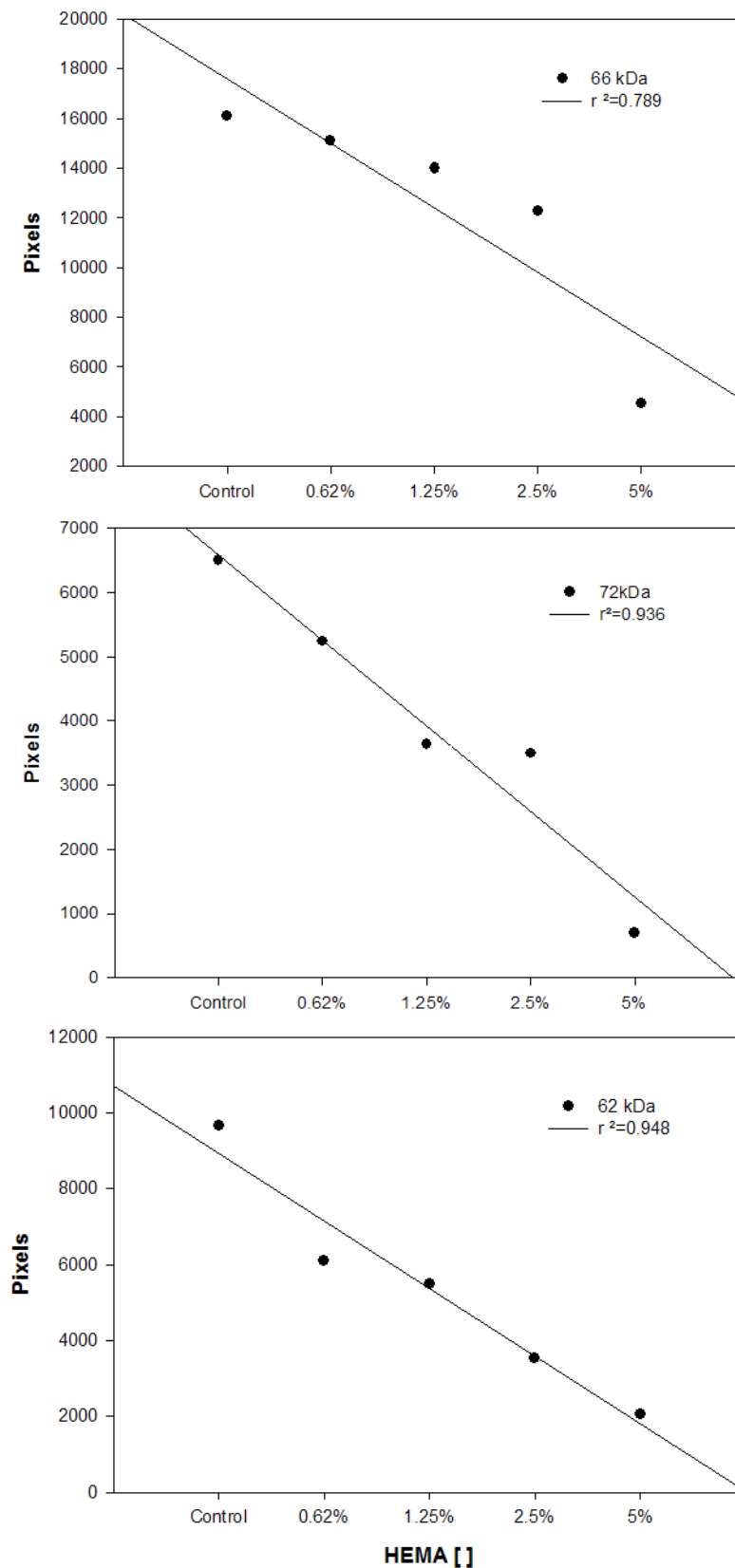


**Figura 1b** - Zimografia demonstrando a inibição da expressão da MMP-2 pelo TEGDMA de forma dose dependente. Controle demonstrando que não

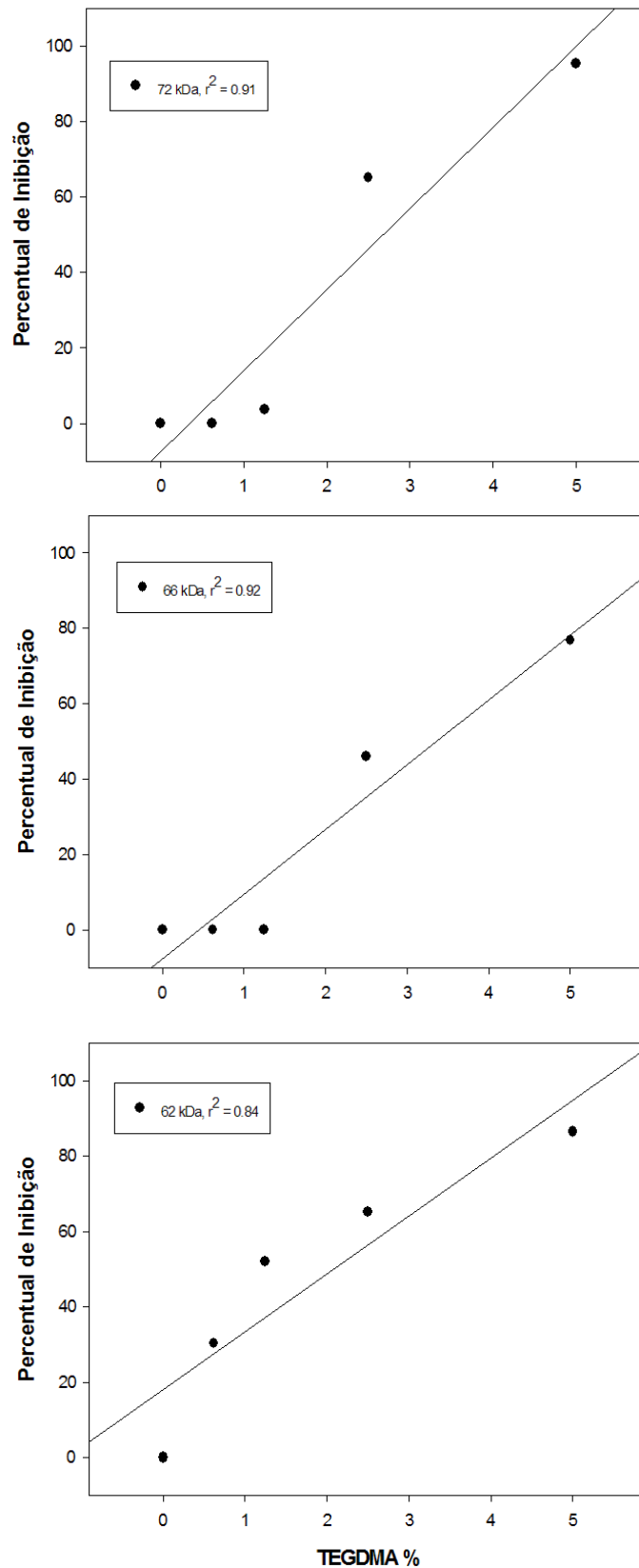
houve inibição quando incubado apenas em Tris-CaCl<sub>2</sub>. Caracterização das bandas como MMPs, já que as enzimas foram inibidas pelo EDTA e não-inibidas pelo NEM.

As bandas foram inibidas pelo EDTA e não inibidas pelo NEM, o que as caracterizou como bandas referentes a metaloproteinases da matriz extracelular (Figuras 1a e 1b).

A expressão das enzimas foi inibida de forma dose-dependente, tanto pelo HEMA, quanto pelo TEGDMA. Essa característica pode ser observada facilmente nas Figuras 1a e 1b. No entanto, para comprovar isso, gráficos de regressão linear foram confeccionados a partir dos valores de transmitância das bandas obtidos com o auxílio do programa ImageJ. As Figuras 2a e 2b demonstram que a inibição da atividade da MMP-2 pelos dois monômeros se adaptou bem ao modelo de regressão linear.



**Figura 2a** - Gráficos de regressão linear demonstrando a relação entre a intensidade da banda produzida pelas três formas da enzima (pró-forma, intermediária e ativa) e a concentração de HEMA em percentual.



**Figura 2b** - Gráficos de regressão linear demonstrando a relação entre a intensidade da banda produzida pelas três formas da enzima (pró-forma, intermediária e ativa) e a concentração de TEGDMA em percentual.

## 7. DISCUSSÃO

A metaloproteinase da matriz 2 (MMP-2), também chamada de Gelatinase A, é envolvida na degradação de colágeno denaturado tipo I, colágeno tipo IV (maior componente orgânico da dentina humana), elastase e vários outros componentes da matriz extracelular (BODE e MASKOS, 2003). A MMP-2 é, também, a gelatinase presente em maior quantidade na dentina humana (MARTIN-DE LAS HERAS *et al.*, 2000). Além disso, existem evidências que indicam que as MMP-2 exerce um papel importante na degradação da união entre a resina e a dentina (PASHLEY *et al.*, 2004). A ativação da MMP-2 e da MMP-9 (também chamada de Gelatinase B) tem demonstrado também um papel crucial na destruição da dentina pela cárie (TJADERHANE *et al.*, 1998), e na formação e remodelamento da matriz extracelular durante o reparo tecidual (SALO *et al.*, 1994). Adicionalmente, essas enzimas podem potencializar a degradação da matriz extracelular pela ativação da colagenase 3 (MMP-13) e da colagenase neutrofílica (MURPHY e KNAUPER, 1997). Já que as MMPs são conhecidas por participar da mineralização da pré-dentina, a inibição dessas enzimas pode interferir na calcificação da dentina reparativa.

A clorexidina (CHX) é um conhecido inibidor de MMPs que tem sido indicado atualmente para aumentar a longevidade das restaurações adesivas (HEBLING *et al.*, 2005; CARRILHO, CARVALHO *et al.*, 2007; CARRILHO, GERALDELI *et al.*, 2007). Essa estratégia consiste na aplicação da CHX após a exposição da malha de colágeno pelo condicionamento da dentina com ácido fosfórico a 37%. A clorexidina pode inibir a MMP-2 pela denaturação protéica ou pelo mecanismo de quelação

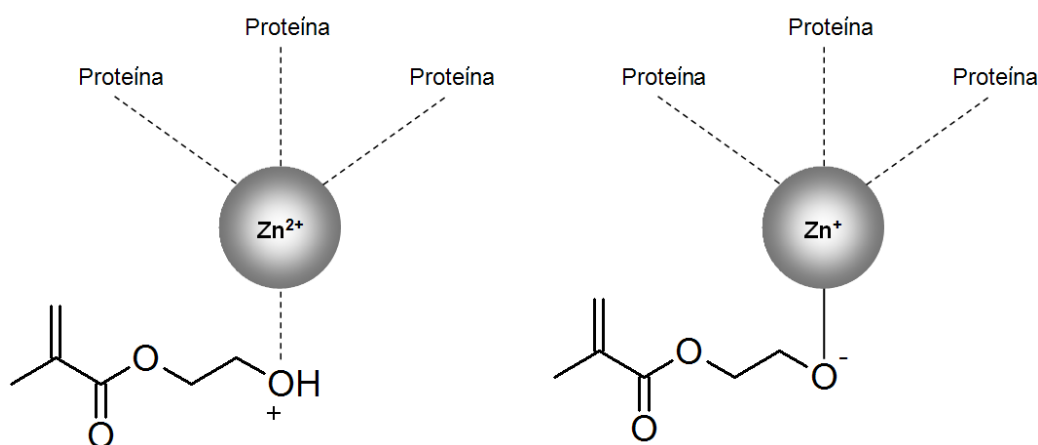
de cálcio (GENDRON *et al.*, 1999). O tipo de inibição provocada pela CHX dependerá da concentração usada (GENDRON *et al.*, 1999). Entretanto, não está determinado quanto tempo pode durar a inibição da MMP pela clorexidina na dentina *in vivo*, uma vez que a CHX não pode ser estabilizada dentro de uma matriz polimérica. Além disso, os períodos de avaliação do aumento da durabilidade na adesão não passam de um ano, o que representa muito pouco para aquilo que se deseja na durabilidade das restaurações adesivas.

Assim como a CHX, cimentos de óxido de zinco, sais metálicos e amálgamas dentários, têm sido identificados como inibidores de MMPs (de SOUZA *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2004). O mecanismo de inibição enzimática pelos metais não é completamente entendido. É assumido que íons metálicos se ligam a sítios enzimáticos específicos, causando mudanças conformacionais que inativariam a função catalítica das enzimas (de SOUZA *et al.*, 2000).

Apesar das possíveis aplicações de materiais restauradores inibidores de MMPs, até o presente momento, não existem estudos avaliando o efeito inibitório dos monômeros metacrilatos presentes nos adesivos dentinários. De fato, experimentos anteriores sugerem que os sistemas adesivos agem como ativadores da atividade gelatinolítica/colagenolítica na dentina (NISHITANI *et al.*, 2006; TAY *et al.*, 2006). Entretanto, também tem sido demonstrado um mecanismo de ativação das MMPs dependente do pH (TJADERHANE *et al.*, 1998). O mecanismo de ativação ácida da atividade da MMP é desconhecido (BIRKEDAL-HANSEN, 1995). Mas, como os sistemas adesivos são ácidos,

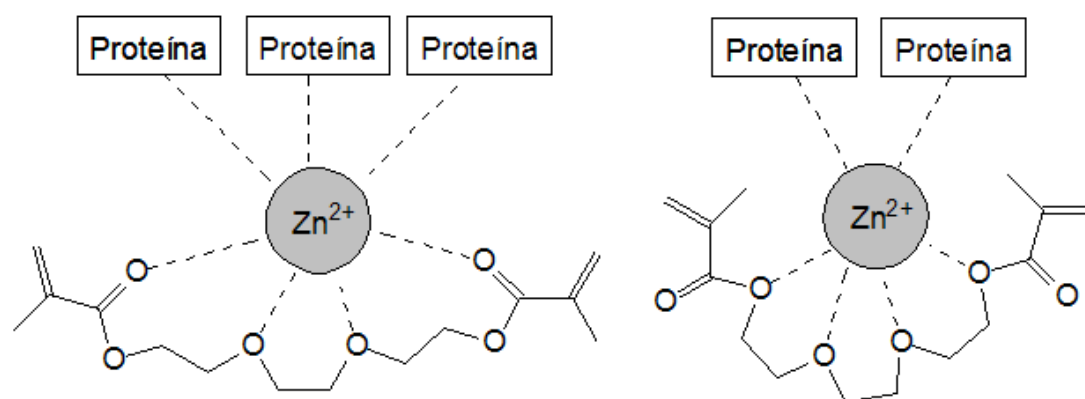
isso poderia hipoteticamente explicar porque os adesivos ativaram as MMPs nesses estudos.

O HEMA e o TEGDMA são monômeros extensivamente usados na formulação de sistemas adesivos dentinários, sendo importantes componentes dos materiais restauradores adesivos. Os resultados do presente estudo demonstram que mesmo em pequenas concentrações o HEMA e o TEGDMA inibem a atividade da MMP-2, que é ativa na degradação colágeno fibrilar denaturado, elastase e vários outros componentes da matriz extracelular (BIRKEDAL-HANSEN, 1995). O mecanismo hipotético proposto para explicar a inibição da MMP-2 pelo HEMA baseia-se na coordenação do oxigênio da hidroxila presente na molécula de HEMA com o sítio catalítico da MMP-2 que possui dois cátions bivalentes na sua constituição, o cálcio e o zinco, essa inibição seria reversível (Figura 3a). No entanto, outro mecanismo de inibição baseia-se na perda do próton, levando a uma ligação covalente, causando inibição irreversível (Figura 3a).



**Figura 3a** - Mecanismo de inibição hipotético proposto para explicar a inibição da MMP-2 pelo HEMA.

É bem conhecido que éteres de coroa podem formar complexos estáveis com íons bivalentes metálicos (IJERI e SRIVASTAVA, 2001; MATSUYAMA et al., 1991). Isso sugere que a inibição da MMP-2 produzida pelo TEGDMA pode ser explicada pela formação de um complexo entre as ligações éteres presentes no TEGDMA e o cátion bivalente ( $Zn^{2+}$ ) presente no sítio catalítico da MMP (Figura 3b) ou então, pela complexação com as duas carbonilas através de ligações ácido base tipo Lewis (Figura 3b).



**Figura 3b** - Dois mecanismos propostos para explicar a inibição da MMP-2 pelo TEGDMA. Formação de complexos entre os grupamentos éter presentes no TEGDMA e o cátion bivalente  $Zn^{2+}$  e formação de complexos entre o  $Zn^{2+}$  e as duas carbonilas através da interação ácido-base do tipo Lewis.

As MMPs são lentamente liberadas através do tempo (TJADERHANE et al., 1998), a possibilidade da adição de um inibidor de MMPs polimerizável que é relativamente estável na matriz polimérica pode ser considerada como uma vantagem. Entretanto, quando uma camada de colágeno está presente, Os resultados do presente estudo precisam ser interpretados com cuidado, uma vez que sistemas adesivos, outros



componentes, como monômeros ácidos, estão presentes o que pode influenciar o efeito da composição total do adesivo na atividade da MMP.

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo sugerem que, tanto o Trietilenoglicol Dimetacrilato (TEGDMA), quanto o 2-Hidroxietil Metacrilato (HEMA), inibiram a atividade da metaloproteinase da matriz 2 *in vitro*, mesmo em pequenas concentrações. No entanto, esses resultados devem ser analisados cuidadosamente, pois os sistemas adesivos possuem outros produtos em sua composição, inclusive monômeros ácidos. Assim, nossos resultados chamam a atenção para a necessidade de estudos que estabeleçam o efeito *in vivo* dos materiais testados na inibição das MMPs.

## 8 REFERÊNCIAS

BIRKEDAL-HANSEN H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. **Curr Opin Cell Biol**, v.7, n.5, p.728-35, 1995.

BODE, W.; MASKOS, K. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. **Biol Chem**, v.384, n.6, p.863-72, 2003.

BOUSHELL, L. W.; KAKU, M.; MOCHIDA, Y.; BAGNELL, R.; YAMAUCHI, M. Immunohistochemical localization of matrixmetalloproteinase-2 in human coronal dentin. **Arch Oral Biol**, v.53, n.2, p.109-16, 2008.

BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; RUGGERI, A.; CADENARO, M.; DI LENARDA, R.; DE STEFANO DORIGO, E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. **Dent Mater**, v.24, n.1, p.90-101, 2008.

CARRILHO, M. R.; CARVALHO, R. M.; DE GOES, M. F.; DI HIPOLITO, V.; GERALDELI, S.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H.; TJADERHANE, L. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. **J Dent Res**, v.86, n.1, p.90-4, 2007.

CARRILHO, M. R.; GERALDELI, S.; TAY, F.; DE GOES, M. F.; CARVALHO, R. M.; TJADERHANE, L.; REIS, A. F.; HEBLING, J.; MAZZONI, A.; BRESCHI, L.; PASHLEY, D. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. **J Dent Res**, v.86, n.6, p.529-33, 2007.

CHITTA, R.; ROGERS, L. M.; WANKLYN, A.; KARR, P. A.; KAHOL, P. K.; ZANDLER, M. E.; D'SOUZA, F. Electrochemical, spectral, and computational studies of metalloporphyrin dimers formed by cation complexation of crown ether cavities. **Inorg Chem**, v.43, n.22, p.6969-78, 2004.

DE MUNCK, J.; VAN LANDUYT, K.; PEUMANS, M.; POITEVIN, A.; LAMBRECHTS, P.; BRAEM, M.; VAN MEERBEEK, B. A critical review of

the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. **J Dent Res**, v.84, n.2, p.118-32, 2005.

DE SOUZA AP, GERLACH RF, LINE SR. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. **Dent Mater**, v.16, n.2, p.103-8, 2000.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, v.2, n.3, p.161-74, 2002.

GAO, F.; RUAN, W. J.; CHEN, J. M.; ZHANG, Y. H.; ZHU, Z. A. Spectroscopy, NMR and DFT studies on molecular recognition of crown ether bridged chiral heterotrinnuclear salen Zn(II) complex. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v.62, n.4-5, p.886-95, 2005.

GENDRON, R.; GRENIER, D.; SORSA, T.; MAYRAND, D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.6, n.3, p.437-9, 1999.

HEBLING, J.; PASHLEY, D. H.; TJADERHANE, L.; TAY, F. R. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. **J Dent Res**, v.84, n.8, p.741-6, 2005.

IJERI VS, SRIVASTAVA AK. The complexation behaviour of crown ethers with some divalent transition metal and silver ions in a 40%(v/v) ethanol plus water medium. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v.4, p.943-947, 2001.

MARTIN-DE LAS HERAS, S.; VALENZUELA, A.; OVERALL, C. M. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. **Arch Oral Biol**, v.45, n.9, p.757-65, 2000.

MATSUYAMA H, ARIMURA T, MIYAKE Y, TERAMOTO M. Equilibrium and Kinetic-Studies on Complex-Formation Reaction between Crown Ethers and Bivalent Transition-Metal Ions. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 1991;64(6):2027-2029.

MAZZONI, A.; MANNELLO, F.; TAY, F. R.; TONTI, G. A.; PAPA, S.; MAZZOTTI, G.; DI LENARDA, R.; PASHLEY, D. H.; BRESCHI, L. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. **J Dent Res**, v.86, n.5, p.436-40, 2007.

MAZZONI, A.; PASHLEY, D. H.; TAY, F. R.; GOBBI, P.; ORSINI, G.; RUGGERI, A., JR.; CARRILHO, M.; TJADERHANE, L.; DI LENARDA, R.; BRESCHI, L. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: Correlative FEI-SEM/TEM analysis. **J Biomed Mater Res A**, 2008.

MURPHY G, KNAUPER V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? **Matrix Biol**, v.15, n.8-9, p.511-8, 1997.

NISHITANI, Y.; YOSHIYAMA, M.; WADGAONKAR, B.; BRESCHI, L.; MANNELLO, F.; MAZZONI, A.; CARVALHO, R. M.; TJADERHANE, L.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. **Eur J Oral Sci**, v.114, n.2, p.160-6, 2006.

PASHLEY, D. H.; TAY, F. R.; YIU, C.; HASHIMOTO, M.; BRESCHI, L.; CARVALHO, R. M.; ITO, S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. **J Dent Res**, v.83, n.3, p.216-21, 2004.

RAFFETTO, J. D.; KHALIL, R. A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. **Biochem Pharmacol**, v.75, n.2, p.346-59, 2008.

SALO T, MAKELA M, KYLMANIEMI M, AUTIO-HARMAINEN H, LARVAJA H. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. **Lab Invest**, v.70, n.2, p.176-82, 1994.

SANTOS MC, DE SOUZA AP, GERLACH RF, TREVILATTO PC, SCAREL-CAMINAGA RM, LINE SR. Inhibition of human pulpal gelatinases (MMP-2

and MMP-9) by zinc oxide cements. **J Oral Rehab**, v.31, n.7, p.660-4, 2004.

SOUZA AP, GERLACH RF, LINE SR. Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam. **Biomaterials**, v.22, n.14, p. 2025-30, 2001.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.17, p.463-516, 2001.

TAY, F. R.; PASHLEY, D. H.; LOUSHINE, R. J.; WELLER, R. N.; MONTICELLI, F.; OSORIO, R. Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. **J Endod**, v.32, n.9, p.862-8, 2006.

TJADERHANE, L.; LARJAVA, H.; SORSA, T.; UITTO, V. J.; LARMAS, M.; SALO, T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. **J Dent Res**, v.77, n.8, p.1622-9, 1998.

WILLIAMS, S. M.; BRODBELT, J. S.; HUANG, Z.; LAI, H.; MARCHAND, A. P. Complexation of silver and co-recovered metals with novel aza-crown ether macrocycles by electrospray ionization mass spectrometry. **Analyst**, v.128, n.11, p.1352-9, 2003.

# **ANEXO A**



**2-hydroxyethyl methacrylate as an inhibitor of matrix metalloproteinase 2**

Journal:	<i>European Journal of Oral Sciences</i>
Manuscript ID:	EOS-3440-MAN-08.R2
Manuscript Type:	Original Manuscript
Date Submitted by the Author:	02-Oct-2008
Complete List of Authors:	Carvalho, Rodrigo; Federal University of Pelotas, Department of Operative Dentistry Ogliari, Fabrício; Federal University of Pelotas, Operative Dentistry Souza, Ana Paula; Piracicaba Dental School, Department of Morphology Silva, Adriana; Federal University of Pelotas, Operative Dentistry Petzhold, César; UFRGS, DQO Line, Sergio R. P.; Piracicaba Dental School, Department of Morphology Piva, Evandro; Federal University of Pelotas, Operative Dentistry; Dentistry School/ UFPEL, Operative Dentistry Etges, Adriana; Federal University of Pelotas, Department of Oral Pathology
Research Area:	In vitro experiment, Biomaterials, Dental materials, laboratory
Keywords (Please write 3 to 5 keywords according to Index Medicus):	Matrix metalloproteinases, Gelatinase A, Matrix metalloproteinase 2, 2-Hydroxyethyl methacrylate, Polyacrylamide gel electrophoresis



Copy



**2-hydroxyethyl methacrylate as an inhibitor of matrix metalloproteinase 2**

Rodrigo Varella de Carvalho<sup>a§</sup>, Fabrício Aulo Ogliari<sup>a</sup>, Ana Paula de Souza<sup>b</sup>,  
Adriana Fernandes da Silva<sup>a</sup>, Cesar Liberato Petzhold<sup>c</sup>, Sergio Roberto Peres  
Line<sup>b</sup>, Evandro Piva<sup>a</sup>, Adriana Etges<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Morphology, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil

<sup>c</sup> Chemistry Institute, Organic Chemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, RS, Brazil

<sup>d</sup> Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil

**Running title:** HEMA as an inhibitor of MMP-2

**Corresponding author:**

<sup>§</sup> School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

Rua Gonçalves Chaves, 457, Pelotas, RS, Brasil.

CEP: 96015-560. Tel/Fax: +55-53-3222-6690.

E-mail: rodrigo.varella@gmail.com

1  
2  
3 Carvalho RV, Ogliari FA, Souza AP, Silva AF, Petzhold CL, Line SRP, Piva E,  
4  
5 Etges A. 2-hydroxyethyl methacrylate as an inhibitor of matrix metalloproteinase  
6  
7  
8 2. *Eur J Oral Sci*  
9

## 10 11 **ABSTRACT**

12  
13  
14 This This study evaluated the effect of different concentrations of 2-hydroxyethyl  
15 methacrylate (HEMA) on the inhibition of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) *in*  
16  
17 *vitro*. Mouse gingival explants were cultured overnight in Dulbecco's Modified  
18  
19 Eagle's Medium and the expression of secreted enzymes was analyzed by  
20  
21 gelatin zymography, and the effects of different amounts of HEMA on enzyme  
22  
23 activity were analyzed. The gelatinolytic proteinases present in the conditioned  
24  
25 media were characterized as matrix metalloproteinases (MMPs) by means of  
26  
27 specific chemical inhibition. The MMPs present in the conditioned media were  
28  
29 identified as MMP-2 by immunoprecipitation. Three major bands were detected  
30  
31 in the zymographic assays and characterized by respective molecular weight:  
32  
33 zymogene (72 kDa), intermediate (66 kDa) and active forms of MMP-2 (62  
34  
35 kDa). All forms of MMP-2 were inhibited by HEMA in a dose-dependent  
36  
37 manner, implying that MMP-2 may be inhibited by HEMA *in vivo*.  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48

49 **Key words:** Matrix metalloproteinases; Gelatinase A; Matrix metalloproteinase  
50  
51 2; 2-Hydroxyethyl methacrylate; Polyacrylamide gel electrophoresis.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 Dr. Rodrigo Varella de Carvalho  
4

5  
6 School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.  
7

8  
9 Rua Gonçalves Chaves, 457, Pelotas, RS, Brasil.

10  
11 CEP: 96015-560

12  
13  
14 Telefax: +55-53-32226690

E-mail: rodrigo.varella@gmail.com

15  
16  
17  
18  
19 **Accepted for publication October 2008**  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Manuscript Copy

1  
2  
3 Despite the satisfactory performance of contemporary dental adhesives in short  
4 term studies, most of these materials deteriorate when evaluated over time (1,  
5 2). One of the reasons, it can be related with the susceptibility to degradation of  
6 the polymer that constitutes the hybrid layer, as well as collagen with should be  
7 regarded as major factors. It was recently hypothesized that collagen  
8 degradation can occur over time via host-derived matrix metalloproteinases  
9 (MMPs) that are released slowly over time (3).

10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21 MMPs constitute a family of multidomain zinc endopeptidases, which are  
22 involved in extracellular matrix degradation and a number of other important  
23 biological processes (4). These are widely distributed to an organism and are  
24 involved in physiological and pathological processes (4). MMPs are capable of  
25 degrading all kinds of extracellular matrix protein components *in vitro* and *in*  
26 *vivo* (4). All members of this family have zinc- and calcium-binding catalytic  
27 domain, thus depending on these ions for their activity (4). At least 24 MMPs  
28 have been characterized (5), some of these MMPs (e.g. matrix  
29 metalloproteinase 2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) attack  
30 collagen and their sub-products, like gelatine (4). Moreover, MMP-2 is the  
31 metalloproteinase present in larger amounts in the human dentine (6).

32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
It is known that chemicals, such chlorhexidine and ethylene diamine  
tetracetic acid (EDTA) are effective in the inhibition of MMPs (3, 7, 8). The  
application of an inhibitory agent in the clinical bonding procedure was  
suggested, showing a more satisfactory performance of the bond interfaces  
over time (9-11). However, little is known about the effect of the monomers that  
constitute the dental adhesives on the activity of MMPs. The 2-hydroxyethyl  
methacrylate (HEMA) is a water soluble monomer present in most of the current

1  
2  
3 dental adhesives. Several studies have show that HEMA is leached of the  
4  
5 restoring materials even after adequate polymerization (12), many times  
6  
7 entering in contact with the dental pulp. This guarantees that HEMA is a  
8  
9 material that can be found in direct contact with the exposed mesh of collagen,  
10  
11 even after polymerization of the adhesive system.  
12  
13  
14

15  
16 However, despite the potential applications of MMP inhibitors in dental  
17  
18 adhesive materials, there are no studies, so far, that evaluate the inhibitory  
19  
20 effect on MMP activity by monomers present in dental adhesives. In line with  
21  
22 the studies that demonstrate MMPs activator effect by adhesive systems (13,  
23  
24 14) the hypothesis of the present study is that HEMA doesn't show inhibitory  
25  
26 effect on MMP-2. Thus, the aim of the present study was to examine the effect  
27  
28 of different concentrations of HEMA on the activity of MMP-2.  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35

## 36 **MATERIALS AND METHODS**

### 37 **Chemicals**

38  
39  
40 HEMA was supplied by Esstech (Essington, PA, USA). Cell culture  
41  
42 medium and reagents were obtained from GIBCO (Grand Island, NY, USA). All  
43  
44 reagents were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA)  
45  
46 unless otherwise noted.  
47  
48  
49  
50  
51  
52

### 53 **Collection and preparation of MMP-2**

54  
55 Mouse gingival tissue specimens were dissected from palatal, lingual and  
56  
57 buccal sites from 2 mice (aged 4 wk). This project was been approved by the  
58  
59 Research Ethical Committee and was carried out consistent with the principles  
60

1  
2  
3 of the Declaration of Helsinki. Immediately following excision, the tissue  
4  
5 specimens were pooled and washed in Dulbecco's Modified Eagle Medium  
6  
7 (DMEM) containing 80 mg/ml gentamicin at room temperature for 30 min. After  
8  
9 washing, the specimens were incubated in DMEM containing 40 mg/ml  
10  
11 gentamicin at 37°C for 24 h. Following this step, gingival fragments were  
12  
13 discarded and the cell culture conditioned medium (DMEM) containing the  
14  
15 secreted MMPs were frozen at -70°C until analysis for enzyme activity.  
16  
17  
18  
19

## 20 21 **Zymography**

22  
23  
24 The proteolytic activity was examined on 10% polyacrylamide gels  
25  
26 containing 0.05% gelatin. The conditioned medium was mixed with an equal  
27  
28 volume of non-reducing sample buffer (2% SDS; 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10%  
29  
30 glycerol and 0.001% bromophenol blue) and then electrophoresed. After  
31  
32 electrophoresis, the gels were washed twice in 2% Triton X-100 for 60 min at  
33  
34 room temperature and then incubated at 37°C for 24 h in 50 mM Tris-HCl  
35  
36 buffer, at pH 7.4, containing 5 mM CaCl<sub>2</sub> (Tris-CaCl<sub>2</sub>). Following incubation, the  
37  
38 gels were stained with 0.05% Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio Rad,  
39  
40 Richmond, CA, USA). The gelatinolytic activity was detected as unstained  
41  
42 bands.  
43  
44  
45  
46  
47

## 48 49 **Identification of MMPs**

50  
51 To assess the identity of the lytic bands present in the conditioned media,  
52  
53 parallel experiments using proteinase inhibitions were performed. Gelatin-  
54  
55 containing gels were incubated in Tris-CaCl<sub>2</sub> buffer at 37°C for 24 h with the  
56  
57 addition of 0.5 mM of EDTA (Reagen, City?, Brazil) to inhibit lytic activities due  
58  
59  
60

1  
2  
3 to MMP-2, while 0.5 mM NEM (N-ethyl-maleimide) was used to inhibit activities  
4  
5 due to serine proteinases.  
6  
7

### 8 **Characterization of MMP-2 by immunoprecipitation**

9  
10 Conditioned medium was subjected to an immunoprecipitation reaction  
11  
12 with sheep anti-human MMP-2 IgG (The Binding Site, Birmingham, England).  
13  
14 The immunocomplexes were precipitated with protein A-Sepharose beads  
15  
16 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) for 14 h at room temperature. After  
17  
18 washing non-specific Sepharose-adsorbed material with TBS, the  
19  
20 immunoprecipitated material was eluted with nonreducing sample buffer for 10  
21  
22 min at 70°C and assayed by gelatin zymography.  
23  
24  
25  
26  
27

### 28 **Inhibition of metalloproteinase activity by HEMA**

29  
30  
31 In order to examine the effect of different concentrations of HEMA on  
32  
33 enzyme activity, a conditioned medium containing MMPs was loaded on  
34  
35 preparative gelatin-containing polyacrylamide gels. After electrophoresis, the  
36  
37 gels were cut in strips of approximately 1 cm, and each strip was incubated at  
38  
39 37°C for 24 h in Tris-CaCl<sub>2</sub> buffer containing one of the following experimental  
40  
41 conditions: Tris-CaCl<sub>2</sub>, 0.62, 1.25, 2.5 and 5.0% v/v of HEMA. After adding the  
42  
43 monomers to the solution, the pH was adjusted to 7.4. and then incubated at  
44  
45 37°C for 24 h in 50 mM Tris-HCl buffer, containing 5 mM CaCl<sub>2</sub> (Tris-CaCl<sub>2</sub>).  
46  
47 Following incubation, the gels were stained with 0.05% Coomassie Brilliant Blue  
48  
49 G-250.  
50  
51  
52  
53

54  
55 In order to quantify the relative inhibition of MMPs by different  
56  
57 concentrations of HEMA, electrophoretic bands were scanned and the  
58  
59 transmittance (the transmittance values of the zymogen, intermediate and  
60

1  
2  
3 active form were added) were analyzed with the ImageJ software (NIH).  
4  
5 Inhibition of the enzyme activity was plotted against the monomer  
6  
7 concentration. Each assay was done in triplicate and was repeated at least two  
8  
9 times. Data was plotted and submitted to linear regression to investigate MMP-2  
10  
11 inhibition as a function of HEMA concentration.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18

## 19 RESULTS

20  
21  
22 Three major bands were detected in the zymographic assays (Fig. 1).  
23  
24 The band of larger intensity corresponds to the approximate molecular mass of  
25  
26 66 kDa (intermediate band). Two other bands of smaller intensity correspond to  
27  
28 an approximate molecular mass of 72 and 62 kDa. The band of 72 kDa is  
29  
30 characterized as pro-MMP-2, while band of 62 kDa determines activity form of  
31  
32 MMP-2.  
33  
34  
35

36  
37 Even with small concentrations of HEMA (0.62, 1.25, 2.5 and 5.0%), all  
38  
39 three bands were inhibited in a dose-dependent way after incubation for 24h in  
40  
41 a solution containing 5 mM  $\text{CaCl}_2$  (Tris- $\text{CaCl}_2$ ) in 50 mM Tris-HCl buffer with the  
42  
43 addition of HEMA (Fig. 1). The largest HEMA concentration (5%) used in this  
44  
45 study produced a strong inhibition of MMPs. The intermediate band (66 kDa)  
46  
47 was not completely inhibited with HEMA (5%). It was showed that MMP-2  
48  
49 inhibition can be well predicted with a linear regression model, considering  
50  
51 HEMA concentration with pro-form ( $r^2 = 0.93$ ), intermediate form ( $r^2 = 0.97$ ) and  
52  
53 active form of MMP-2 ( $r^2 = 0.81$ ) ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2).  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 These enzymes were characterized as matrix metalloproteinases since  
4 their activities were inhibited by EDTA (Fig. 1) and that NEM (a thiol-proteinase  
5 inhibitor) had no effect on the enzyme activity (Fig. 1).  
6  
7  
8  
9

## 10 11 12 13 14 **DISCUSSION**

15  
16  
17 MMP-2, also known as gelatinase A, when activated is able to degrade  
18 fibrillar collagen, elastase and several other components of the extracellular  
19 matrix (4). Studies have demonstrated that metal-based restorative materials  
20 can effectively inhibit MMP-2 proteolytic activities (7, 15, 16). However, the  
21 mechanism of enzyme inactivation by metals is not completely understood. It is  
22 assumed that metal ions bind to specific sites, causing conformational changes  
23 that inactivate the catalytic function of the enzymes (7, 15, 16). The results of  
24 the present study show that HEMA can inhibit the activity of MMP-2, even in  
25 small concentrations. Figure 3 shows a possible mechanism to explain HEMA  
26 inhibition of MMP-2 activity. It is suggested that a coordination of the oxygen  
27 from a hydroxyl group with a bivalent cation  $Zn^{2+}$  can, in a first stage, create a  
28 reversible inhibition of the metalloproteinase. In a second stage, proton loss  
29 could occur, leading to a covalent bond that causes an irreversible inhibition.  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48

49 Chlorhexidine (CHX) is a known inhibitor of MMPs used to increase the  
50 longevity of adhesive restorations (9-11). This strategy consists of the  
51 application of CHX after the collagen mesh is exposed by acid-etching  
52 treatment in dentin. CHX may inhibit MMP-2 via a protein denaturation or  
53 cation-chelating mechanism (8). The type of inhibition occurs according to the  
54 concentration of CHX (8). However, how durable the MMP inhibition is in the  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 CHX-treated dentin *in vivo* has not been determined, since the CHX cannot be  
4  
5 stabilized in the polymer matrix.  
6  
7

8  
9 There have been no studies evaluating the inhibitory effect on MMP  
10 activity by monomers present in dental adhesives. Previous experiments have  
11 suggested that dental adhesives are activators of gelatinolytic/collagenolytic  
12 activity in dentin (13, 14). However, a pH-dependent activation mechanism of  
13 MMPs has also been demonstrated (17). The acid-activation mechanism of  
14 MMPs is unknown (18). However, as the adhesive systems are acid, this could  
15 hypothetically explain why adhesives activated the MMPs in these studies.  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

26 HEMA is one of the main monomers used in the composition of dental  
27 adhesives because of its inherent polarity, enabling it to efficiently infiltrate into  
28 the partially demineralized dentin tissue. Microscopic analysis shows that  
29 HEMA-based adhesive systems can lead to an interfacial bond degradation  
30 which is possibly caused by a demineralization of non-protected collagen fibrils  
31 in the hybrid layer (19, 20). Thus, an initial analysis of the data from the present  
32 study seems to be contradictory, considering that most of the dental adhesives  
33 have HEMA in their composition and that these adhesives usually are unstable  
34 over time. However, some aspects must be considered for a better  
35 understanding of this scenario. The degradation of collagen fibrils is commonly  
36 attributed to exposed collagen fibrils in the hybrid layer, i.e., when no permanent  
37 contact between adhesive components and collagen is present (21). It is known  
38 that nano-sized channels are frequently present in the dentin-adhesive  
39 interface, enabling the access of water and, probably, proteolytic enzymes to  
40 the collagen. As MMPs are slowly released over time (17), even with previous  
41 contact of the HEMA molecules to the substrate, the unprotected collagen layer  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 is susceptible to proteolytic attack. In addition, with HEMA polymerization,  
4  
5 monomer diffusion decreases, limiting the inhibitory effects shown in the  
6  
7 present study.  
8  
9

10  
11 In summary, the results of the present *in vitro* study need to be carefully  
12  
13 interpreted, since there are other components present in dentin adhesive  
14  
15 systems, such as acidic monomers, which can influence the effect of the  
16  
17 complete adhesive composition on MMP activity. However, we report here that  
18  
19 HEMA could inhibit MMP-2 expression even at small concentrations. Therefore,  
20  
21 this indicates the necessity of future investigations to establish the real  
22  
23 conditions of MMP inhibition by HEMA *in vivo*.  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

### 34 **Acknowledgements**

35  
36  
37  
38 The authors are grateful to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento  
39  
40 de Pessoal de Nível Superior) for the scholarship, Esstech Inc for the donation  
41  
42 of the reagents and Angelus Science and Technology for partial financial  
43  
44 support to research project.  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## References

1. DE MUNCK J, VAN MEERBEEK B, YOSHIDA Y, INOUE S, VARGAS M, SUZUKI K, LAMBRECHTS P, VANHERLE G. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res* 2003; **82**: 136-140.
2. BRESCHI L, MAZZONI A, RUGGERI A, CADENARO M, DI LENARDA R, DE STEFANO DORIGO E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater* 2008; **24**: 90-101.
3. 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; **83**: 216-221.
4. BODE W, MASKOS K. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol Chem* 2003; **384**: 863-872.
5. RAFFETTO JD, ROSS RL, KHALIL RA. Matrix metalloproteinase 2-induced venous dilation via hyperpolarization and activation of K<sup>+</sup> channels: relevance to varicose vein formation. *J Vasc Surg* 2007; **45**: 373-380.
6. MARTIN-DE LAS HERAS S, VALENZUELA A, OVERALL CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol* 2000; **45**: 757-765.
7. DE SOUZA AP, GERLACH RF, LINE SR. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dent Mater* 2000; **16**: 103-108.
8. GENDRON R, GRENIER D, SORSA T, MAYRAND D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; **6**: 437-439.
9. HEBLING J, PASHLEY DH, TJADERHANE L, TAY FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res* 2005; **84**: 741-746.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
10. CARRILHO MR, CARVALHO RM, DE GOES MF, DI HIPOLITO V, GERALDELI S, TAY FR, PASHLEY DH, TJADERHANE L. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res* 2007; **86**: 90-94.
  11. CARRILHO MR, GERALDELI S, TAY F, DE GOES MF, CARVALHO RM, TJADERHANE L, REIS AF, HEBLING J, MAZZONI A, BRESCHI L, PASHLEY D. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res* 2007; **86**: 529-533.
  12. MICHELSEN VB, MOE G, SKALEVIK R, JENSEN E, LYGRE H. Quantification of organic eluates from polymerized resin-based dental restorative materials by use of GC/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; **850**: 83-91.
  13. NISHITANI Y, YOSHIYAMA M, WADGAONKAR B, BRESCHI L, MANNELLO F, MAZZONI A, CARVALHO RM, TJADERHANE L, TAY FR, PASHLEY DH. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci* 2006; **114**: 160-166.
  14. TAY FR, PASHLEY DH, LOUSHINE RJ, WELLER RN, MONTICELLI F, OSORIO R. Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. *J Endod* 2006; **32**: 862-868.
  15. SOUZA AP, GERLACH RF, LINE SR. Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam. *Biomaterials* 2001; **22**: 2025-2030.
  16. SANTOS MC, DE SOUZA AP, GERLACH RF, TREVILATTO PC, SCAREL-CAMINAGA RM, LINE SR. Inhibition of human pulpal gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by zinc oxide cements. *J Oral Rehabil* 2004; **31**: 660-664.
  17. TJADERHANE 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; **77**: 1622-1629.
  18. BIRKEDAL-HANSEN H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 728-735.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
19. SANO H, YOSHIKAWA T, PEREIRA PN, KANEMURA N, MORIGAMI M, TAGAMI J, PASHLEY DH. Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, in vivo. *J Dent Res* 1999; **78**: 906-911.
  20. TAKAHASHI A, INOUE S, KAWAMOTO C, OMINATO R, TANAKA T, SATO Y, PEREIRA PN, SANO H. In vivo long-term durability of the bond to dentin using two adhesive systems. *J Adhes Dent* 2002; **4**: 151-159.
  21. OKUDA M, PEREIRA PN, NAKAJIMA M, TAGAMI J. Relationship between nanoleakage and long-term durability of dentin bonds. *Oper Dent* 2001; **26**: 482-490.

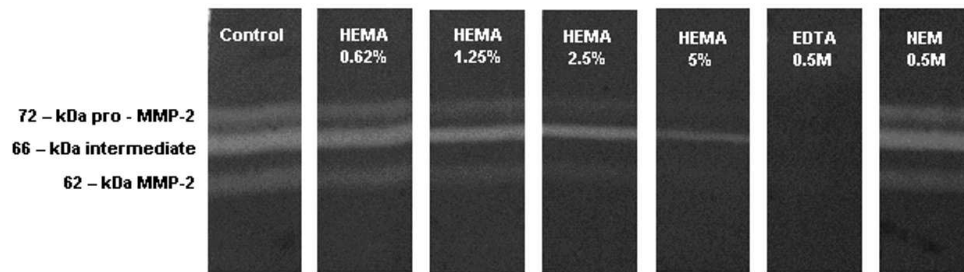
Manuscript Copy

## Figure Legends

Figure 1. Gelatin zymography showing the inhibition of MMP-2 expression by HEMA conditioned Tris-CaCl<sub>2</sub> buffer until 24 h of incubation. Control lane incubated with Tris-CaCl<sub>2</sub> buffer only. Characterization of the enzymes as metalloproteinases since their expressions were inhibited by EDTA and NEM had no effect on enzyme activity.

Figure 2. Linear regression of the relationship between specific band intensity gray value (pixels) and percentile concentration of HEMA.

Figure 3. Two hypothetical proposed mechanisms of the zinc-dependent enzyme inhibition by HEMA.

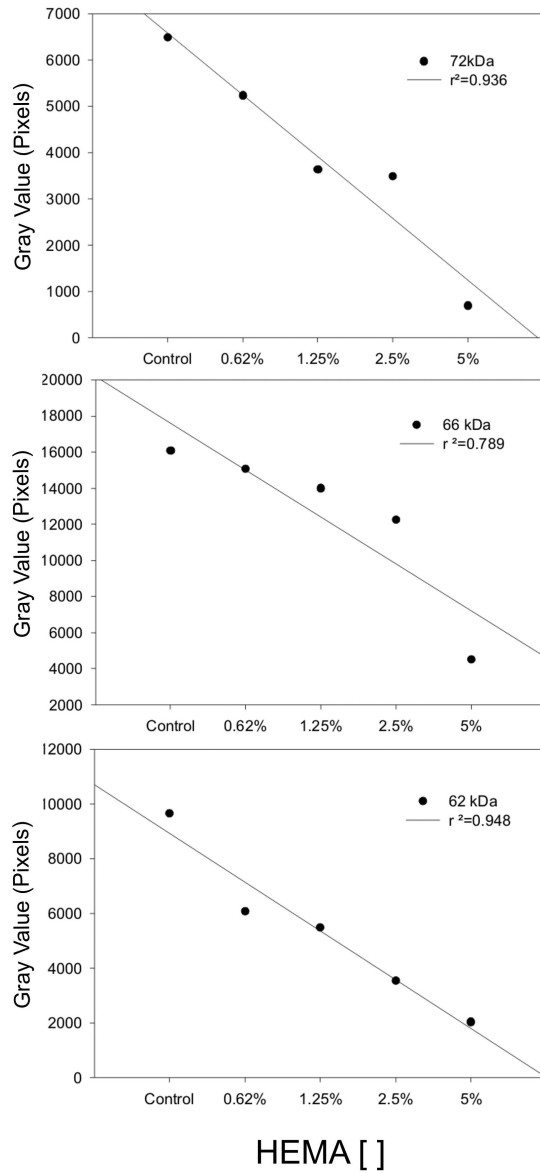


17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

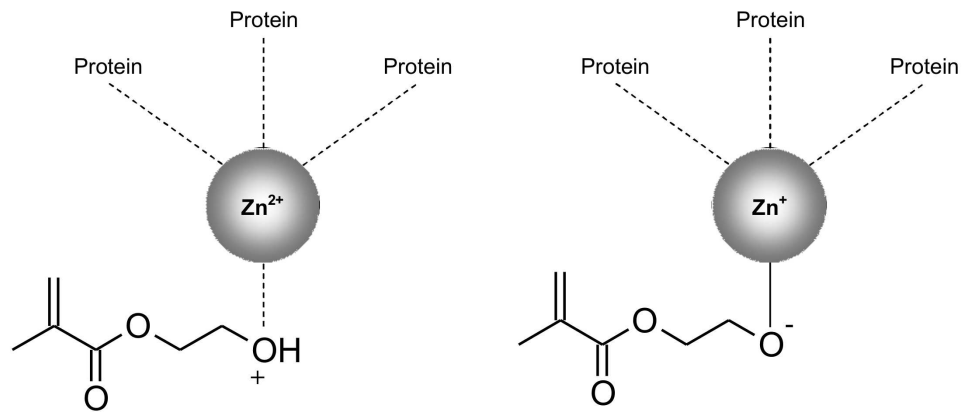
Gelatin zymography showing the inhibition of MMP-2 expression by HEMA conditioned Tris-CaCl<sub>2</sub> buffer until 24 hours of incubation. Control lane incubated with Tris-CaCl<sub>2</sub> buffer only. Characterization of the enzymes as metalloproteinases since their expressions were inhibited by EDTA and NEM had no effect on enzyme activity.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Linear regression of the relationship between specific band intensity gray value (pixels) and percentile concentration of HEMA.



Two hypothetical proposed mechanisms of the zinc-dependent enzyme inhibition by HEMA.

## **ANEXO B**



Journal of Biomedical  
Materials Research  
Part B: Applied Biomaterials

**Inhibition of the activity of matrix metalloproteinase 2 by triethylene glycol dimethacrylate**

Journal:	<i>Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials</i>
Manuscript ID:	draft
Wiley - Manuscript type:	Original Research Report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	de Carvalho, Rodrigo Ogliari, Fabrício Marques, Marcelo Souza, Ana Petzhold, Cesar Line, Sergio Roberto Piva, Evandro Etges, Adriana
Keywords:	gelatinase A, matrix metalloproteinase 2, triethyleneglycol dimethacrylate, TEGDMA, polyacrylamide gel electrophoresis



**Title: Inhibition of the activity of matrix metalloproteinase 2 by triethylene glycol dimethacrylate.**

**Short title: Inhibition of MMP-2 by TEGDMA.**

**Authors:** Rodrigo Varella de Carvalho<sup>a§</sup>, Fabrício Aulo Ogliari<sup>a</sup>, Marcelo Rocha Marques<sup>b</sup> Ana Paula de Souza<sup>b</sup>, Cesar Liberato Petzhold<sup>c</sup>, Sergio Roberto Peres Line<sup>b</sup>, Evandro Piva<sup>a</sup>, Adriana Etges<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Morphology, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil

<sup>c</sup> Chemistry Institute, Organic Chemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, RS, Brazil

<sup>d</sup> Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil

**Corresponding author:**

<sup>§</sup> School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

Rua Gonçalves Chaves, 457, Pelotas, RS, Brasil.

CEP: 96015-560. Tel/Fax: +55-53-3222-6690.

E-mail: rodrigo.varella@gmail.com (Rodrigo Varella de Carvalho)

**Abstract**

The aim of this study was to evaluate the effect of different concentrations of triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA) on the inhibition of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). Mouse gingival explants were cultured overnight in DMEM and the expression of secreted enzymes was analyzed by gelatin zymography in buffers containing 5 mM  $\text{CaCl}_2$  (Tris- $\text{CaCl}_2$ ) in 50 mM Tris-HCl buffer with the addition of TEGDMA at different concentrations (0.62, 1.25, 2.5 and 5.0%). The gelatinolytic proteinase present in the conditioned media was characterized as matrix metalloproteinase by means of specific chemical inhibition with 0.5 mM of EDTA and 0.5 mM of NEM. The matrix metalloproteinases present in the conditioned media were characterized as MMP-2 by immunoprecipitation. The electrophoretic bands were scanned and the transmittance values were analyzed with ImageJ software (NIH). Data was plotted and submitted to linear regression to investigate MMP-2 inhibition as a function of TEGDMA concentration. Three major bands were detected in the zymographic assays. Those bands were characterized as MMP-2. Zymogene (72 kDa), intermediate (66 kDa) and active forms of MMP-2 (62 kDa) were inhibited by TEGDMA in a dose-dependent way. These findings suggest that TEGDMA could inhibit MMP-2 expression even at small concentrations.

**Keywords:** gelatinase A; matrix metalloproteinase 2; triethyleneglycol dimethacrylate; TEGDMA; polyacrylamide gel electrophoresis.

## Introduction

Triethyleneglycol dimethacrylate (TEGDMA) is a crosslinking dimethacrylate present in great amount in dental polymeric materials, like dental adhesives and composites. TEGDMA is usually used as diluent monomer due to its characteristic low viscosity. Several studies have show that TEGDMA is leached of the dental resinous materials even after adequate polymerization.<sup>1,2</sup> These residual monomers, from resin-based dental restorative materials eluted into the oral cavity or towards dental pulp may influence in the biocompatibility of these materials.<sup>3</sup>

Contemporary dental adhesives show satisfactory performance in short time investigations.<sup>4,5</sup> However, longevity of the adhesive restorations continues being a great challenge for the actual adhesive dentistry.<sup>5</sup> The combined degradation of resin and collagen have been considered the largest responsible by the dental adhesion degradation.<sup>5</sup> One of the proposed strategies used to try to increase the longevity of the adhesive restorations has been the inhibition of matrix metalloproteinases (MMPs) presents in the dentin collagen.<sup>6</sup> Chlorexidine solution has been applied in the mesh of collagen before the application of the adhesive system demonstrating the possibility to inhibit MMPs.<sup>7-9</sup> Unfortunately, chlorexidine is not copolymerizable with the other methacrylate monomers being leached, what can to challenge its inhibitory effect over time. Dental materials that possess zinc in the constitution have also been demonstrated like inhibitors of human gelatinases.<sup>10-12</sup>

The MMPs form a family of metal-dependent proteolytic enzymes that, collectively, are capable of degrading all kinds of extracellular matrix protein components, such as interstitial and basement membrane collagens,

1  
2  
3 proteoglycans and fibronectin.<sup>13</sup> MMPs can be divided into six subgroups in  
4 agreement with the substratum: collagenases (MMP-1 and MMP-8),  
5 stromelysins (MMP-3, MMP-10, MMP-11 and MMP-20), gelatinases or type IV  
6 collagenases (MMP-2 and MMP-9), matrilysin (MMP-7), metalloelastase (MMP-  
7 12) and membrane-type metalloproteinases (MMP-14, MMP-15, MMP-16 and  
8 MMP-17).<sup>14</sup> They are secreted as inactive proenzymes (zymogens) and are  
9 thought to be activated in the tissue by cleavage of the propeptide. All members  
10 of this family have a zinc- and a calcium-binding catalytic domain, so that they  
11 depend on these ions for their activity. The MMP gene family in humans  
12 comprise 23 homologous proteinases, at least 20 of which have been well  
13 characterized.<sup>13</sup> These are widely distributed in the organism and are involved  
14 in physiological and pathological processes.

15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Great efforts have been made in the attempt of developing MMPs  
inhibiting materials. These materials could have special interest for the durability  
of adhesive restorations. To predict the potential of inhibition of the monomers  
present in the current adhesive systems is very important. It is well-known that,  
crown-ether functional groups can form complexes with bivalent cations.<sup>15</sup>  
Considering the molecular structure of TEGDMA with ether groups and higher  
flexibility, it is hypothesized that a complex between the ethers and the Zn<sup>2+</sup>  
present in the catalytic domain of the MMP can occur. Therefore, the aim of  
this study was to evaluate the effect of different concentrations of TEGDMA on  
the inhibition of MMP-2.



## Materials and Methods

### Chemicals

TEGDMA was supplied by Esstech Inc. (Essington, PA, USA) (Milwaukee, WI, USA). Cell culture medium and reagents were obtained from GIBCO (Grand Island, NY, USA). All reagents were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA) unless otherwise noted.

### Collection and preparation of MMPs

Mouse gingival tissue specimens were dissected from palatal, lingual and buccal sites from 2 mice (aged 4 weeks). This project was carried out consistent with the principles of the Declaration of Helsinki and was been approved by the Research Ethical Committee. Immediately following excision, the tissue specimens were pooled and washed in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 80 mg/ml gentamicin at room temperature for 30 min. After washing, the specimens were incubated in DMEM containing 40 mg/ml gentamicin at 37°C for 24 h. Following this step, gingival fragments were discarded and the cell culture conditioned medium (DMEM) containing the secreted MMPs was frozen at -70°C until analysis for enzyme activity.

### Zymography

The proteolytic activity was examined on 10% polyacrylamide gels containing 0.05% gelatin. The conditioned medium was mixed with an equal volume of non-reducing sample buffer (2% SDS; 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol and 0.001% bromophenol blue) and then electrophoresed. After electrophoresis, the gels were washed twice in 2% Triton X-100 for 60 min at room temperature and then incubated at 37°C for 24 h in 50 mM Tris-HCl buffer, at pH 7.4, containing 5 mM CaCl<sub>2</sub> (Tris-CaCl<sub>2</sub>). Following incubation, the

1  
2  
3 gels were stained with 0.05% Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio Rad,  
4  
5  
6 Richmond, CA). The gelatinolytic activity was detected as unstained bands.

### 7 8 **Identification of MMPs by means of specific chemical inhibition**

9  
10 To assess the identity of the lytic bands present in the conditioned media,  
11  
12 parallel experiments of zymographic inhibitions were performed. Gelatin-  
13  
14 containing gels were incubated in Tris-CaCl<sub>2</sub> buffer at 37°C for 24 h in the with  
15  
16 the addition of 0.5 mM of EDTA (Reagen, Brazil) to inhibit lytic activities due to  
17  
18 MMP, while 0.5 mM NEM (N-ethyl-maleimide) was used to inhibit activities due  
19  
20 to serine proteinases.  
21  
22  
23

### 24 25 **Characterization of MMP-2 by immunoprecipitation**

26  
27 Conditioned medium was subjected to an immunoprecipitation reaction  
28  
29 with sheep anti-human MMP-2 IgG (The Binding Site, Birmingham, England).  
30  
31 The immunocomplexes were precipitated with protein A-Sepharose beads  
32  
33 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) for 14 h at room temperature. After  
34  
35 washing non-specific Sepharose-adsorbed material with TBS, the  
36  
37 immunoprecipitated material was eluted with nonreducing sample buffer for 10  
38  
39 min at 70°C and assayed by gelatin zymography.  
40  
41  
42

### 43 44 **Inhibition of metalloproteinase activity by TEGDMA**

45  
46 In order to examine the effect of different concentrations of TEGDMA on  
47  
48 enzyme activity, a conditioned medium containing MMPs was loaded on  
49  
50 preparative gelatin-containing polyacrylamide gels. After electrophoresis the  
51  
52 gels were cut in strips of approximately 1 cm, and each strip was incubated at  
53  
54 37°C for 24 h in Tris-CaCl<sub>2</sub> buffer containing one of the following experimental  
55  
56 conditions: Tris-CaCl<sub>2</sub>, 0.62, 1.25, 2.5 and 5.0 v/v% of TEGDMA. After adding  
57  
58 the monomers to the solution, the pH was adjusted to 7.4. and then incubated  
59  
60

1  
2  
3 at 37°C for 24 h in 50 mM Tris-HCl buffer, containing 5 mM CaCl<sub>2</sub> (Tris-CaCl<sub>2</sub>).  
4  
5 Following incubation, the gels were stained with 0.05% Coomassie Brilliant Blue  
6  
7 G-250.  
8  
9

10 In order to quantify the relative inhibition of MMPs by different  
11 concentrations of TEGDMA, electrophoretic bands were scanned and the  
12 transmittance (the transmittance values of the zymogen, intermediate and  
13 active form were added) were analyzed with the ImageJ software (National  
14 Institutes of Health - NIH). Data was plotted and submitted to linear regression  
15 to investigate MMP-2 inhibition as a function of TEGDMA concentration. Each  
16 assay was done in triplicate and was repeated at least two times.  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Results

Under the assay conditions used, three major bands were detected in the zymographic assays (Fig. 1), two sharper bands with an approximate molecular mass of 62 and 72 kDa and one broader band migrating with approximately 66 kDa (Fig. 1). These enzymes were characterized as metalloproteinases since their activities were inhibited by EDTA (Fig. 1) and that NEM (a thiol-proteinase inhibitor) had no effect on the enzyme activity (Fig. 1).

Fig. 1 shows that MMP-2 activities were inhibited by different concentrations of TEGDMA in a dose-dependent way. Even with small concentrations of TEGDMA all three bands presented some inhibition degree after incubation for 24h in a solution containing 5 mM  $\text{CaCl}_2$  (Tris- $\text{CaCl}_2$ ) in 50 mM Tris-HCl buffer with the addition of TEGDMA (0.62, 1.25, 2.5 and 5.0%) (Fig. 1). In the two larger concentrations of TEGDMA (2.5 and 5%) the MMP inhibition is observed easily (Fig. 1).

The largest TEGDMA concentration (5%) used in this study produced a strong inhibition of MMP-2. Only the intermediate band (66 kDa) was not completely inhibited with TEGDMA (5%). It was also showed that MMP-2 inhibition can be well predicted with a linear regression model, considering TEGDMA concentration with pro-form ( $r^2 = 0.84$ ), intermediate form ( $r^2 = 0.92$ ) and active form of MMP-2 ( $r^2 = 0.91$ ) ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2).

## Discussion

MMP-2, also known as gelatinases A, is active in the degradation of denatured type I collagen, type IV collagen, elastase, and several other components of the extracellular matrix.<sup>13</sup> MMP-2 is the major gelatinase constituent of the dentin.<sup>16</sup> Besides, there are evidences indicating that MMPs play an important role in the resin-dentin bond degradation. The activation of MMP-2 and MMP-9 was also shown to have a crucial role in the destruction of dentin by caries,<sup>17</sup> and in the formation and remodelling of extracellular matrix during wound healing.<sup>18</sup> Additionally, these enzymes can potentiate the degradation of extracellular matrix by activating collagenase-3 (MMP-13) and neutrophyl collagenase.<sup>19</sup> Since MMPs are known to participate in the mineralization of pre-dentin matrix, the inhibition of these enzymes could interfere with the calcification of reparative dentin.

Chlorhexidine (CHX) is a known inhibitor of MMPs used to increase the longevity of the adhesive restorations.<sup>7-9</sup> That strategy consists in the application of the CHX after the exhibition of the mesh of collagen by acid-etched treatment in dentin. CHX may inhibit MMP-2 via protein denaturation or cation-chelating mechanism.<sup>20</sup> The inhibition type happens in agreement with the concentration of CHX.<sup>20</sup> However, is not determined how durable is the MMP inhibition in the CHX-treated dentin, *in vivo* once the CHX cannot be stabilize in the polymer matrix.

As well as CHX, zinc oxide cements, metal salts and dental amalgam have also been identified as MMPs inhibitors.<sup>10-12</sup> The mechanism of enzyme inactivation by metals is not completely understood. It is assumed that metal

ions bind to specific sites, causing conformational changes that inactivate the catalytic function of enzymes.<sup>10</sup>

Despite potential applications of MMPs inhibitors dental adhesive materials until this time don't exist studies evaluating the MMP inhibitory activity effect by monomers presents in dental adhesives. In fact, previous experiments have been suggesting that dental adhesives are activators of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin.<sup>21,22</sup> However, have also been demonstrated a pH-dependent activation mechanism of MMPs.<sup>17</sup> The mechanism of the acid-activation of MMPs is unknown.<sup>23</sup> But, as the adhesive systems are acid, that could hypothetically explain why adhesives had activated the MMPs in these studies.

TEGDMA is a monomer extensively used in dentin bonding agents besides being an important component of restorative materials. The results of the present study show that even with small concentrations TEGDMA can indeed inhibit the activity of MMP-2, also known as gelatinases A, that are active in the degradation of denatured fibrillar collagens, elastase and several other components of the extracellular matrix.<sup>23</sup> It is well know that crown ethers can stably form complex with bivalent metal ions.<sup>24,25</sup> This suggests that the inhibition of MMP-2 produced by TEGDMA could be explain by complex formation between the ethers bonds presents in TEGDMA and bivalent cation  $Zn^{2+}$  present in catalytic domain of the MMPs (Figure 3a) or then additionally a complexation with the two carbonyls through a Lewis type acid-base interaction (Figure 3b).

As MMPs are slowly released over time,<sup>17</sup> the possibility of an polymerizable inhibitor that is relatively stable in the polymeric matrix can be

1  
2  
3 considered an advantage. However, when an unprotected collagen layer is  
4 present, its susceptible to proteolytic attack once the TEGDMA is immobilized  
5 there is a limiting in the inhibitory effects shown in the present study. The finds  
6 of the present study need to be carefully interpreted, once in dentin adhesive  
7 systems, other components, like acidic monomers, are present which can to  
8 influence the effect of the adhesive total composition on the MMP activity.  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

## Conclusion

Our results suggest that TEGDMA could inhibit activity of MMP-2 in vitro even in small concentrations. However, this calls for the necessity for future investigations to establish the real conditions of MMP inhibition by TEGDMA in vivo.

For Peer Review



## Acknowledgements

The authors are grateful to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the scholarship, Esstech Inc for the donation of the reagents and Angelus Science and Technology for partial financial support to research project.

For Peer Review

## References

1. Michelsen VB, Moe G, Skalevik R, Jensen E, Lygre H. Quantification of organic eluates from polymerized resin-based dental restorative materials by use of GC/MS. *Journal of Chromatography B* 2007;850(1-2):83-91.
2. Sideridou ID, Achilias DS. Elution study of unreacted Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, and Bis-EMA from light-cured dental resins and resin composites using HPLC. *Journal of Biomedical Materials Research B Applied Biomaterials* 2005;74(1):617-26.
3. Geurtsen W, Leyhausen G. Chemical-Biological Interactions of the resin monomer triethyleneglycol-dimethacrylate (TEGDMA). *Journal of Dental Research* 2001;80(12):2046-50.
4. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: Aging and stability of the bonded interface. *Dental Materials* 2007.
5. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, Lambrechts P, Vanherle G. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *Journal of Dental Research* 2003;82(2):136-40.
6. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *Journal of Dental Research* 2004;83(3):216-21.
7. Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *Journal of Dental Research* 2005;84(8):741-6.

- 1  
2  
3 8. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipolito V, Geraldeli S, Tay  
4 FR, Pashley DH, Tjaderhane L. Chlorhexidine preserves dentin bond in  
5  
6 vitro. *Journal of Dental Research* 2007;86(1):90-4.  
7
- 8  
9  
10 9. Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dib A, Sword RJ, Pashley DH. The  
11 effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. *Operative Dentistry*  
12  
13 2007;32(2):107-11.  
14
- 15  
16  
17 10. de Souza AP, Gerlach RF, Line SR. Inhibition of human gingival  
18  
19 gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dental Materials*  
20  
21 2000;16(2):103-8.  
22
- 23  
24  
25 11. Souza AP, Gerlach RF, Line SR. Inhibition of human gelatinases by  
26  
27 metals released from dental amalgam. *Biomaterials* 2001;22(14):2025-  
28  
29 30.  
30
- 31  
32  
33 12. Santos MC, de Souza AP, Gerlach RF, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga  
34  
35 RM, Line SR. Inhibition of human pulpal gelatinases (MMP-2 and MMP-  
36  
37 9) by zinc oxide cements. *Journal of Oral Rehabilitation* 2004;31(7):660-  
38  
39 4.  
40
- 41  
42  
43 13. Bode W, Maskos K. Structural basis of the matrix metalloproteinases and  
44  
45 their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases.  
46  
47 *Biol Chem* 2003;384(6):863-72.  
48
- 49  
50  
51 14. Gusman H, Santana RB, Zehnder M. Matrix metalloproteinase levels and  
52  
53 gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps.  
54  
55 *Eur J Oral Sci* 2002;110(5):353-7.  
56
- 57  
58  
59 15. Inokuma S, Ide H, Yonekura T, Funaki T, Kondo S, Shiobara S,  
60  
61 Yoshihara T, Tobita S, Nishimura J. Synthesis and Complexing

- 1  
2  
3 Properties of [2.n](2,6)Pyridinocrownphanes. Journal of Organic  
4 Chemistry 2005;70(5):1698-1703.  
5  
6  
7  
8 16. Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix  
9 metalloproteinase gelatinase A in human dentine. Archives of Oral  
10 Biology 2000;45(9):757-65.  
11  
12  
13  
14 17. Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The  
15 activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix  
16 breakdown in caries lesions. Journal of Dental Research  
17 1998;77(8):1622-9.  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24 18. Salo T, Makela M, Kylmaniemi M, Autio-Harmainen H, Larjava H.  
25 Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human  
26 wound healing. Lab Invest 1994;70(2):176-82.  
27  
28  
29  
30  
31  
32 19. Murphy G, Knauper V. Relating matrix metalloproteinase structure to  
33 function: why the "hemopexin" domain? Matrix Biol 1997;15(8-9):511-8.  
34  
35  
36  
37 20. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of  
38 matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. Clinical and  
39 Diagnostic Laboratory Immunology 1999;6(3):437-9.  
40  
41  
42  
43 21. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F,  
44 Mazzoni A, Carvalho RM, Tjaderhane L, Tay FR, Pashley DH. Activation  
45 of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives.  
46 Eur J Oral Sci 2006;114(2):160-6.  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53 22. Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Monticelli F, Osorio R.  
54 Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin.  
55 J Endod 2006;32(9):862-8.  
56  
57  
58  
59  
60

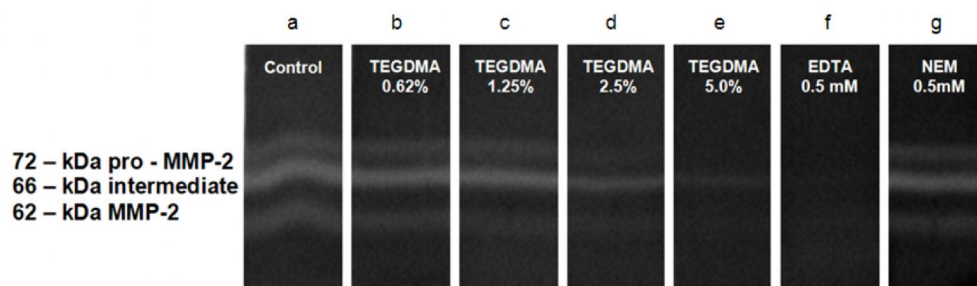
- 1  
2  
3 23. Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr*  
4  
5 *Opin Cell Biol* 1995;7(5):728-35.  
6  
7  
8 24. Ijeri VS, Srivastava AK. The complexation behaviour of crown ethers with  
9  
10 some divalent transition metal and silver ions in a 40%(v/v) ethanol plus  
11  
12 water medium. *European Journal of Inorganic Chemistry* 2001(4):943-  
13  
14 947.  
15  
16  
17 25. Matsuyama H, Arimura T, Miyake Y, Teramoto M. Equilibrium and  
18  
19 *Kinetic-Studies on Complex-Formation Reaction between Crown Ethers*  
20  
21 *and Bivalent Transition-Metal Ions. Bulletin of the Chemical Society of*  
22  
23 *Japan* 1991;64(6):2027-2029.  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Figure Legends

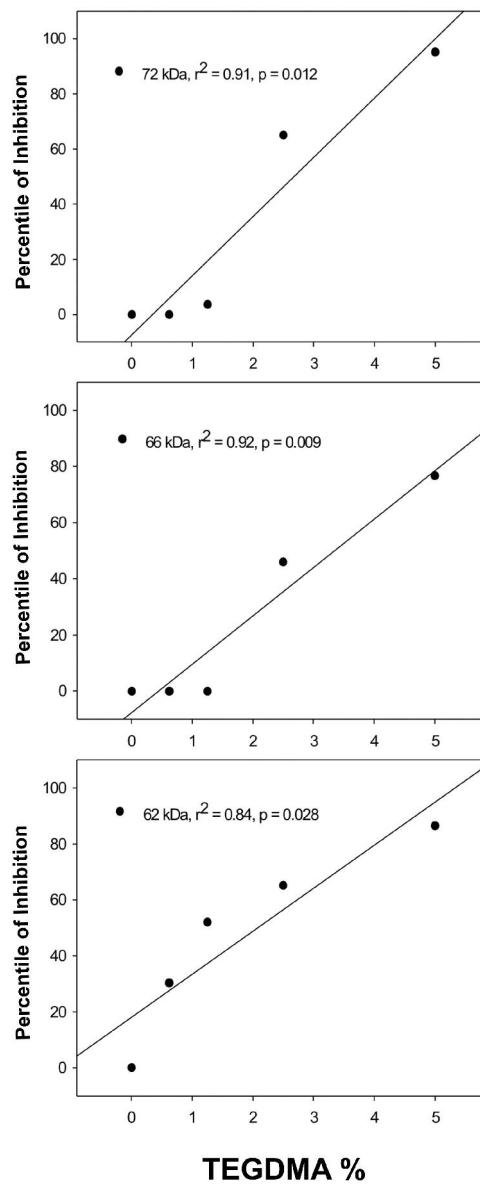
**Figure 1.** Gelatin zymography showing dose response of inhibition of MMP-2 expression by TEGDMA in conditioned Tris CaCl<sub>2</sub> buffer until 24 hours of incubation (b-e). Control lane incubated with Tris–CaCl<sub>2</sub> buffer only (a). Characterization of the enzymes as metalloproteinases since their expressions were inhibited by EDTA and NEM had no effect on enzyme activity (f and g).

**Figure 2.** Linear regression of the relationship between percentile of MMP-2 inhibition and TEGDMA %. (a) Active form of MMP-2 ( $r^2 = 0.91$ ), (b) intermediate form ( $r^2 = 0.92$ ) and (c) pro-form ( $r^2 = 0.84$ ) ( $p < 0.05$ ).

**Figure 3.** Two proposed mechanisms of the zinc-dependent enzyme inhibition by TEGDMA. Complex formation between the ether bonds present in TEGDMA and bivalent cation Zn<sup>2+</sup> (a) and with the two carbonyls through a Lewis type acid-base interaction (b).

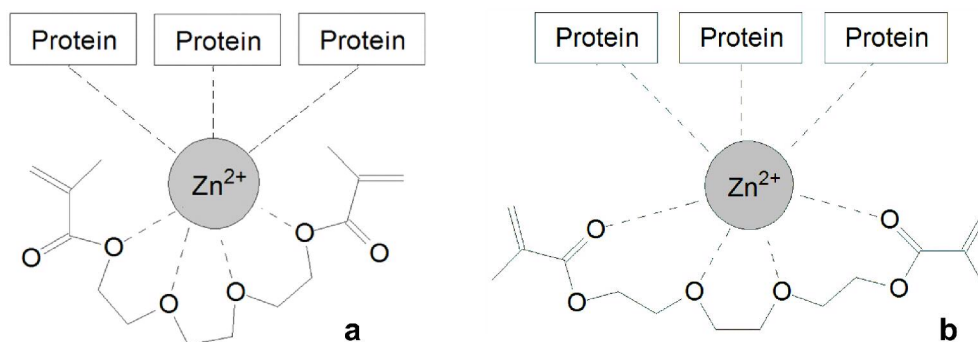


**Figure 1. Gelatin zymography showing dose response of inhibition of MMP-2 expression by TEGDMA in conditioned Tris CaCl<sub>2</sub> buffer until 24 hours of incubation (b-e). Control lane incubated with Tris-CaCl<sub>2</sub> buffer only (a). Characterization of the enzymes as metalloproteinases since their expressions were inhibited by EDTA and NEM had no effect on enzyme activity (f and g).**



**Figure 2. Linear regression of the relationship between percentile of MMP-2 inhibition and TEGDMA %. (a) Active form of MMP-2 ( $r^2 = 0.91$ ), (b) intermediate form ( $r^2 = 0.92$ ) and (c) pro-form ( $r^2 = 0.84$ ) ( $p < 0.05$ ).**





**Figure 3. Two proposed mechanisms of the zinc-dependent enzyme inhibition by TEGDMA. Complex formation between the ether bonds present in TEGDMA and bivalent cation  $Zn^{2+}$  (a) and with the two carbonyls through a Lewis type acid-base interaction (b).**

Peer Review

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)