STELLA DA SILVA FERREIRA

**Influência do pH na atividade funcional de enzimas endógenas
(metaloproteinases -2 e -9) que degradam a matriz de colágeno da dentina
coronária e radicular humana**

São Paulo
2014

STELLA DA SILVA FERREIRA

**Influência do pH na atividade funcional de enzimas endógenas
(metaloproteinases -2 e -9) que degradam a matriz de colágeno da dentina
coronária e radicular humana**

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Dentística

Orientador: Profa. Dra. Maria Angela Pita Sobral

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira

São Paulo

2014

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

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

Ferreira, Stella da Silva.

Influência do pH na atividade funcional de enzimas endógenas (metaloproteinases -2 e -9) que degradam a matriz do colágeno da dentina coronária e radicular humana / Stella da Silva Ferreira; orientador Maria Angela Pita Sobral; coorientador Fernando Neves Nogueira -- São Paulo, 2014.

87 p. : fig., tab., graf. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Dentística. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Metaloproteinases. 2. Dentina. 3. Erosão de dente. I. Sobral, Maria Angela Pita. II. Nogueira, Fernando Neves. III. Título.

Ferreira SS. Influência do pH na atividade funcional de enzimas endógenas (metaloproteinases -2 e -9) que degradam a matriz de colágeno da dentina coronária e radicular humana. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: / /2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Dedico este trabalho à **minha família**, que sempre foi o alicerce da minha vida...*

*Aos meus amados pais, **Ruy e Sandra**, e ao meu irmão **Dani**, pelo amor incondicional e por estarem ao meu lado durante toda a minha vida. E ao meu amor, **Marcus**, por ser tão importante pra mim e por fazer parte da minha vida de uma forma tão especial...*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre presente na minha vida e por permitir que eu chegasse até aqui, suportando a saudade e ausência física dos meus familiares e colocando no meu caminho pessoas especiais, que fizeram desta jornada mais amena.

Aos meus amados pais, Ruy e Sandra, que sempre acreditaram em mim e permitiram com que eu alcançasse mais este sonho. Vocês são os meus exemplos de vida... Obrigada pelo amor, pelas orações, dedicação e apoio durante toda a minha vida.

Ao meu amado irmão Dani, por sempre estar ao meu lado nessa vida, apoiando as minhas decisões e vibrando a cada conquista minha.

À minha nova família, que tive a oportunidade de construir ao lado do meu marido Marcus, meu grande amor e companheiro nesta vida. Obrigada por ser tão especial, por todo seu amor e paciência, por entender as minhas ausências, por sempre apoiar as minhas decisões, me dando forças, acreditando em mim e fazendo dos meus sonhos os seus.

Em especial, à minha orientadora Profa. Dra. Maria Angela Pita Sobral, por ter me recebido tão bem desde o nosso primeiro contato e por ter acreditado em mim, sem ao mesmo me conhecer. Obrigada por todo o apoio, confiança, ensinamentos e convívio compartilhados ao longo destes mais de 6 anos. Agradeço por todas as nossas conversas, sobre vida, família, trabalho, e pelo carinho que você tem comigo e com o Marcus. Guardarei isto com carinho!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira, por ter me estendido a mão no momento que mais precisei e principalmente, pela confiança ao aceitar me coorientar. Agradeço por toda a ajuda durante a realização deste trabalho e pelos conhecimentos passados, mas principalmente, pelo convívio, onde sua calma e tranquilidade, sempre me passavam a confiança de que tudo daria certo. Serei sempre grata!

*À **Profa. Dra. Márcia Marques**, por sempre conseguir estimular os alunos a irem em busca de um novo aprendizado. Agradeço, principalmente, por toda a ajuda a mim dispensada durante a realização deste trabalho que foi fundamental, mas também por ter aprendido sempre um pouco mais com você, durante cada oportunidade que tive ao longo da pós-graduação. Muito obrigada, de coração!*

*Ao **Prof. Dr. Michel Nicolau Youssef** pela confiança e oportunidade de ter realizado os estágios na Dentística Operatória, onde tive um grande aprendizado antes de entrar na pós-graduação, e pelas pessoas especiais que você colocou no meu caminho, que contribuíram para o meu crescimento profissional. Dentre essas pessoas, agradeço à **Profa. Dra. Miriam Lacalle Turbino**, pela oportunidade de estágio na disciplina de Dentística Operatória, pelos conhecimentos passados ao longo da pós-graduação, e principalmente, pela sua ajuda com a estatística deste trabalho. Agradeço também a querida **Wanessa Christine de Souza-Zaroni**, pela oportunidade de ter trabalhado e aprendido bastante com você. Obrigada por toda ajuda e os ensinamentos, quando precisei.*

*À **Polliana Mendes Cândia Scaffa**, por toda a sua dedicação, ensinamentos, paciência e disponibilidade em me ajudar ao longo da realização deste trabalho. Sua ajuda foi fundamental para que eu pudesse concluí-lo. Agradeço a oportunidade de ter lhe conhecido e trabalhado com você.*

*A todos os colegas da pós-graduação, pelo convívio e experiências trocadas ao longo destes anos. À **Karina, Tatiane, Sheila e Daniele** pela convivência e conversas na sala da Profa. Maria Angela.*

*Às queridas conterrâneas **Paula e Tamile**, pela companhia divertida, pelas conversas e risadas durante a pós graduação e fora dela, e ao **Carlos** pela ajuda com as fotos iniciais do trabalho. À **Paulinha**, um agradecimento especial pela nossa amizade fora dos muros da FOU SP.*

*Às meninas do laboratório da Profa. Márcia, as quais tive oportunidade de conhecer e conviver: **Suefy**, obrigada pela ajuda com a zimografia desde o início e sua colaboração na minha qualificação; **Maria Stella**, agradeço pela ajuda sempre que precisei usar os equipamentos do laboratório, e **Ivana**, obrigada pelas trocas que tivemos ao longo das disciplinas que cursamos juntas.*

*À minha colega de turma de Doutorado, **Maria**, por toda sua sensibilidade durante as nossas conversas, sempre com bons conselhos e boas experiências para passar. Obrigada pela convivência durante estes anos.*

*De forma especial, agradeço à **Renata**, minha grande amiga e parceira ao longo dessa jornada, que permitiu com que os momentos difíceis se tornassem mais amenos. Rê, obrigada por ter sido minha companheira durante todo o Doutorado, nos estágios, nas disciplinas, nos trabalhos realizados e principalmente durante os experimentos da tese... Por dividir comigo, cada angústia, medo e dúvida durante essa fase, mas principalmente por todo o aprendizado que tivemos juntas. Agradeço por todas as nossas conversas e risadas, pelo nosso convívio além da FOUSP, pelo carinho e principalmente pela sua amizade verdadeira e sincera para toda essa vida. Outro agradecimento especial para **Roberta**, que veio fechar o presente que ganhei no Doutorado, junto com a Rê. Rô, muito obrigada pela sua amizade que carregou além da vida acadêmica, pelas inúmeras conversas e risadas e pelo seu carinho sempre especial.*

*Agradeço às amigas **Andréa Lago (Déa)**, **Taciana Anfe (Taci)** e **Rosiane Kuguimiya (Rose)** que tive a oportunidade de conhecer durante o Mestrado e o Doutorado. A presença de vocês tornou essa jornada mais amena e alegre. Obrigada pela amizade tão especial que mantemos após estes anos de convivência.*

*Aos funcionários do Departamento de Dentística, **David**, **Selma**, **Aldo**, **Arnaldo** e **Leandro** por toda a colaboração e ajuda durante a pós-graduação. Em especial, para a **Soninha** e*

*Débora, pela ajuda sempre disposta nos laboratórios. Aos funcionários do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral, de forma especial ao **Douglas Nesadal**, por ter me recebido tão bem no Laboratório de Bioquímica Oral, onde realizei meus experimentos. Obrigada por toda sua ajuda, ensinamentos, paciência, dicas e principalmente, por você nos atender sempre com um sorriso no rosto.*

*Agradeço aos alunos do Laboratório de Bioquímica Oral, pela recepção e ajuda durante os meus experimentos, e em especial à **Ana Carolina Romero** e à **Cintia YukiFukuoka**, sempre com muita paciência e disponibilidade em me ensinar o que eu não conhecia.*

*Aos funcionários da biblioteca, de maneira especial às bibliotecárias **Glauci**, pela revisão e atenção tão especiais com este trabalho.*

*À **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**, em especial ao Departamento de Dentística, pela oportunidade na minha formação durante os cursos de Mestrado e Doutorado.*

*À todos os **professores do Departamento de Dentística**, que contribuíram para a minha formação acadêmica e o meu crescimento profissional, ao longo da pós graduação.*

*Ao **CNPq** pela concessão da bolsa e financiamento dos materiais utilizados neste trabalho.*

E a todos, que de uma forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste sonho!

“O saber a gente aprende com os mestres e com os livros. A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes”.

Cora Coralina

RESUMO

Ferreira SS. Influência do pH na atividade funcional de enzimas endógenas (metaloproteinases -2 e -9) que degradam a matriz de colágeno da dentina coronária e radicular humana [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são uma família de endopeptidases cálcio e zinco dependentes que participam da degradação de praticamente todos os componentes da matriz extracelular. Com o pressuposto de que estas enzimas podem estar relacionadas à progressão da erosão dental e que os agentes ácidos causadores da erosão podem influenciar na ativação das MMPs, o objetivo desse estudo *in vitro* foi avaliar a influência do pH sobre a atividade funcional das MMP-2 e -9 presentes na dentina coronária e radicular humana. O pó das dentinas coronária e radicular, provenientes de terceiros molares inclusos recém extraídos foi obtido separadamente e submetido ao protocolo de extração das proteínas, com ácido fosfórico a 1%. Após, o extrato contendo as proteínas e o pó de dentina parcialmente desmineralizado foram incubados em uma das respectivas soluções: solução 2 mM de APMA (acetato de 4-aminofenilmercúrio / grupo controle) ou em uma das soluções tampão (fosfato de potássio 0.1 M) com diferentes pHs (2.5, 4.5, 5.0, 6.0 e 7.0). Após a incubação, as proteínas foram separadas por eletroforese, em um gel de poliacrilamida copolimerizado com gelatina, para a avaliação da atividade gelatinolítica das MMPs, por zimografia. Esta análise foi realizada em triplicada e os zimogramas obtidos ao final foram avaliados por densitometria. A quantificação das bandas observadas nos zimogramas foi realizada pelo programa de imagens ImageJ e os dados avaliados de maneira descritiva e qualitativa. Para a avaliação do conteúdo de colágeno solubilizado, o pó de dentina parcialmente desmineralizado e incubado nos respectivos pHs (n = 8) foi mantido em um tampão de incubação durante 24h, e o conteúdo de hidroxiprolina (HYP) liberado neste meio foi mensurado em espectrofotômetro. Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente por ANOVA 1 fator, seguido do teste de Tukey, com 5% de significância. A análise por zimografia mostrou bandas evidentes correspondente a MMP-2 na sua forma ativa (66kDa) e bandas menos expressivas relacionadas a sua

forma latente (72kDa), tanto para a dentina coronária quanto para a radicular, em todos os grupos experimentais. Não foram identificadas bandas correspondentes a MMP-9, para nenhum dos substratos avaliados. As soluções com os menores pHs (2.5, 4.5 e 5.0) resultaram na maior atividade funcional da MMP-2, em comparação as soluções com os maiores pHs (6.0 e 7.0), em ambos os substratos. Para a análise de HYP, os grupos pH 2.5 e pH 4.5 mostraram valores de absorbância abaixo do limite de detecção do aparelho. Para os demais grupos experimentais, tanto para a dentina coronária quanto para a radicular, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre eles ($p < 0,05$). O conteúdo de HYP liberada foi maior para o pH 7.0, comparado aos demais grupos ($p < 0,05$), exceto para o pH 6.0. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos pH 6.0, pH 5.0 e controle ($p > 0,05$). Conclui-se que a atividade funcional da MMP-2 é dependente do pH. Os menores pHs promoveram um aumento na ativação da MMP-2 da dentina coronária e radicular humana. Nota-se em pHs próximos ao neutro, uma maior degradação da matriz orgânica dentinária desmineralizada por essas enzimas endógenas.

Palavras-chave: Metaloproteinases da matriz. Dentina. Erosão dentária. Hidroxiprolina.

ABSTRACT

Ferreira SS. pH-influence on the functional activity of endogenous enzymes (metalloproteinases -2 and -9) that degrade collagen matrix of coronal and radicular human dentin [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of endopeptidases calcium and zinc dependent that participate in the degradation of practically all components of the extracellular matrix. With the assumption that these enzymes may be related to the progression of dental erosion and acidic agents that cause erosion can influence the activation of MMPs, the aim of this in vitro study was to evaluate the pH-influence on the functional activity of MMP-2 and -9 present in human coronal and root dentin. The powder of root and coronal dentine, from freshly extracted third molars was separately obtained and subjected to protein extraction protocol, with 1% phosphoric acid. After, the extract containing proteins and the partially demineralized powder were incubated in one of the following solutions: 2 mM APMA (4-aminophenylmercuric acetate / control) or one of the buffer solutions (0.1 M potassium phosphate) with different pHs (2.5, 4.5, 5.0, 6.0 and 7.0). After incubation, the proteins were separated by electrophoresis in a polyacrylamide gel copolymerized with gelatin, to evaluate the gelatinolytic activity of MMPs by means of zymography. This analysis was performed in triplicate and the zymograms obtained were evaluated by densitometry. Quantification of the bands observed in zymograms was performed by ImageJ software and the data were evaluated descriptively and qualitatively. To assess the solubilized dentin collagen, the partially demineralized dentin powder treated with different pHs (n=8) was incubated in an artificial saliva for 24 h, and the amount of hydroxyproline (HYP) released in media was measured by spectrophotometer. Data were statistically analyzed by ANOVA one factor, followed by the Tukey's test, with 5% significance. Zymography showed evident bands corresponding to active MMP-2 (66kDa) and less expressed bands related to its latent form (72kDa), for both coronal and root dentin, in all experimental groups. No bands corresponding to MMP-9 were identified, for both substrates. The lowest pH solutions (2.5, 4.5 and 5.0) yielded the higher functional activity than did the highest

pH solutions (6.0 and 7.0), for both substrates. For HYP analysis, the groups pH 2.5 and pH 4.5 showed absorbance values below the detection limit of the equipment. For the other groups, for both coronal and root dentin, statistically significant differences were found between them ($p < 0.05$). The amount of HYP was higher for pH 7.0 than all other groups ($p < 0.05$), except for pH 6.0. No statistical difference was found between pH 6.0, pH 5.0 and control ($p > 0.05$). It can be concluded that the functional activity of MMP-2 is pH-dependent. Low pH solutions are able to increase the activation of human coronal and root MMP-2. It is noted in pHs close to neutral, a higher degradation of demineralized dentin organic matrix by these endogenous enzymes.

Keywords: Matrix metalloproteinases. Dentin. Tooth erosion. Hydroxyproline.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Representação esquemática da estrutura básica das MMPs. Modificado de Hannas et al., 2007	28
Figura 2.2 - Representação esquemática do mecanismo de ativação das MMPs. A - MMPs expressas em sua forma inativa (zimogênio). Um resíduo de cisteína (Cys) conservado no pró-domínio é ligado ao Zn ²⁺ mantendo a enzima inativa. B - O pró-domínio é removido pela clivagem no domínio, e entre o pró-domínio e o domínio catalítico, tornando a enzima ativa. Modificado de Hannas et al., 2007.....	29
Figura 2.3 - Apresentação esquemática das sequências alternadas de desmineralização e degradação da matriz orgânica em uma lesão de dentina erodida, demonstrando as mudanças no pH (A) e mudanças correspondentes na lesão erosiva (B). Imediatamente depois de um desafio erosivo (DE), o pH diminuiu abaixo do nível no qual a desmineralização ocorre (pH ≤ 4,5, linha pontilhada). Abaixo deste pH, as MMPs latentes são convertidas nas formas ativas (Tjäderhane et al., 1998). De acordo com a capacidade tampão da saliva, o pH aumenta lentamente, mas a desmineralização continua até o pH 5,5 (DM = período de desmineralização). Durante a desmineralização, as fibrilas colágenas da matriz orgânica ficam expostas (B). Durante o pH baixo, a atividade das MMPs é baixa. Com o aumento do pH, a atividade das MMPs aumenta e então a matriz de colágeno desmineralizada é hidrolisada (DC = degradação do colágeno) (B). A sequência é repetida a cada desafio erosivo. Fonte: Buzalaf et al. (2012).	37
Figura 4.1 - (A) Dente posicionado para os cortes; (B) Início do corte transversal na região amelocementária; (C) Separação da coroa e da raiz; (D) Fatias de dentina coronária e radicular obtidas e (E) Fatia dentinária com 1 mm de espessura	42
Figura 4.2 - (A) Moinho de bolhas automático; e (B) e (C) Pó de dentina obtido logo após a trituração	43
Figura 4.3 - (A) Peneira Tamis; (B) Pó de dentina sendo peneirado; (C) Obtenção do pó de dentina com partículas de até 100 µm	43
Quadro 4.1 - Composição do tampão de extração.....	44

Figura 4.4 - Esquema mostrando o passo a passo do protocolo de extração das proteínas com AF	45
Figura 4.5 - Esquema ilustrando as etapas seguidas na metodologia	46
Figura 4.6 - (A) Suporte com as placas de vidro e o pente posicionados para a polimerização dos géis; (B) Conjunto de placas com os géis polimerizados posicionados na cuba onde ocorreu a eletroforese; e (C) As amostras e o padrão de peso molecular (PM) devidamente carregados nos seus respectivos poços de cada gel (setas).....	50
Figura 4.7 - (A) Eletrodos conectados à fonte do equipamento e voltagem programada em 90 V; e (B) Corrida do gel sendo realizada	51
Figura 4.8 - Imagem de um dos zimogramas obtido após as etapas de coloração e descoloração	52
Quadro 4.2 - Composição do tampão de incubação	53
Figura 4.9 - (A) Amostras após hidrólise em autoclave; (B) Amostras após adição do reagente de Erlich; e (C) Amostras incubadas em estufa a 65°C	54
Figura 4.10 - Esquema mostrando os passos do protocolo realizado para a análise do conteúdo de hidroxiprolina liberada após os tratamentos propostos	55
Figura 5.1 - Imagem representativa de um dos zimogramas obtido para a dentina coronária mostrando a atividade gelatinolítica correspondente a MMP-2 (bandas claras) nas suas formas latente (72kDa) e ativa (66kDa) de acordo com os grupos experimentais. PM: Padrão de peso molecular com bandas expressas em kDa.....	58
Figura 5.2 - Representação gráfica dos valores de média da atividade gelatinolítica da MMP-2 para a dentina coronária, na sua forma ativa (66kDa) apresentada em densidade óptica	58
Figura 5.3 - Imagem representativa de um dos zimogramas obtido para a dentina radicular mostrando a atividade gelatinolítica correspondente a MMP-2 (bandas claras) nas suas formas latente (72kDa) e ativa (66kDa) de acordo com os grupos experimentais. PM: Padrão de peso molecular com bandas expressas em kDa	60

- Figura 5.4 - Representação gráfica dos valores de média da atividade gelatinolítica da MMP-2 para a dentina radicular, na sua forma ativa (66kDa) apresentada em densidade óptica60
- Figura 5.5 - Imagens representativas dos zimogramas mostrando a atividade gelatinolítica da MMP-2 nas amostras de dentina da coroa e da raiz dos diferentes grupos experimentais. Pode ser observado bandas mais marcadas nos espécimes de dentina radicular. PM = Padrão de peso molecular expresso em kDa61
- Figura 5.6 - Média da concentração de hidroxiprolina liberada no meio (24h de incubação), para a dentina coronária, após o tratamento do pó com as soluções nos diferentes pHs. Valores expressos em μg HYP/mg de pó de dentina62
- Figura 5.7 - Média da concentração de hidroxiprolina liberada no meio (24h de incubação), para a dentina radicular, após o tratamento do pó de dentina com as soluções testadas nos diferentes pHs. Valores expressos em μg HYP/mg de pó de dentina.....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Descrição dos grupos experimentais	47
Tabela 4.2 - Composição dos géis de poliacrilamida	49
Tabela 5.1 - Valores de média $\pm$ DP da quantificação de proteínas, obtidas após o protocolo de extração.....	57
Tabela 5.2 - Média ($\pm$ DP) da concentração de HYP liberada nas amostras de dentina coronária, para os diferentes grupos experimentais.....	62
Tabela 5.3 - Média ($\pm$ DP) da concentração de HYP liberada nas amostras de dentina radicular, para os diferentes grupos experimentais.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al_2O_3	óxido de alumínio
APMA	acetato de 4-aminofenilmercúrio
CaCl_2	cloreto de cálcio
CO_3	carbonato
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
Fundecto	fundação para o desenvolvimento científico e tecnológico da odontologia
h	hora
HEPES	ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1
HYP	hidroxiprolina
kDa	quiloDalton
KH_2PO_4	fosfato de potássio monobásico
M	concentração molar ou molaridade
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MMP	metaloproteinase da matriz
N	normalidade
NaCl	cloreto de sódio
NaN_3	azida sódica
NaOH	hidróxido de sódio
nm	nanometro
Nonidet P40	octilfenil-polietileno glicol
OH	hidroxido
pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
PO_4	fosfato
rpm	rotação por minuto

Tris	tris(hidroximetil)aminometano
Triton X-100	4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietileno glicol
vol	volume
ZnCl ₂	cloreto de zinco
μg/mL	micrograma por mililitro
μL	microlitro
μm	micrometro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
≈	aproximadamente
Ca	cálcio
Na	sódio
Hz	hertz
g	grama
W	watt
V	volts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 A erosão dental na dentina humana	24
2.2 As Metaloproteinases da matriz (MMPs)	27
2.3 O papel das MMPs na progressão da cárie dentária	33
2.4 O papel das MMPs na progressão da erosão dental	35
3 PROPOSIÇÃO	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Preparo do pó de dentina	41
4.2 Extração das proteínas	43
4.3 Quantificação das proteínas	46
4.4 Tratamento das amostras	47
4.5 Metodologias avaliadas	48
4.5.1 Atividade gelatinolítica por zimografia	48
4.5.1.1 <i>Preparo das amostras</i>	48
4.5.1.2 <i>Preparo dos géis</i>	49
4.5.1.3 <i>Corrida e incubação do gel</i>	49
4.5.1.4 <i>Coloração e Descoloração do gel</i>	52
4.5.2 Conteúdo de colágeno solubilizado pela liberação de hidroxiprolina (HYP)	52
4.5.2.1 <i>Protocolo</i>	53
4.6 Análise dos dados	56
4.6.1 Análise qualitativa da zimografia	56
4.6.2 Análise estatística dos dados da HYP	56
5 RESULTADOS	57
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	73
APÊNDICES	82

1 INTRODUÇÃO

Com a instituição de medidas preventivas e o aumento da expectativa de vida da população, os dentes têm sido mantidos na cavidade bucal por um período mais prolongado, e por consequência, a exposição das dentinas coronária e radicular, causada pelos desgastes dentais e pela recessão gengival, tem se tornado cada vez mais frequentes na prática clínica (Hara et al, 2006).

A partir disso, a exposição da dentina aos ácidos erosivos pode ocorrer (Buzalaf et al., 2012), e por esse motivo, a erosão dental tem sido cada vez mais considerada como um fator de risco para os dentes (Lussi et al., 2011). A erosão dental caracteriza-se como um processo não-carioso, descrito como a perda irreversível dos tecidos duros dentais, causada pela ação direta de ácidos de origem intrínseca ou extrínseca (Schlueter et al., 2012).

A dentina apresenta um conteúdo orgânico grande (33%) constituído principalmente por colágeno do tipo I (90%), além de ser formada especialmente por hidroxiapatita carbonatada. Ainda é constituída por pequenos cristais de apatita, que conferem uma maior área de superfície disponível para o ataque ácido. Esses fatores tornam este substrato mais solúvel quando comparado ao esmalte dental (Featherstone; Lussi, 2006; Lussi et al., 2011).

Devido às diferenças estruturais e de composição entre o esmalte e a dentina, a interação dos agentes erosivos com os tecidos dentais ocorre de forma diferente para estes substratos (Lussi et al., 2011). Durante o processo erosivo na dentina, os minerais são dissolvidos pelos ácidos, enquanto que a porção orgânica é mantida (Kinney et al., 1995; Breschi et al., 2002; Ganss et al., 2010). Acredita-se que essa matriz orgânica limita as trocas iônicas na área desmineralizada (Klont; ten Cate, 1991; Kletter et al., 1994), e consequentemente a sua manutenção poderia reduzir a progressão da erosão na dentina (Ganss et al., 2004a).

Essa matriz orgânica, embora seja resistente às forças mecânicas de escovação (Ganss et al., 2009) pode ser degradada quimicamente pela ação de enzimas proteolíticas (Klont; ten Cate, 1991; Ganss et al., 2004a; Schlueter et al., 2010), como as metaloproteinases (MMPs) e as cisteíno-catepsinas. As metaloproteinases são uma família de endopeptidases cálcio e zinco dependentes, que constituem um grupo de pelo menos 23 enzimas encontradas em humanos e

que estão envolvidas na degradação de quase todos os componentes da matriz extracelular (Visse; Nagase, 2003).

Estas enzimas também são encontradas na dentina (Martin-De Las Heras et al., 2000) e saliva humanas (Ingman et al., 1994). O primeiro relato de atividade gelatinolítica na dentina humana foi feito há mais de 30 anos atrás (Dayan et al., 1983), e a partir disto, diversos tipos de MMPs têm sido identificadas nesse substrato, dentre elas, as gelatinases MMP-2 e MMP-9. Estas enzimas foram identificadas tanto na forma latente, como na forma ativa, em ambas as dentinas coronária (Martin-De Las Heras et al., 2000; Van Strijp et al., 2003; Mazzoni et al., 2007; Vidal, 2012) e radicular sadias (Santos et al., 2009; Kato et al., 2011).

A grande elucidação a respeito da participação das MMPs salivares na degradação da matriz orgânica dentinária foi estabelecida há pouco mais de 15 anos, quando Tjäderhane et al. (1998a) mostraram que em condições semelhantes à lesão de cárie, as MMPs são funcionais quando ativadas em pH ácido (4,5), seguidas pela neutralização do meio.

Apesar dos estudos em relação ao papel das MMPs estejam voltados para a cárie dentária (Tjäderhane et al. 1998a; Sulkala et al. 2001), apenas recentemente os estudos se voltaram para a investigação do papel dessas enzimas na erosão dental. Embora poucos estudos estejam disponíveis até o momento, estes consideram que um processo de degradação da matriz orgânica similar àquele encontrado para a cárie dentária, também ocorre no caso dos processos erosivos (Magalhães et al., 2009; Buzalaf et al., 2012), no entanto, não há comprovação para esta suposição.

Nesse contexto é importante lembrar que os mecanismos que envolvem o processo de cárie e o processo erosivo são distintos. No caso da lesão de cárie, os estudos consideram o pH 4,5 para ativação das MMPs, visto que este é descrito como o pH crítico para a dissolução mineral e instalação das lesões cariosas. No entanto, para a erosão dental não há um pH crítico definido (Lussi et al., 2011). Além do mais, os estudos para a cárie dentária estão direcionados apenas à participação das MMPs salivares (Tjäderhane et al., 1998a; Sulkala et al., 2001). Sabe-se que a saliva exerce um papel fundamental no processo da erosão dental, no entanto, as enzimas proteolíticas encontradas na dentina humana, devem apresentar um papel importante na progressão da erosão, e por isso necessitam também ser estudadas.

A literatura recente à respeito do papel destas enzimas endógenas na progressão da erosão dental tem se voltado apenas para a utilização de inibidores de MMPs, visando a prevenção deste tipo de lesão (Magalhães et al., 2009; Kato et al., 2009; 2010a; 2011; 2012; Hannas et al., 2010), no entanto, a elucidação sobre o papel destas enzimas dentinárias no mecanismo de degradação da matriz de colágeno exposta, após os desafios erosivos ainda não está esclarecido.

Sendo assim, investigações dirigidas para avaliação da atividade funcional das MMPs presentes na dentina humana, frente à ativação causada por diferentes pHs, precisam ser realizadas, a fim de esclarecer se a desmineralização ocorrida nos processos erosivos pode causar a ativação destas enzimas, levando à degradação da matriz orgânica dentinária, e portanto confirmando, o papel crucial destas enzimas na progressão da erosão em dentina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A erosão dental na dentina humana

Grande parte dos estudos sobre a erosão dental tem se voltado para a avaliação do esmalte, uma vez que este, até mesmo por uma questão anatômica é a estrutura do dente mais susceptível aos ataques erosivos. No entanto, a manutenção dos dentes por um período prolongado na cavidade bucal tem levado a uma exposição bem mais frequente da dentina coronária, bem como da dentina radicular, em razão dos desgastes dentários e da recessão gengival, como tem sido observado clinicamente (Hara et al., 2006). Por esse motivo, a exposição da dentina aos ácidos de origem intrínseca e extrínseca tem se tornado cada vez mais comum, e nesse sentido, a erosão na dentina tem sido cada vez mais considerada.

Inicialmente, para se entender melhor como ocorre o mecanismo da erosão na dentina humana é importante lembrar da composição do esmalte e dentina. Esses dois substratos, apesar de serem formados por componentes semelhantes são bastante diferentes estruturalmente (Featherstone; Lussi, 2006). Basicamente, ambos são compostos por minerais, proteínas, lipídios e água (Featherstone, 2000).

O esmalte dental humano é uma estrutura não vital, altamente mineralizada, composta principalmente por cálcio e fosfato na forma de hidroxiapatita (91% vol.) e apresentando uma estrutura prismática. Os demais constituintes do esmalte, que são a água (3,4% vol.) e os componentes orgânicos (5,4% vol.) aparecem em menor volume (Shellis et al., 2014).

A dentina por sua vez, é um tecido vital, permeável, de estrutura bastante complexa e por esta razão bem diferente estrutural e biologicamente do esmalte (Shellis et al., 2014). A sua porção mineral é extremamente menor (47% vol.), além do mais, os cristais que compõem a dentina são menores, ao contrário dos cristais do esmalte que apresentam uma estrutura grande e ainda são mais cristalizados (Shellis et al., 2014). Por outro lado, o conteúdo orgânico da dentina é grande (33% vol.), sendo constituída principalmente por colágeno do tipo I, que compreende cerca de 90% em peso dessa porção orgânica (Lussi et al., 2011). Os demais componentes da fase orgânica correspondem aos lipídios e as proteínas não-

colágenas da matriz, como as fosfoproteínas (Xu; Wang, 2012). A dentina apresenta uma estrutura tubular, formada por túbulos dentinários que se estendem da polpa até a junção esmalte-dentina ou dentina-cimento. Estes túbulos são rodeados pela dentina peritubular, a qual é um tecido hipermineralizado e contém pouca matriz orgânica, enquanto que são separados pela dentina intertubular, composta principalmente por uma matriz de colágeno tipo I, reforçada por apatita (Marshall et al., 1997; Lussi et al., 2011). O conteúdo orgânico da dentina peritubular é menor do que na dentina intertubular (Xu; Wang, 2012). A quantidade de túbulos dentinários por área é maior quanto mais próximo à polpa, e diminui significativamente próximo a junção esmalte-dentina. Uma menor densidade de túbulos também é encontrada na raiz (Marshall et al., 1997).

O conteúdo mineral de ambos, esmalte e dentina, é composto por uma forma imperfeita de hidroxiapatita, chamada de hidroxiapatita carbonatada deficiente de cálcio (Lussi et al., 2011). A fórmula simplificada que ilustra esta composição é $\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-y}(\text{CO}_3)_z(\text{OH})_{2-u}\text{F}_u$, a qual é diferente da composição perfeita da hidroxiapatita (HAP) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A imperfeição acontece devido a substituição de alguns íons na estrutura cristalina da hidroxiapatita. As maiores substituições são do carbonato, substituindo o fosfato, e o sódio e o magnésio que substituem o cálcio (Shellis et al., 2014; Featherstone; Lussi, 2006). Essas substituições causam um enfraquecimento na estrutura da hidroxiapatita, aumentando portanto, a sua solubilização (Featherstone et al., 1983). Além do mais, no que diz respeito a solubilização destes substratos, os resultados de alguns estudos mostram que o esmalte é um pouco mais solúvel do que a HAP, enquanto que a dentina é consideravelmente mais solúvel (Shellis, 1996; Shellis et al., 2010). Um dos fatores que torna a dentina mais solúvel quando comparada ao esmalte, diz respeito ao conteúdo de carbonato que na dentina é maior (5-6% vol.) que no esmalte (3% vol.). Em relação ao tamanho dos cristais da dentina que é muito menor que o do esmalte, as evidências sugerem que este fator sozinho é fracamente relacionado à solubilização (Baig et al., 1999), contudo, isso gera uma maior área de superfície por grama de dentina disponível para o ataque ácido (Featherstone; Lussi, 2006), o que pode levar a um aumento da interação com o ácido e consequentemente, aumentar a taxa de dissolução da dentina (Shellis et al., 2014). A partir do que foi exposto, fica claro que a dentina é um tecido mais poroso do que o esmalte, e que grande parte

dessa porosidade é provavelmente conferida pelos túbulos dentinários (Shellis et al., 2014).

Os aspectos etiológicos e de desenvolvimento que envolvem o processo erosivo são indiscutivelmente diferentes daqueles para a cárie dental, e da mesma forma isso ocorre em relação aos aspectos relacionados à erosão no esmalte que diferem essencialmente daqueles relacionados à erosão na dentina (Lussi et al., 2011). A histologia da dentina erosiva é muito mais complexa, de tal modo que durante o processo erosivo, os minerais que a compõem são dissolvidos pelos ácidos, ao passo que a porção orgânica é mantida (Kinney et al., 1995; Breschi et al., 2002; Ganss et al., 2010).

Inicialmente, a erosão em dentina parece ocorrer de forma semelhante ao descrito para o esmalte, apresentando uma desmineralização inicial, seguido pelo amolecimento da superfície (Mahoney et al., 2003). No entanto, o mecanismo pelo qual a lesão erosiva progride na dentina ainda não está totalmente esclarecido (Hara et al., 2005). Para os processos erosivos realizados na dentina *in vitro* ou *in situ*, descreve-se que o contato com a solução ácida, leva a uma perda rápida dos minerais das dentinas peri e intertubular, as quais, inicialmente, são dissolvidas de forma semelhante, mas após o primeiro minuto, a dentina peritubular apresenta uma maior dissolução, tornando os túbulos dentinários mais largos, enquanto que a dentina intertubular mostra-se mais estável (Kinney et al., 1995). Finalmente, uma zona superficial de matriz orgânica desmineralizada pode ser observada, sob a qual encontra-se uma zona de dentina parcialmente desmineralizada, até que uma camada de dentina sadia interna possa ser alcançada (Kinney et al., 1995).

À medida que a erosão progride, a taxa de desmineralização diminui, devido ao aumento na espessura dessa matriz orgânica desmineralizada, o que leva a uma diminuição significativa da perda mineral (Hara et al., 2005; Ganss et al., 2004a). A partir disso, sugere-se que a matriz orgânica desmineralizada tenha uma grande importância no processo erosivo da dentina, pois pode funcionar como uma barreira tanto para a difusão ácida como para a perda mineral (Hara et al., 2005). E, por essa razão, a remoção da matriz orgânica desmineralizada, seja de forma mecânica ou química, poderá levar a uma maior progressão da lesão erosiva (Hara et al., 2005), bem como interferir em uma possível deposição mineral na área erodida (Ganss et al., 2004b).

No entanto, pouco se sabe a respeito da permanência dessa estrutura desmineralizada *in vivo*, mas a partir dos achados clínicos, acredita-se que essa estrutura não seja mantida em grande espessura (Ganss et al., 2010), uma vez que, resistente às forças mecânicas de escovação (Ganss et al., 2009), a matriz de colágeno dentinária pode ser removida então, quimicamente pela ação de gelatinases ou outras enzimas proteolíticas (Klontz; ten Cate, 1991; Ganss et al., 2004a). Nesse sentido, Shellis et al. (2014) chamam a atenção para o fato de que seguramente, a desmineralização ocorrida *in vivo* é muito menor do que a observada para os estudos laboratoriais, sugerindo então, que a ação das enzimas endógenas pode ser suficiente para promover a degradação da matriz de colágeno, enquanto o mineral é dissolvido.

2.2 As metaloproteinases da matriz (MMPs)

As metaloproteinases da matriz (MMPs), também chamadas de matrixinas são uma família de endopeptidases cálcio e zinco dependentes, que participam da degradação de praticamente todos os componentes da matriz extracelular (Sternlicht; Werb, 2001). Desde o primeiro relato de atividade colagenolítica em vertebrados, por Gross e Lapiere (1962), 24 tipos diferentes de MMPs têm sido identificadas, dentre as quais 23 são encontradas em humanos (Visse; Nagase, 2003).

A classificação destas proteases tem se baseado de acordo com a especificidade dos seus substratos. Essa forma convencional de classificação é ainda muito utilizada, no entanto, não reflete a real complexidade das funções e atividades biológicas das MMPs, haja visto que estas enzimas geralmente degradam diversos substratos, podendo ocorrer então, uma sobreposição de substratos entre as MMPs individuais (Hannas et al., 2007). De acordo com essa classificação, as MMPs são descritas como: Colagenases, que compreendem as MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18, e que basicamente, apresentam a capacidade de clivar colágeno (tipo I, II e III); Gelatinases, as quais fazem parte deste grupo as MMP-2 e MMP-9, que degradam principalmente o colágeno desnaturado (gelatina); Estromelisinases, que correspondem as MMP-3, MMP-10 e MMP-11; Matrilisinases,

composta pelas MMP-7 e MMP-26; Metaloproteinases tipo membrana que são as MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25, e outras MMPs, que fazem parte as MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27 e MMP-28 (Hannas et al., 2007).

De um modo geral, as MMPs apresentam uma estrutura basicamente constituída por um pró-domínio, um domínio catalítico com sítio de ligação ao zinco, uma região de união denominada *hinge*, e um domínio hemopexina (Visse; Nagase, 2003). O pró-domínio contém um resíduo cisteína Cys conservado (Page-McCaw et al., 2007), no qual forma uma ponte de ligação com o íon zinco (Zn^{2+}) presente no domínio catalítico, o que se refere ao mecanismo *cisteína-switch* (Van Wart; Birkedal-Hansen, 1990), responsável por manter a enzima na sua forma inativa (Murphy; Nagase, 2008) (Figura 2.1).

Figura 2.1 - Representação esquemática da estrutura básica das MMPs. Modificado de Hannas et al. (2007)

As MMPs são geralmente secretadas na forma de pró-enzimas inativas (zimogênio), as quais necessitam de ativação. Quando a ligação cisteína-zinco se mantém intacta, a enzima permanece inativa (Figura 2.2 A). A sua ativação irá ocorrer quando esta ligação for rompida pela clivagem proteolítica de enzimas, que podem ser outras MMPs, ou outras proteases, como as cisteíno-catepsinas (Nagase, 1997; Visse; Nagase, 2003). Estas enzimas também podem ser ativadas quimicamente *in vitro* (Nagase, 1997), pela ação de agentes químicos, como o acetato de 4-aminofenilmercúrio (APMA), além de baixos pHs e tratamentos térmicos, os quais já foram descritos como podendo causar a ativação das MMPs. Estes agentes agem, provavelmente, no desequilíbrio da ligação cisteína-zinco (Van Wart; Birkedal-Hansen, 1990). Esta clivagem causa uma redução na massa molecular da enzima e resulta na sua completa ativação (Figura 2.2 B). Desta forma, com a remoção do pró-domínio e o rompimento da ligação cisteína-zinco, o domínio catalítico (sítio ativo da enzima) torna-se exposto e disponível para a degradação do seu substrato alvo (Page-McCaw et al., 2007).

Figura 2.2 - Representação esquemática do mecanismo de ativação das MMPs. A - MMPs expressas em sua forma inativa (zimogênio). Um resíduo de cisteína (Cys) conservado no pró-domínio é ligado ao Zn^{2+} mantendo a enzima inativa. B - O pró-domínio é removido pela clivagem no domínio, e entre o pró-domínio e o domínio catalítico, tornando a enzima ativa. Modificado de Hannas et al. (2007)

A massa molecular das MMPs difere-se quando da sua forma ativa e latente. As MMP-2 e MMP-9, que são o objeto de estudo deste trabalho, apresentam massa molecular de ~72 kDa / ~66 kDa (Boushell et al., 2011) e ~92 kDa / ~86kDa (Mazzoni et al., 2007), correspondendo às suas formas latentes e ativas, respectivamente.

É importante ressaltar que as MMPs são conhecidas como endopeptidases cálcio e zinco dependentes, por necessitarem dos íons cálcio para manter a sua estrutura terciária e dos íons zinco para manter os seus sítios ativos funcionais (Visse; Nagase, 2003). Por esta razão, o íon zinco quando desliga-se do pró-domínio, no momento em que ocorre a ativação da MMP, mantém-se ligado ao domínio catalítico, garantindo a atividade proteolítica desta enzima.

As MMPs exercem um papel fundamental em muitos processos fisiológicos de desenvolvimento, morfogênese, reparação tecidual e angiogênese (Murphy; Nagase, 2008; Egeblad; Werb, 2002). A atividade das MMPs é precisamente regulada por diversos mecanismos, dentre eles, a transcrição de genes da MMP, a ativação de zimogênios precursores, a interação com componentes específicos da matriz extracelular ou a inibição por inibidores endógenos, conhecidos como inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) (Birkedal-Hansen, 1993). As TIMPs são inibidores específicos das MMPs que participam do controle local de atividade destas enzimas nos tecidos (Gomez et al., 1997; Brew et al., 2000). No entanto, quando ocorre um desequilíbrio no controle da atividade destas enzimas, estas podem fazer parte de processos patológicos como artrite, câncer, arteriosclerose, aneurisma, entre outros (Murphy; Nagase, 2008; Egeblad; Werb, 2002).

No que diz respeito à cavidade bucal, as metaloproteinases podem contribuir para a remodelação tecidual, em condições normais ou patológicas (Hannas et al., 2007). Em condições normais, os estudos mostram que estas enzimas exercem um papel importante no desenvolvimento e remodelação dos tecidos bucais (Hannas et al., 2007), como no caso da remodelação da matriz orgânica dentinária (Martin-De Las Heras et al., 2000; Sulkala et al., 2002). No caso dos processos patológicos, estas enzimas têm sido fortemente relacionadas à doença periodontal (Birkedal-Hansen, 1993; Mäkaelä et al., 1994), identificadas na inflamação pulpar e periapical (Gusman et al., 2002; Wahlgren et al., 2002) além de estarem relacionadas ao crescimento e invasão de tumores bucais (Sorsa et al., 2004). Em relação à estrutura dental, as MMPs também são citadas por apresentarem um papel

importante na destruição do colágeno dentinário nos processos de cárie (Tjaderhane et al., 1998a; Sulkala et al., 2001), bem como por estarem relacionadas à degradação da camada híbrida pela desestruturação do colágeno nas restaurações adesivas (Pashley et al., 2004; Mazzoni et al., 2006).

Diversos tipos de MMPs têm sido identificadas na saliva (Ingman et al., 1994) e na dentina humana sadia (Mazzoni et al., 2007). A maioria das MMPs presentes na saliva parecem originar-se dos sulcos gengivais ao redor dos dentes (Sorsa et al., 1990; Ingman et al., 1994), mas no que diz respeito às collagenases, estas parecem ser secretadas também pela saliva originada na parótida (Mäkelä et al., 1994). No caso das MMPs dentinárias, presume-se que estas são secretadas pelos odontoblastos (Palosaari et al., 2000; 2003) os quais, sintetizam diversos tipos de MMPs, como as gelatinases MMP-2 e MMP-9 (Tjaderhane et al., 1998b), a collagenase MMP-8 (Palosaari et al., 2000), a MMP-14 (Palosaari et al., 2003) e MMP-20 (Sulkala et al., 2002).

Muitos estudos têm identificado a presença das MMPs na dentina coronária humana sadia, principalmente as gelatinases MMP-2 e MMP-9, que são o objeto de estudo deste trabalho. Martin-De Las Heras et al. (2000) identificou pela primeira vez, a presença da gelatinase A (MMP-2) na matriz dentinária mineralizada humana, tanto na sua forma latente, como principalmente, na sua forma ativa. Em sequência, esta mesma enzima foi identificada por zimografia, na matriz dentinária desmineralizada (Van Strijp et al., 2003). Ambas as collagenases MMP-2 e MMP-9 foram detectadas em extratos de matriz de dentina humana sadia desmineralizada, após os protocolos de extração realizados. Neste estudo, a maior atividade das MMPs foi encontrada quando os protocolos de extração utilizavam soluções ácidas (ácido cítrico e ácido acético – pH 2,3), enquanto que as soluções de EDTA (pH 6,4), com pH mais elevado, extraíram menores quantidades de MMPs ativas (Mazzoni et al., 2007). O estudo de Vidal (2012) avaliou a atividade proteolítica das MMPs (-2, -8 e -9) após diferentes protocolos de extração de proteína (hidroclorato de guanidina associado ao EDTA; ácido fosfórico; ácido acético e hidroclorato de guanidina associado ao ácido acético). A zimografia mostrou atividade gelatinolítica referente a MMP-2 para todos os protocolos avaliados, no entanto, nenhum destes protocolos foi capaz de extrair a MMP-9 na sua forma ativa.

Santos et al. (2009) investigaram se estas enzimas previamente identificadas na dentina coronária humana também poderiam ser detectadas na dentina radicular.

Os resultados deste estudo mostraram que a atividade gelatinolítica correspondente às MMP-2 e MMP-9 foram identificadas, por meio de zimografia, tanto na dentina coronária como na dentina radicular. No entanto, a MMP-2 se mostrou mais evidente na matriz dentinária radicular desmineralizada, enquanto que a MMP-9, no geral, mostrou níveis mais baixos, sendo principalmente encontrada nas frações mineralizadas da dentina.

Em um estudo mais recente (Kato et al., 2011), avaliando a atividade das MMP-2 e -9 na dentina coronária e radicular humana e bovina, após dois protocolos de extração, a análise por zimografia revelou atividade gelatinolítica correspondente a MMP-2 e MMP-9 para ambos os substratos avaliados. A atividade gelatinolítica da MMP-9 foi semelhante para os substratos testados, mas a atividade gelatinolítica da MMP-2 foi cerca de 30% maior para a dentina humana (coronária e radicular) do que para a dentina bovina. E ainda, comparando a atividade da MMP-2 nas amostras de dentina coronária e radicular, observou-se nesse estudo, uma atividade 20% maior para as amostras de dentina radicular.

Mais recentemente, outros estudos (Boushell et al., 2011; Niu et al., 2011) têm descrito um perfil, baseado na localização e atividade das gelatinases (MMP-2 e MMP-9), ao longo das diferentes camadas da dentina humana sadia. A concentração e distribuição destas gelatinases são variáveis ao longo das diferentes profundidades de dentina. A MMP-2 foi descrita por Niu et al. (2011), como a maior gelatinase da dentina e concentrada nos odontoblastos, na dentina profunda e na junção amelodentinária. Esta MMP também foi identificada na região de dentina média (Boushell et al., 2011). Já a MMP-9 mostrou uma distribuição decrescente da região mais profunda da dentina para a região mais superficial (Niu et al., 2011). Estes estudos são importantes, uma vez que o potencial de degradação do colágeno deve ocorrer de forma diferente dependendo da região em que a dentina é exposta.

2.3 O papel das MMPs na progressão da cárie dentária

O maior entendimento de que as enzimas endógenas são responsáveis pela degradação da matriz de colágeno desmineralizado foi descrito a partir dos estudos relacionados à doença cárie, quando mostraram que as MMPs presentes tanto na dentina quanto na saliva, estariam relacionadas à progressão da cárie dentária. Dessa forma, embora os processos que envolvem a doença cárie e a erosão dental, sejam distintos no que diz respeito à histopatogenia e ao envolvimento bacteriano, ambos os processos envolvem alternância entre períodos de desmineralização e remineralização, bem como apresentam degradação do colágeno previamente desmineralizado por um agente ácido. Por esse motivo, antes de se apresentar o papel das MMPs na erosão dental, é importante mostrar os principais estudos relacionados à cárie dentária, que trouxeram uma maior elucidação no que diz respeito a participação das enzimas endógenas, na degradação da matriz dentinária.

Como já se sabe, a cárie dentária é definida como uma doença infecciosa, oriunda de determinadas bactérias (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacilli*) presentes na cavidade bucal. Essas bactérias ao se instalarem sobre a superfície dental, produzem ácidos, que ao se difundirem através dos tecidos dentários mineralizados, promovem uma queda no pH para abaixo de 5,5, e como consequência, ocorre a dissolução da porção mineral (Chaussain-Miller et al., 2006). Este processo de desmineralização leva à exposição da matriz de colágeno dentinária e, conseqüentemente, a sua destruição.

Tradicionalmente, pensava-se que a degradação desta matriz de colágeno era ocasionada por enzimas produzidas pelas bactérias bucais, envolvidas no início e na progressão da cárie dental (Armstrong, 1958). No entanto, estudos *in vitro* mostraram que as bactérias cariogênicas foram capazes de causar apenas a desmineralização da superfície dentinária, não degradando portanto, a matriz de colágeno (Katz et al., 1987). As bactérias identificadas nas lesões dentinárias, em estudos *in situ*, não mostraram atividade colagenolítica em ambos os substratos (dentina sadia e desmineralizada) testados (van Strijp et al., 1997). Corroborando com estes achados, o fato de que a collagenase bacteriana não resiste à exposição ácida (pH 4,3) durante a fase de desmineralização, em um modelo de ciclagem de pH proposto por Kawasaki e Featherstone (1997), sugere que a participação desta

enzima bacteriana na degradação da matriz de colágeno deve ser menos importante do que se pensava inicialmente.

Em um estudo de grande contribuição para a área, Tjäderhane et al. (1998a) investigaram se as MMPs humanas poderiam participar na degradação da matriz orgânica dentinária, após a desmineralização. Inicialmente, este estudo avaliou 32 amostras de bactérias bucais, coletadas da saliva de pacientes com alta incidência de lesões de cárie dental. As análises de zimografia mostraram não haver atividade gelatinolítica e collagenolítica para estas amostras de bactérias, sugerindo que as principais enzimas envolvidas na degradação da matriz dentinária são de origem endógena. Em outra avaliação, amostras de dentina cariada, coletadas de dentes extraídos, analisadas por meio de Western blot, identificou três MMPs humanas: as gelatinases MMP-2 e MMP-9 e a collagenase MMP-8. Neste mesmo estudo, outra análise de grande importância foi realizada para avaliar a ativação das MMPs encontradas na saliva humana, em função da variação do pH. As enzimas salivares foram expostas a baixos valores de pH (2,3 – 5,5), seguido da neutralização (6,0 - 7,0), na intenção de simular a sequência que ocorre durante o processo cariioso. Os resultados da análise por zimografia demonstraram que a saliva isenta de tratamento ácido não apresenta qualquer alteração, comparada à saliva ativada pelo APMA, que apresentou uma atividade gelatinolítica aumentada em mais de duas vezes. Após a ativação empregando diferentes valores de pH (2,3 – 7,0), foi possível observar um aumento na atividade gelatinolítica, mostrando que a taxa de ativação foi dependente do pH, sendo máxima na faixa de pH 2,3. Os autores observaram um aumento na atividade gelatinolítica da MMP-9, após incubação em pH 4,5, seguido da neutralização, quando o tempo de incubação no pH neutro foi aumentado de 30 min para 180 min. Para demonstrar que estas enzimas salivares de fato degradam a matriz dentinária, os autores avaliaram ainda a incubação de amostras de dentina totalmente ou parcialmente desmineralizadas, em saliva ativada ou não em pH ácido. Os resultados da microscopia eletrônica de transmissão e varredura mostraram que para ambas as amostras de dentina (totalmente ou parcialmente desmineralizadas) houve claramente uma degradação da matriz orgânica dentinária, após 10 dias de incubação destas amostras na saliva previamente ativada em pH ácido, o que não ocorreu para o grupo controle. Dessa forma, os resultados deste estudo mostram uma forte correlação entre as MMPs endógenas e a progressão da doença cárie. Este fato está relacionado à ativação ácida (pH 4,5) das MMPs

latentes, seguida pela neutralização do pH que mostrou um grande aumento na atividade destas enzimas, em condições semelhantes a que ocorre no processo de lesão de cárie. Assim, os autores ressaltam que os ácidos de origem bacteriana são fundamentais para que a desmineralização inicial ocorra, e em consequência disto, a ativação das enzimas endógenas. Com a desmineralização, as fibras colágenas da matriz orgânica dentinária são expostas, e dessa forma, as MMPs ativas irão degradar essa matriz de colágeno, no momento em que o pH retorna a neutralidade, devido a ação dos tampões salivares.

No estudo de Sulkala et al. (2001) avaliando os efeitos de inibidores de metaloproteinase, nas MMPs salivares humanas, os autores puderam demonstrar que a ativação destas enzimas é pH dependente. Os resultados demonstraram uma maior atividade gelatinolítica após incubação com o APMA (controle positivo), seguido pela ativação ácida com os pHs 4,5 e 5,0. A ativação destas enzimas salivares foi significativamente reduzida quando incubada em pH 6,0. Quando a incubação era realizada previamente em CMT-3 (tetraciclina quimicamente modificada – 3), utilizado como inibidor de MMPs (atua na síntese e na inibição das MMPs secretadas) foi observada uma redução significativa na atividade gelatinolítica para as MMPs ativadas tanto pelo APMA, como pela variação dos pHs (4,5 – 6,0). Neste mesmo estudo foi ainda observada uma redução na progressão da lesão de cárie dentinária em molares de ratos, em um modelo *in vivo*, quando dois inibidores de MMPs (CMT-3 e ácido zoledrônico) foram utilizados isolados, ou em combinação.

2.4 O papel das MMPs na progressão da erosão dental

Considerando que a desmineralização que ocorre na erosão dental seja causada por ácidos de origem endógena ou exógena, sem o envolvimento bacteriano, presume-se que as enzimas derivadas do próprio hospedeiro possam ser responsáveis pela degradação da matriz orgânica dentinária desmineralizada (Buzalaf et al., 2012). São escassos os estudos disponíveis na literatura que avaliam o papel das MMPs na progressão da erosão dental.

Magalhães et al. (2009) descrevem que apesar da falta de estudos, é possível considerar que um processo de degradação da matriz orgânica dentinária,

semelhante ao descrito para a cárie dentária, também ocorra no caso dos processos erosivos.

Uma revisão de literatura recente (Buzalaf et al., 2012) avaliando o papel das enzimas endógenas na progressão da erosão dental descreve o mecanismo de ação pelo qual as MMPs são ativadas em pH ácido. De acordo com a revisão, as formas purificadas das MMPs (-2, -8 e -9), bem como estas mesmas enzimas encontradas na saliva humana, são ativadas em baixo pH (4,5), no entanto, embora ativas, causam degradação da matriz de colágeno apenas quando o pH do meio retorna a neutralidade. Os autores sugerem que esta mesma sequência de eventos, relacionada primeiramente a uma queda no pH causada por ácidos, seguida pela neutralização do meio, devido a ação dos tampões salivares, permitem com que ocorra a ativação das MMPs. Este evento ocorreria tanto para os processos de cárie dentária, como descrito por Tjäderhane et al. (1998a), quanto para os processos de erosão dental. Este mecanismo pelo qual os episódios alternados de desmineralização e degradação da matriz de colágeno acontecem são ilustrados neste estudo (Figura 2.3). A ilustração mostra que, durante o processo erosivo, o baixo pH dos agentes intrínsecos ou extrínsecos, causam a desmineralização e a exposição das fibras colágenas, juntamente com a ativação das MMPs dentinárias e salivares. Com o retorno do pH aos valores de neutralidade, as enzimas levam a degradação da matriz orgânica desmineralizada, resultando na progressão do processo erosivo na dentina.

Um grupo de pesquisadores (Kato et al., 2009; 2010a,b; 2012; Magalhães et al., 2009; Hannas et al., 2010), considerando que o mecanismo de ação das MMPs presentes na dentina e saliva humanas seja o mesmo descrito para a cárie dentária, recentemente realizou uma série de estudos *in vitro* e *in situ*. Estes estudos avaliaram a utilização de inibidores de MMPs como forma de preservar a matriz de colágeno exposta, e consequentemente, reduzir a perda de dentina durante os desafios erosivos, limitando assim a sua progressão.

Figura 2.3 - Apresentação esquemática das sequências alternadas de desmineralização e degradação da matriz orgânica em uma lesão de dentina erodida, demonstrando as mudanças no pH (A) e mudanças correspondentes na lesão erosiva (B). Imediatamente depois de um desafio erosivo (DE), o pH diminuiu abaixo do nível no qual a desmineralização ocorre ($pH \leq 4,5$, linha pontilhada). Abaixo deste pH, as MMPs latentes são convertidas nas formas ativas (Tjäderhane et al., 1998). De acordo com a capacidade tampão da saliva, o pH aumenta lentamente, mas a desmineralização continua até o pH 5,5 (DM = período de desmineralização). Durante a desmineralização, as fibrilas colágenas da matriz orgânica ficam expostas (B). Durante o pH baixo, a atividade das MMPs é baixa. Com o aumento do pH, a atividade das MMPs aumenta e então a matriz de colágeno desmineralizada é hidrolisada (DC = degradação do colágeno) (B). A sequência é repetida a cada desafio erosivo

Fonte: Buzalaf et al. (2012)

Uma série de protocolos *in situ* foi realizada, inicialmente, para avaliar o efeito protetor dos inibidores de MMPs na progressão da erosão dental. O uso desses inibidores foi testado em voluntários que utilizaram um dispositivo intra oral contendo espécimes de dentina humana ou bovina, submetidos a desafios erosivos extra orais em coca-cola (pH 2,6).

No primeiro estudo, Kato et al. (2009) testaram a utilização do chá verde como possível inibidor de metaloproteinase. A análise dos espécimes, por perfilometria, concluiu que a imersão nesta solução, após os desafios erosivos,

causou uma redução significativa da perda de dentina, quando comparado com a imersão em água.

Magalhães et al., 2009 avaliaram não apenas o chá verde, mas um extrato contendo o princípio ativo do chá verde e a clorexidina foram testados como inibidores de MMPs, e comparados a uma solução de flúor e a água como controles positivo e negativo, respectivamente. Após os desafios erosivos, os espécimes foram submetidos a um protocolo de abrasão, e em seguida tratados com as respectivas soluções para avaliação da perda de dentina por perfilometria. Os resultados deste estudo demonstraram que os possíveis inibidores de MMPs testados são promissores na redução da perda dentinária causada pelos processos erosivos-abrasivos.

O estudo de Kato et al. (2010a) avaliou o uso de inibidores de MMPs incorporados em uma formulação em gel, para a prevenção da erosão dental. Os géis testados continham extrato de chá verde, clorexidina, flúor como controle e um gel placebo sem nenhum princípio ativo, os quais foram aplicados aos espécimes de dentina bovina, previamente aos desafios erosivos. A análise perfilométrica revelou uma redução significativa na perda de dentina com a aplicação dos géis contendo os inibidores de MMPs, comparados aos que continham flúor e placebo. Além do mais, a análise por microscopia eletrônica de varredura mostrou que os géis contendo os inibidores de MMPs causaram uma obliteração dos túbulos dentinários. O mesmo resultado foi encontrado quando o efeito do ferro foi testado na inibição das MMPs purificadas -2 e -9, bem como, quando adicionado a um gel para avaliação sobre a dentina humana. A análise por zimografia mostrou que o ferro inibiu a atividade das MMPs -2 e -9, e a análise perfilométrica revelou uma inibição completa do desgaste em dentina com a utilização do gel contendo o ferro como inibidor de MMPs (Kato et al., 2010b).

Em um estudo *in vitro*, Hannas et al. (2010) avaliaram o efeito protetor dos inibidores de MMPs, na prevenção da erosão em dentina, quando incorporados a dentifrícios. Os autores testaram um dentifrício placebo, um contendo flúor, e outro contendo os inibidores de MMPs: extrato de chá verde e clorexidina em duas concentrações diferentes. Os espécimes de dentina humana foram submetidos a 4 desafios erosivos, por 5 dias, e ao final do primeiro e do último desafio foram submetidos a escovação com os respectivos dentifrícios. Os resultados mostraram uma diferença significativa na perda de dentina quando os dentifrícios utilizados

continham inibidores de MMPs, em comparação ao placebo e ao dentifrício contendo flúor apenas, sugerindo então, que os dentifrícios com inibidores de MMPs em sua formulação foram mais efetivos para a prevenção da erosão dental do que o dentifrício fluoretado.

Todos os agentes utilizados nos estudos *in situ* citados apresentam eficiência comprovada em relação à inibição da atividade das MMPs. No entanto, os protocolos, bem como os métodos de avaliação adotados não permitem fazer uma correlação direta da redução da perda de dentina com a inibição da atividade das MMPs, causada pelos agentes utilizados (Buzalaf et al., 2012).

Um estudo *in vitro* (Kato et al., 2012) foi então, realizado para comprovar o mecanismo de ação desses agentes. Para isso, fatias de dentina foram desmineralizadas com ácido cítrico (pH 2.3), para a criação de uma camada de matriz orgânica desmineralizada, e em seguida foram tratadas com os géis contendo os inibidores de MMPs e incubadas em saliva artificial contendo collagenase, por 5 dias. Ao final, as fatias de dentina foram analisadas por perfilometria e a degradação do colágeno foi avaliada pelo conteúdo de hidroxiprolina liberado na solução de incubação. A perda de dentina, bem como o conteúdo de hidroxiprolina foram significativamente menores para os grupos tratados com os géis contendo os inibidores de MMPs, em comparação aos grupos com flúor, placebo ou sem tratamento, mostrando que os inibidores utilizados, reduziram de fato, a degradação do colágeno.

Assim, baseando-se nos estudos disponíveis até o momento, pressupõem-se que as MMPs presentes na dentina humana podem ser ativadas por ácidos causadores da erosão dental, levando a uma degradação da matriz orgânica dentinária e contribuindo para a progressão desta condição.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo *in vitro* teve como objetivos:

- Avaliar a influência do pH sobre a atividade funcional das MMP-2 e MMP-9 presentes na dentina humana.
- Identificar em que pH ocorreu a maior ativação das MMPs e a maior solubilização da matriz de colágeno desmineralizada.
- Comparar a atividade proteolítica ocorrida nas dentinas humana coronária e radicular.

As hipóteses testadas foram: 1) A atividade gelatinolítica das MMPs varia em função do pH a qual elas são expostas; 2) A maior ativação das MMPs ocorre em valores de pH ácido; 3) A atividade proteolítica das dentinas humana coronária e radicular são distintas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Nº Parecer: 544.544 – Anexo A).

4.1 Preparo do pó de dentina

Para a realização deste estudo foram utilizados 20 terceiros molares humanos inclusos, obtidos de voluntários jovens (18 - 31 anos) e coletados logo após a exodontia na clínica do curso de Atualização em Cirurgia, módulos I e II, da Fundectó, mediante autorização formal dos pacientes (Anexo B). Todas as etapas deste estudo foram realizadas nos laboratórios de Pesquisa Aplicada à Dentística e de Pesquisa Básica “Edmir Matson”, do Departamento de Dentística, bem como no Centro de Pesquisa em Bioquímica Oral, do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral, ambos da Faculdade de Odontologia da USP.

Imediatamente após a coleta, os dentes foram limpos com curetas periodontais, seguido de profilaxia com pasta de pedra pomes e água, e armazenados em freezer - 80°C até o momento de sua utilização, por um período que não excedeu 30 dias. Os dentes congelados foram então seccionados em uma cortadeira automática (Isomet® 1000 Precision Saw, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), separando-se inicialmente a coroa da raiz, e em seguida, realizando-se cortes de 1 mm de espessura nas porções coronária e radicular (Figura 4.1). Foram obtidas, em média, 3 fatias da porção radicular e 3-4 fatias da porção coronária para cada dente, excluindo sempre a fatia com envolvimento na região de furca, e a primeira fatia da porção mais externa da coroa.

Após a obtenção das fatias, o tecido pulpar foi removido com o auxílio de limas endodônticas e as superfícies de esmalte e cemento radicular foram totalmente removidas, utilizando-se um disco abrasivo de Al₂O₃ (granulação 120) para desgaste desses substratos em uma Politriz (EcoMet® Twin Variable Speed

Grinder-Polisher, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), em alta velocidade e sob constante refrigeração. As fatias de dentina foram divididas de acordo com os substratos: dentina coronária (DC) e dentina radicular (DR). A seguir foram lavadas em cuba ultrassônica (Digital Ultrasonic Cleaner, Kondortech, São Carlos, SP, Brasil), com água destilada por 5 min. Ao final, as fatias foram armazenadas separadamente em freezer - 80°C, por pelo menos 24 h.

Figura 4.1 – (A) Dente posicionado para os cortes; (B) Início do corte transversal na região amelocementária; (C) Separação da coroa e da raiz; (D) Fatias de dentina coronária e radicular obtidas e (E) Fatia dentinária com 1 mm de espessura

Após este período, as fatias de DC e DR congeladas foram trituradas separadamente, em um moinho de bolas automático (Retsch®, MM 400, Newtown, PA, EUA) (Figura 4.2A), por 7 min, a 30 Hz para a obtenção do pó (Figura 4.2B).

Em seguida, o pó de dentina foi peneirado (Tamis, Telatest, Brasil) (Figura 4.3A e 4.3B) para obtenção de um pó com partículas de tamanho $\approx 100 \mu\text{m}$ (Figura 4.3C). O pó final de DC e DR foi armazenado separadamente e devidamente identificado, em freezer - 80°C até a realização da extração das proteínas, por um período que não excedeu 3 meses.

Figura 4.2 – (A) Moinho de bolhas automático; e (B) e (C) Pó de dentina obtido logo após a trituração

Figura 4.3 – (A) Peneira Tamis; (B) Pó de dentina sendo peneirado; (C) Obtenção do pó de dentina com partículas até 100 µm

4.2 Extração das proteínas

A extração das proteínas realizada neste estudo foi baseada no protocolo que utiliza o ácido fosfórico (AF) como solução desmineralizadora, conforme descrito por Breschi et al. (2010a).

Inicialmente, o pó de DC e DR armazenados foram pesados em uma balança analítica de precisão, e separados em 4 alíquotas de 0,5 g cada. Estas alíquotas foram então desmineralizadas pela incubação em 1,5 mL de ácido fosfórico a 1%, por 10 min a 4°C, sob constante agitação. Em seguida, o ácido foi tamponado com 100 µL de NaOH 4M, e a amostra centrifugada a 4000 rpm (Himac CF15R, Hitashi, Tóquio, Japão), por 10 min a 4°C para o descarte do sobrenadante. O precipitado foi então ressuspensionado em 1,5 mL de água destilada (aproximadamente 4°C), lavado

rapidamente, e centrifugado novamente conforme descrito anteriormente. Após a centrifugação, a água foi descartada e o pó ressuspendido em 1 mL do tampão de extração (Quadro 4.1), *overnight* a 4°C, sob constante agitação. No dia seguinte, a amostra foi tratada em ultrassom (Thornton Eletrônica Ltda., São Paulo, Brasil) a 30W, por 10 min a 4°C, e em seguida centrifugada como descrito anteriormente, para promover a separação do precipitado e do sobrenadante.

Reagente	Concentração*
Tris-HCl	50 mM
CaCl ₂	5 mM
NaCl	100 mM
Triton X-100	0,1%
NONIDET P-40	0,1%
ZnCl ₂	0,1 mM
NaN ₃	0,02%

*Concentração utilizada para um volume final de 100 mL

Quadro 4.1 – Composição do tampão de extração

O esquema da figura 4.4 mostra a sequência realizada no protocolo de extração das proteínas com AF, para as amostras de DC e DR.

Figura 4.4 - Esquema mostrando o passo a passo do protocolo de extração das proteínas com AF

Ao final da extração, o precipitado (pó de dentina desmineralizado) foi liofilizado e armazenado a -20°C . O sobrenadante (extrato contendo as proteínas), por sua vez, foi centrifugado (5000 rpm, por 10 min, a 4°C), utilizando-se colunas concentradoras (Vivaspin 6, 10kDa, MWCO PES, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) para a concentração das proteínas. Estas colunas apresentam um filtro de 10kDa, pelo qual passaram apenas as proteínas que apresentavam peso molecular inferior a este. A centrifugação foi repetida até que o volume inicial, de aproximadamente 4 mL, dos extratos (DC e DR) fosse reduzido até um volume final de $\approx 600\ \mu\text{L}$, e para isso, as colunas concentradoras foram trocadas sempre que necessário, devido a eficácia do filtro. Ao final da centrifugação, o volume que passou pelo filtro foi descartado, ficando-se apenas com o extrato de proteínas concentrado, no qual foi realizada a quantificação da concentração total das proteínas.

O pó de dentina desmineralizado foi utilizado para avaliação do conteúdo de colágeno solubilizado, pela análise de hidroxiprolina, e o extrato de proteínas foi

utilizado para a verificação da atividade gelatinolítica das MMPs, por zimografia. O esquema abaixo ilustra as etapas realizadas na metodologia (Figura 4.5).

Figura 4.5 - Esquema ilustrando as etapas seguidas na metodologia

4.3 Quantificação das proteínas

A concentração total das proteínas foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951), e realizada no extrato de proteínas concentrado, como descrito anteriormente, em triplicata. Para esta quantificação foi utilizada uma curva padrão contendo albumina sérica nas concentrações de 4, 8, 12, 16 e 20 $\mu\text{g/mL}$. As leituras da absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (DU® 800 Spectrophotometer, Beckman Coulter, Brea, CA, EUA), com comprimento de onda de 660 nm. Os valores da absorbância obtidos em mg/mL foram tabulados em uma planilha no Excel (Microsoft® Excel® para Mac 2011, Versão 14.0.0) e convertidos em $\mu\text{g/mL}$.

Esta análise é fundamental para determinar e padronizar a quantidade exata de proteínas a ser utilizada para cada amostra, e para que desta forma, fosse possível comparar os grupos experimentais, analisados por zimografia.

4.4 Tratamento das amostras

Para avaliar o efeito do pH sobre a atividade das MMPs foi utilizada uma solução tampão de fosfato de potássio (KH_2PO_4) 0.1 M. Esta solução foi preparada e ajustada em diferentes faixas de pH, originando então 5 soluções com valores de pH iguais a 2.5, 4.5, 5.0, 6.0 e 7.0. Uma solução de APMA 2 mM foi utilizada como controle positivo do estudo, uma vez que este é o agente químico comumente utilizado para a ativação da forma latente das MMPs (Tjäderhane et al., 1998a). A tabela 4.1 descreve os 6 grupos experimentais utilizados neste estudo, para a ativação das MMPs.

O tratamento das amostras foi realizado, incubando-se a amostra (extrato de proteínas, no caso da zimografia e o pó desmineralizado, no caso da análise de hidroxiprolina) em cada uma das respectivas soluções descritas na tabela 4.1, por um período de 1 h, a 37°C, em estufa. Este tratamento foi realizado sempre imediatamente anterior à realização dos protocolos de análise, como serão descritos mais detalhadamente adiante.

Tabela 4.1 – Descrição dos grupos experimentais

Grupo experimental	Solução
APMA (controle)	Acetato de 4-aminofenilmercúrio
pH 2.5	Tampão de fosfato de potássio pH 2.5
pH 4.5	Tampão de fosfato de potássio pH 4.5
pH 5.0	Tampão de fosfato de potássio pH 5.0
pH 6.0	Tampão de fosfato de potássio pH 6.0
pH 7.0	Tampão de fosfato de potássio pH 7.0

4.5 Metodologias avaliadas

4.5.1 Atividade gelatinolítica por zimografia

A zimografia é uma técnica amplamente utilizada para analisar as enzimas que degradam a matriz extracelular (MMPs), através da utilização de extratos obtidos de tecidos biológicos (Kupai et al., 2010). A expressão das MMPs é identificada pela degradação do seu substrato de preferência e pela identificação do seu peso molecular (Snoek-van Beurden; Von den Hoff, 2005). Desta forma, através da zimografia é possível determinar as formas latente e ativa das MMPs, uma vez que estas apresentam pesos moleculares distintos. Descrita como uma técnica simples e sensível (Kupai et al., 2010), a zimografia permite que seja realizada uma avaliação qualitativa e semiquantitativa dos resultados obtidos.

4.5.1.1 *Preparo das amostras*

Para realização da zimografia, 80 µg de proteínas dos extratos foram utilizados como amostra, o que correspondeu a um volume de 12 µL para as amostras de DC e 11 µL para as amostras de DR. Para uniformizar os volumes das amostras de dentina coronária e radicular, para esta última, foi acrescentado um volume de 1 µL de água destilada. As amostras foram inicialmente incubadas em 8 µL de suas respectivas soluções experimentais (Tabela 4.1), conforme descrito no item 4.4 deste capítulo. Ao final da incubação foi acrescentado às amostras, 5 µL do tampão de amostra não redutor [5x], utilizado em uma proporção de 1:4 tampão/amostra.

Um padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ Standards, Kaleidoscope™, BioRad Laboratories Inc, CA, EUA), com valores pré-definidos (10kDa, 15kDa, 20kDa, 25kDa, 37kDa, 50kDa, 75kDa, 100kDa, 150kDa e 250kDa)

foi utilizado e inserido sempre no primeiro poço de cada gel, em um volume de 10 μ L, para a identificação da massa molecular das MMPs.

4.5.1.2 Preparo dos géis

Inicialmente, um gel de poliacrilamida a 10% ou 6%, copolimerizado com gelatina A (90-110 Bloom, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), em uma concentração final de 0,1% foi preparado como gel de corrida e inserido ao conjunto de placas. Após a sua polimerização, um gel de empilhamento foi inserido acima e polimerizado juntamente com um pente de 1,0 mm de espessura, utilizado para a delimitação dos poços de inserção das amostras (Figura 4.6A). A tabela 4.2 descreve a composição dos géis utilizados.

Tabela 4.2 – Composição dos géis de poliacrilamida

Reagente / Solução	Gel de corrida 10%	Gel de corrida 6%	Gel de empilhamento 4%
Água destilada	4,4 mL	6,5 mL	2,7 mL
30% Acrilamida / 0,8%	5 mL	3 mL	670 μ L
Bisacrilamida			
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	3,8 mL	3.8 mL	-----
Tris 0.5M pH 6.8	-----	-----	1 mL
Gelatina A 1%	1,5 mL	1.5 mL	-----
SDS 10%	150 μ L	150 μ L	40 μ L
Persulfato de amônio	150 μ L	150 μ L	40 μ L
TEMED	6 μ L	12 μ L	4 μ L

4.5.1.3 Corrida e Incubação do gel

Para a corrida do gel, o conjunto de placas contendo os géis polimerizados foi adaptado na cuba (Figura 4.6B) e o tampão de corrida foi inserido na parte inferior e

superior, até o completo preenchimento da mesma. Em seguida, as amostras previamente preparadas foram carregadas nos seus respectivos poços (Figura 4.6C), e submetidas à eletroforese em condições não redutoras.

Figura 4.6 – (A) Suporte com as placas de vidro e o pente posicionados para a polimerização dos géis; (B) Conjunto de placas com os géis polimerizados posicionados na cuba onde ocorreu a eletroforese; e (C) As amostras e o padrão de peso molecular (PM) devidamente carregados nos seus respectivos poços de cada gel (setas)

Para isso, os eletrodos foram devidamente acoplados à fonte do equipamento e a voltagem mantida constante em 90 V (Figura 4.7A). A corrida do gel foi realizada em uma temperatura de 4°C durante aproximadamente 1:30 h (Figura 4.7B). O equipamento utilizado foi o Mini-Protein Tetra-Cell (BioRad, CA, EUA).

Figura 4.7 – (A) Eletrodos conectados à fonte do equipamento e voltagem programada em 90 V; e (B) Corrida do gel sendo realizada

Após a corrida, o dispositivo foi desmontado e o gel lavado 2 vezes com uma solução de Triton X-100 2%, por 30 min, sob constante agitação. Após a lavagem, o gel foi incubado com tampão de incubação para MMP (50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl_2 , pH 7.4), em estufa a 37°C, por 24 h.

4.5.1.4 Coloração e descoloração do gel

Após o período de incubação, os géis foram corados por 1 h com uma solução de Coomassie Blue R-250 0,125%, e descorados com uma solução aquosa de metanol até o aparecimento das bandas, para a obtenção do zimograma (Figura 4.8). Ao final, os zimogramas obtidos foram escaneados e avaliados por densitometria.

Figura 4.8 – Imagem de um dos zimogramas obtido após as etapas de coloração e descoloração

4.5.2 Conteúdo de colágeno solubilizado pela liberação de hidroxiprolina (HYP)

A análise do conteúdo de hidroxiprolina liberada no tecido é um método bioquímico comumente utilizado para avaliar o metabolismo e a regulação do colágeno (Jamall et al., 1981; Readdy; Enwemeka, 1996). Este método tem sido descrito para avaliar de forma indireta a atividade proteolítica das enzimas nesse substrato, uma vez que esta análise permite estimar o percentual de colágeno que foi solubilizado no meio (Tezvergil-Mutluay, 2010). Isso é possível, pois o método baseia-se no fato de que o colágeno do tipo I, que é o principal constituinte da matriz orgânica dentinária (Ten Cate et al., 2008) é composto por cerca de 10% do aminoácido hidroxiprolina (White, 1968; Borstein; Sage, 1980), o qual está presente

em pequenas concentrações ou até mesmo não pode ser encontrado em outras proteínas (White, 1968).

4.5.2.1 Protocolo

Para a realização desta análise foi utilizado o pó de dentina coronária e radicular, previamente desmineralizados, obtidos após o protocolo de extração. Inicialmente, o pó de dentina foi liofilizado, e em seguida, separado em alíquotas de 30 mg (n=8) para cada um dos 6 grupos experimentais (Tabela 4.1). Este procedimento foi realizado para o pó de DC e DR. Após isto, as amostras foram lavadas brevemente com água destilada, centrifugadas a 14.000 x g (Himac CF15R, Hitashi, Tóquio, Japão) por 10 min, a 4°C, e o sobrenadante removido. Em seguida, o precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de cada solução testada (Tabela 4.1), durante 1h, a 37°C, sob constante agitação. Após este período, as amostras foram centrifugadas (14.000 x g, por 10 min, 4°C) e o sobrenadante removido. O precipitado foi então ressuspensionado em 1 mL do tampão de incubação (Quadro 4.2) e mantido neste meio (pH 7,5), durante 24 h a 37°C, sob constante agitação.

Reagente	Concentração*
HEPES	50 mM
CaCl ₂	5 mM
ZnCl ₂	0,001 mM
NaCl	150 mM
PMSF	0,3 mM
NaN ₃	3 mM

* Concentração utilizada para um volume final de 1000 mL

Quadro 4.2 – Composição do tampão de incubação

Após o período de incubação, as amostras foram novamente centrifugadas ($14.000 \times g$ por 10 min a 4°C) e os seus respectivos sobrenadantes foram coletados para serem utilizados.

Para a avaliação do conteúdo de hidroxiprolina liberada, o protocolo utilizado neste estudo foi baseado na metodologia descrita por Reddy e Enwemeka (1996).

Desta forma, 500 μL dos sobrenadantes obtidos anteriormente foram utilizados como amostra. Inicialmente, estas amostras foram liofilizadas e, então, ressuspendidas em 10 μL de água destilada. Em seguida, 40 μL de NaOH 2N foram adicionados a cada amostra, realizada agitação em vórtex e centrifugação (1000 rpm, 4°C , 1 min). Em seguida, foi realizada a hidrólise em autoclave (Cristófoli, Paraná, Brasil) em um ciclo de 20 min, a 120°C (tempo total do ciclo incluindo o resfriamento de 55 min) (Figura 4.9A). Após a hidrólise, 450 μL do reagente cloramina-T 0,056 M foi adicionado, realizada agitação em vórtex e as amostras permaneceram em temperatura ambiente, por 25 min para a ocorrência da oxidação. Em seguida, 500 μL do reagente de Erlich foram adicionados (Figura 4.9B) e realizada agitação em vórtex. As amostras foram mantidas em incubação por 40 min, em estufa a 65°C (Figura 4.9C). O mesmo protocolo foi realizado em duplicata, para as amostras padrão contendo hidroxiprolina nas concentrações de 2, 5, 10, 15 e 25 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 4.9 – (A) Amostras após hidrólise em autoclave; (B) Amostras após adição do reagente de Erlich; e (C) Amostras incubadas em estufa a 65°C

Ao final, os valores de absorbância das amostras e do padrão foram mensurados em espectrofotômetro (DU 800 Spectrophotometer, Beckman Coulter, Brea, CA, EUA) a 550 nm. Os resultados mostraram a concentração de hidroxiprolina liberada no sobrenadante, de incubação do pó de dentina, em $\mu\text{g/mL}$. No entanto, os valores foram divididos pelo peso das amostras de dentina utilizadas na incubação (mg de pó de dentina), sendo expressos em $\mu\text{g HYP/mg}$ de dentina.

O esquema abaixo mostra o passo a passo do protocolo realizado para análise da liberação de hidroxiprolina, no meio de incubação do pó de dentina previamente desmineralizado, e submetido ao tratado com as soluções propostas neste estudo (Figura 4.10).

Figura 4.10 – Esquema mostrando os passos do protocolo realizado para a análise do conteúdo de hidroxiprolina liberada após os tratamentos propostos

4.6 Análise dos dados

4.6.1 Análise qualitativa da Zimografia

Os zimogramas obtidos ao final do protocolo de zimografia foram analisados densitometricamente, através da quantificação das bandas visualizadas. Esta análise foi realizada pelo programa de análise de imagens ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Após esta análise foram obtidos dados numéricos, representativos da quantificação das bandas, os quais não foram submetidos à análise estatística, sendo realizada portanto, uma análise qualitativa dos zimogramas obtidos.

O protocolo de corrida do gel foi realizado em triplicata, e desta forma a densitometria foi calculada para os três géis, obtendo-se ao final um valor de média para cada substrato avaliado (dentina coronária e radicular), a fim de permitir a confirmação dos resultados obtidos.

4.6.2 Análise estatística dos dados da HYP

Os dados obtidos na avaliação da liberação do conteúdo de hidroxiprolina foram avaliados estatisticamente utilizando ANOVA 1 fator, seguido pelo teste de Tukey para a comparação entre os grupos experimentais, adotando o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Para a comparação dos substratos (dentina coronária e radicular) em relação aos tratamentos propostos foi utilizado o Teste t de Student. Todas as análises foram realizadas utilizando o Software BioEstat 5.0 (www.mamiraua.org.br/pt-br/downloads).

5 RESULTADOS

5.1 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Os dados correspondentes à quantificação das proteínas, obtidas após o protocolo de extração estão apresentados em $\mu\text{g/mL}$. A tabela 5.1 descreve os valores de média $\pm$ DP da quantificação das proteínas, realizada em triplicata, para os dois substratos analisados (dentina coronária e radicular), obtidos após o protocolo de extração com AF.

Tabela 5.1 - Valores de média $\pm$ DP da quantificação de proteínas, obtidas após o protocolo de extração

Grupos	Quantidade de proteínas ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
Dentina Coroa (DC)	6906,3 $\pm$ 0,55
Dentina Raiz (DR)	7172,8 $\pm$ 1,72

5.2 ZIMOGRAMIA

A atividade gelatinolítica das amostras de dentina coronária, submetidas ao tratamento com a solução tampão de fosfato em diferentes faixas de pH e o controle, pode ser observada no zimograma abaixo (Figura 5.1). Os valores de média obtidos por densitometria dos três zimogramas correspondentes à dentina coronária estão expressos em densidade óptica (Figura 5.2).

Figura 5.1 - Imagem representativa de um dos zimogramas obtido para a dentina coronária mostrando a atividade gelatinolítica correspondente a MMP-2 (bandas claras) nas suas formas latente (72kDa) e ativa (66kDa) de acordo com os grupos experimentais. PM: Padrão de peso molecular com bandas expressas em kDa

Figura 5.2 - Representação gráfica dos valores de média da atividade gelatinolítica da MMP-2 para a dentina coronária, na sua forma ativa (66kDa) apresentada em densidade óptica

De acordo com os resultados da zimografia, pode-se observar nas amostras de dentina coronária, a presença de atividade gelatinolítica correspondente a MMP-2, tanto na sua forma latente como na sua forma ativa, para todos os grupos experimentais testados. Para a forma ativa da MMP-2 (66kDa), a análise densitométrica dos zimogramas obtidos revela que a atividade desta enzima é dependente do pH, sendo máxima para o pH 2.5. No entanto, os demais grupos com valores de pH mais baixo (4.5 e 5.0) também apresentaram grande atividade da MMP-2, em comparação às soluções com pH próximo ao neutro. Estas três faixas de pH ácido apresentaram atividade superior àquela observada pela ativação com APMA (controle). No que diz respeito à forma latente da MMP-2 (72kDa) expressa no zimograma acima, pode-se perceber que esta foi identificada, porém em bandas menos intensas comparada a sua forma ativa.

Não foi possível identificar atividade gelatinolítica correspondente a MMP-9, nas suas formas latente e ativa, para nenhum dos grupos experimentais testados.

A atividade gelatinolítica das amostras de dentina radicular, submetidas ao tratamento com tampão de fosfato em diferentes faixas de pH, pode ser visualizada no zimograma abaixo (Figura 5.3). Os valores de média obtidos por densitometria dos três zimogramas correspondentes à dentina radicular estão expressos em densidade óptica (Figura 5.4).

Figura 5.3 - Imagem representativa de um dos zimogramas obtido para a dentina radicular mostrando a atividade gelatinolítica correspondente a MMP-2 (bandas claras) nas suas formas latente (72kDa) e ativa (66kDa) de acordo com os grupos experimentais. PM: Padrão de peso molecular com bandas expressas em kDa

Figura 5.4 - Representação gráfica dos valores de média da atividade gelatinolítica da MMP-2 para a dentina radicular, na sua forma ativa (66kDa) apresentada em densidade óptica

Para as amostras de dentina radicular, pode-se identificar através dos resultados da zimografia, a presença de atividade gelatinolítica correspondente a MMP-2, na sua forma latente e ativa, para todos os grupos experimentais testados. Em relação a forma ativa da MMP-2 (66kDa), a análise densitométrica revela uma

maior atividade desta enzima para os grupos tratados com os pHs mais baixos (2.5, 4.5 e 5.0), sendo maior para o pH 4.5, comparados aos grupos com pHs próximos ao neutro. A forma latente da MMP-2 (72kDa) também identificada pela zimografia, apresentou-se de forma menos expressiva quando comparada a forma ativa desta mesma enzima.

Para a dentina radicular também não foi possível identificar atividade gelatinolítica correspondente a MMP-9, em ambas as formas latente e ativa, para nenhum dos grupos experimentais testados.

Na comparação realizada entre os substratos avaliados (dentina coronária e radicular) pode-se observar a presença de bandas mais marcadas correspondente à MMP-2 ativa (66kDa) para as amostras de dentina radicular (Figura 5.3).

Figura 5.5 - Imagens representativas dos zimogramas mostrando a atividade gelatinolítica da MMP-2 nas amostras de dentina da coroa e da raiz dos diferentes grupos experimentais. Pode ser observado bandas mais marcadas nos espécimes de dentina radicular. PM = Padrão de peso molecular expresso em kDa

5.3 HIDROXIPROLINA

Após a tabulação dos dados, pode-se observar que os valores de absorbância referentes aos grupos pH 2.5 e pH 4.5, para ambos os substratos avaliados (dentina coronária e radicular) apresentaram-se muito abaixo do limite de detecção do equipamento, e por essa razão não foram incluídos na análise estatística. Por essa razão, os dados analisados adiante referem-se apenas aos grupos APMA, pH 5.0, pH 6.0 e pH 7.0.

A figura 5.6 apresenta os resultados referentes à liberação de hidroxiprolina encontrada para a dentina coronária (n=8). Os valores de média ($\pm$ DP) da concentração de HYP liberada neste substrato, após os diferentes tratamentos estão apresentados na tabela 5.2.

Figura 5.6 - Média da concentração de hidroxiprolina liberada no meio (24h de incubação), para a dentina coronária, após o tratamento do pó com as soluções nos diferentes pHs. Valores expressos em µg HYP/mg de pó de dentina

Tabela 5.2 - Média ($\pm$ DP) da concentração de HYP liberada nas amostras de dentina coronária para os diferentes grupos experimentais (n=8)

Grupo experimental	HYP liberada (µg/mg de dentina)
APMA	0,43 ($\pm$ 0,2) ^b
pH 5.0	0,50 ($\pm$ 0,3) ^b
pH 6.0	0,75 ($\pm$ 0,5) ^{ab}
pH 7.0	1,11 ($\pm$ 0,5) ^a

* Letras sobrescritas distintas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$)

A análise estatística mostrou que a liberação do conteúdo de hidroxiprolina foi significativamente influenciada pelo valor de pH, sendo encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). Na comparação entre os tratamentos, pode-se verificar que para a dentina coronária, a liberação de HYP foi significativamente maior para o pH 7.0, quando comparado ao pH 5.0 e APMA ($p < 0,05$), não diferindo estatisticamente do pH 6.0 ($p > 0,05$). Não

foi observada diferença estatística entre o pH 6.0, pH 5.0 e o grupo controle ($p > 0,05$).

A figura 5.7 ilustra os resultados referentes à liberação de hidroxiprolina encontrada para a dentina radicular ($n=8$). Os valores de média ($\pm$ DP) da concentração de HYP liberada neste substrato, após os diferentes tratamentos estão apresentados na tabela 5.3.

Figura 5.7 - Média da concentração de hidroxiprolina liberada no meio (24h de incubação), para a dentina radicular, após o tratamento do pó de dentina com as soluções testadas nos diferentes pHs. Valores expressos em µg HYP/mg de pó de dentina

Tabela 5.3 - Média ($\pm$ DP) da concentração de HYP liberada nas amostras de dentina radicular para os diferentes grupos experimentais ($n=8$)

Grupo experimental	HYP liberada (µg/mg de dentina)
APMA	0,50 ($\pm$ 0,3) ^b
pH 5.0	0,60 ($\pm$ 0,2) ^b
pH 6.0	0,79 ($\pm$ 0,4) ^{ab}
pH 7.0	1,00 ($\pm$ 0,1) ^a

* Letras sobrescritas distintas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$)

No que diz respeito às amostras de dentina radicular, a análise estatística mostrou que a liberação do conteúdo de hidroxiprolina foi significativamente

influenciada pelo valor de pH, sendo encontrada diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos aplicados ($p < 0,05$). A comparação entre os tratamentos mostrou que a liberação de HYP foi significativamente maior para o pH 7.0, quando comparado ao pH 5.0 e APMA ($p < 0,05$), e não diferindo estatisticamente do pH 6.0 ($p > 0,05$). Não foi observada diferença estatística entre o pH 6.0, pH 5.0 e o grupo controle ($p > 0,05$).

A comparação realizada entre os substratos, em relação a cada tratamento aplicado, mostrou não haver diferença estatisticamente significativa, entre dentina coronária e radicular, para todos os grupos experimentais avaliados ($p > 0,05$).

6 DISCUSSÃO

A frequente exposição das dentinas coronária e radicular, como consequência dos desgastes dentais e da recessão gengival, tem tornado esse substrato extremamente vulnerável à ação dos ácidos que causam a erosão dental. Ao entrar em contato com esses agentes, inicialmente uma dissolução da porção mineral da dentina é observada, seguida pela exposição de uma camada de matriz orgânica desmineralizada, a qual se mantém inalterada, mesmo após os desafios abrasivos da escovação (Ganss et al., 2009). No entanto, apesar de ser considerada uma barreira que limita a perda de minerais, bem como a ação dos ácidos, a matriz de colágeno pode reduzir a progressão da lesão erosiva até que seja removida quimicamente pela ação de enzimas proteolíticas.

Levando em consideração que o processo erosivo acontece na ausência de bactérias, admite-se que as MMPs presentes na saliva e dentina participam da degradação do colágeno (Buzalaf et al., 2012). Os estudos recentes relacionados ao papel destas MMPs na progressão da erosão dental têm se baseado apenas na avaliação da prevenção desta lesão, a partir da utilização de inibidores de MMPs (Magalhães et al., 2009; Kato et al., 2009; 2010a; 2011; 2012; Hannas et al., 2010).

Contudo, o mecanismo pelo qual a ativação e a degradação da matriz dentinária ocorre durante os processos erosivos ainda não está bem estabelecido na literatura, uma vez que os estudos sugerem que ocorra um mecanismo semelhante ao descrito para a cárie dentária, sem que haja, de fato, esta comprovação.

Os resultados do presente estudo mostram que a ativação das MMPs da dentina humana coronária e radicular são dependentes do pH, assumindo a primeira hipótese inicialmente levantada. A avaliação por zimografia mostrou que houve atividade gelatinolítica correspondente a MMP-2, nas formas ativa (66kDa) e latente (72kDa) para todos os pHs avaliados, em ambos os substratos testados. A variação do pH mostrou que os pHs mais baixos (2.5, 4.5 e 5.0) promoveram a maior ativação da MMP-2, tanto para a dentina coronária quanto para a radicular, comparados aos pHs próximos a neutralidade (6.0 e 7.0), o que aceita a segunda hipótese proposta. Não foi observada atividade gelatinolítica correspondente a MMP-9, em ambas as formas latente e ativa para nenhum grupo experimental, em ambos os substratos.

É interessante observar que, apesar dos baixos pHs terem resultado na maior atividade funcional da MMP-2 para ambas as dentinas coronária e radicular, nenhum dos pHs testados conseguiu promover a ativação total das formas latentes desta enzima, uma vez que ainda foi possível observar a presença de bandas equivalentes a 72kDa (MMP-2 latente) para todos os grupos experimentais, embora que menos expressivas.

A avaliação da solubilização do colágeno por meio da liberação de hidroxiprolina mostrou, por sua vez, um aumento na liberação do conteúdo deste aminoácido à medida que houve um aumento no pH. Para reforçar este resultado, a incubação do pó de dentina nos pHs mais baixos (2.5 e 4.5) não resultou na degradação da matriz de colágeno dentinária, uma vez que os valores de absorbância para estes grupos mostraram-se abaixo do limite de detecção do equipamento. Esse achado corrobora com o fato de que as MMPs são consideradas proteinases neutras, apresentando sua maior atividade funcional em pH próximo a neutralidade, como descrito por Nascimento et al. (2011).

Na comparação entre os substratos, a análise por zimografia mostrou que houve maior atividade gelatinolítica correspondente a MMP-2 para a dentina radicular, fato este que corrobora com os achados de Santos et al. (2009) e Kato et al. (2011). A presença e abundância da MMP-2 proveniente da dentina coronária humana já foi descrita na literatura como sendo dependente da idade do paciente. Este fato tem sido observado de maneira decrescente com o aumento da idade (Martin-De Las Heras et al., 2000). A partir disso, Santos et al. (2009) pressupõem em seu estudo, que a presença de bandas mais evidentes na dentina radicular correspondentes a MMP-2 pode estar relacionada com o menor tempo de formação desta dentina ao ser comparada à dentina coronária quando utilizaram terceiros molares obtidos de pacientes jovens. Da mesma maneira, a amostra utilizada em nosso estudo corresponde a terceiros molares inclusos, obtidos apenas de pacientes jovens (18 - 31 anos). Vale a pena ressaltar, no entanto, que esta foi uma análise qualitativa e descritiva dos resultados, sem que se tenha realizado análise estatística. Já na avaliação da solubilização do colágeno pela liberação de HYP, a análise estatística dos dados não mostrou diferença entre a dentina coronária e radicular, para nenhum grupo experimental, mostrando que não houve uma correspondência entre os resultados para os métodos de avaliação empregados. Neste caso, a terceira hipótese levantada foi parcialmente aceita, pois foi observada

diferença na atividade gelatinolítica entre os substratos, apenas por uma análise realizada.

A partir dos resultados deste estudo, podemos traçar um paralelo com o estudo de Tjäderhane et al. (1998a), no qual os autores descrevem que um mecanismo de “ativação ácida” é responsável pela ativação das MMPs. De acordo com estes autores, a forma latente das MMPs salivares foi ativada em pH 4.5, seguida pela neutralização, em condições semelhantes ao que acontece durante o processo da cárie dentária. Esse mecanismo expõe a matriz de colágeno desmineralizada, a qual é degradada em pH neutro pela ação destas enzimas endógenas, uma vez que já foi demonstrado que as enzimas bacterianas não participam desta degradação (Kawasaki; Featherstone, 1997; Tjäderhane et al., 1998a). Vale lembrar, portanto, que neste estudo, as amostras de saliva foram expostas ao pH ácido (4.5), seguido pela neutralização deste meio, a partir da adição de Tris Base 2M até alcançar o pH 7.0. Neste caso, não houve uma preocupação em relação a padronização das amostras pela quantidade de proteínas, mas sim pela adoção de volumes iguais de saliva, o que pode resultar em quantidades diferentes de proteína presente em cada uma das amostras analisadas.

No nosso estudo, após o protocolo de extração, as proteínas foram quantificadas e uma alíquota de 80 µg de proteína foi utilizada para cada amostra. Estas foram tratadas nas suas respectivas soluções com diferentes pHs ou solução controle, não tendo sido realizado a neutralização do meio para os grupos com pHs abaixo de 7.0. Esta neutralização não foi realizada, visto que a adição de uma base para esta finalidade resultaria em volumes finais diferentes para cada amostra, uma vez que cada valor de pH necessitaria de um volume diferente de base para atingir o pH 7.0. Isto resultaria em um volume final que ultrapassaria o volume máximo permitido para cada poço do gel de poliacrilamida adotado neste estudo (30µL). Vale lembrar que, como exigido pelo próprio método da zimografia, antes de iniciar a eletroforese foi adicionado às amostras de dentina já tratadas nos seus respectivos pHs, o tampão de amostra. Este, apresenta pH 7.6 o que nos sugere ter causado uma neutralização do meio após os tratamentos realizados. Por este motivo podemos dizer que os nossos resultados corroboram com os achados descritos por Tjäderhane et al. (1998a), mostrando que o mecanismo de ativação descrito por estes autores para as MMPs salivares, também foi observado para a MMP-2 proveniente da dentina coronária e radicular humana, no presente estudo.

Estes achados são de grande importância, pois vêm mostrar que a MMP-2 presente na dentina coronária e radicular pode ter uma participação crucial na progressão da erosão dental nesses substratos. No entanto, é importante ressaltar que diferente do que acontece para a cárie dentária em que o pH crítico para a dissolução de minerais é descrito como 4.5, no caso da erosão dental não existe um pH crítico definido (Lussi et al. 2011), e além do mais, os aspectos que envolvem estes dois processos são distintos.

Embora a dentina seja considerada um substrato mais solúvel que o esmalte, não somente a composição do substrato, mas um conjunto de fatores irá determinar a força motriz para que a dissolução mineral aconteça durante a erosão dental (Shellis et al., 2014). Sabe-se que a presença de soluções sub-saturadas em relação à estrutura dental representa um fator imprescindível para que a desmineralização ocorra (Lussi et al., 2011). No que diz respeito aos fatores químicos relacionados à erosão, não apenas o pH, mas também o conteúdo de cálcio, fosfato e flúor presentes nas bebidas e alimentos ácidos irão influenciar neste grau de saturação em relação à estrutura mineral do substrato (Jaeggi; Lussi, 2006). Além do mais, a saliva representa o principal fator biológico na prevenção desta dissolução mineral, uma vez que ela age antes mesmo do ataque ácido aumentando o fluxo salivar e durante o desafio erosivo promovendo a neutralização do meio (Hara et al., 2006).

Considerando que no presente estudo, apenas o fator pH foi avaliado, os resultados encontrados sugerem que os agentes ácidos responsáveis pela erosão dental podem causar a ativação das MMPs dentinárias, uma vez que muitas bebidas e alimentos ácidos, bem como o próprio suco gástrico, no caso de pacientes com problemas gastro-esofágicos ou desordens alimentares apresentam valores de pH abaixo de 4.5, e geralmente são sub-saturadas em relação à estrutura dental. Neste estudo, a participação das MMPs da saliva humana não foi investigada, para que a atividade funcional das MMPs dentinárias pudesse ser avaliada isoladamente. Da mesma forma como já foi descrito por alguns estudos (Tjäderhane et al., 1998a; Sulkala et al., 2001; Chaussain-Miller et al., 2006) que consideram que um aumento na atividade gelatinolítica da camada externa da lesão de cárie pode estar relacionada à ação das MMPs salivares, especula-se que durante os episódios erosivos *in vivo*, este fato também possa ocorrer, uma vez que o dente está constantemente banhado por este fluido.

As MMPs geralmente são secretadas na sua forma latente (Birkedal-Hansen, 1993) necessitando de ativação para causarem a degradação da matriz orgânica. Esta ativação irá ocorrer a partir da remoção ou desestabilização do pró-domínio, que leva ao rompimento da ligação cisteína-zinco (Hannas et al., 2007). A ativação pode então ser causada pela ação proteolítica de outras enzimas (Visse; Nagase, 2003), ou ocorrer quimicamente *in vitro* (Nagase, 1997), pela ação de agentes modificadores do tiol (APMA) ou até mesmo pela exposição aos baixos pHs (Tjäderhane et al., 1998a).

Acredita-se que estes agentes químicos, como o APMA, atuem causando um distúrbio no mecanismo *cisteína-switch* (Visse; Nagase, 2003), o que levaria à ativação das MMPs. Por essa razão, no presente estudo, o APMA foi utilizado como controle positivo, visto que é considerado um potencial ativador de MMPs, como já demonstrado em diversos estudos. Os nossos resultados mostram que apesar do APMA ter promovido uma grande ativação da MMP-2 latente, em ambos os substratos avaliados, este agente não resultou na ativação completa desta enzima, uma vez que, embora menos expressiva, a forma latente da MMP-2 ainda foi observada para este grupo controle. Por essa razão, a análise para comparação entre os grupos realizada neste estudo, não considerou o grupo APMA correspondendo a 100% de ativação, como adotado comumente em outros estudos (Tjäderhane et al., 1998a; Sulkala et al., 2001).

Dentre as diversas MMPs encontradas na dentina humana, vários estudos têm identificado a presença das gelatinases MMP-2 e MMP-9 neste substrato sadio, tanto na porção coronária (Martin-De Las Heras et al., 2000; van Strijp et al., 2003; Mazzoni et al., 2007; Boushell et al., 2011; Niu et al., 2011; Vidal, 2012) como na radicular (Santos et al., 2009; Kato et al., 2011) e por essa razão, neste estudo, buscou-se avaliar o papel dessas enzimas na degradação da matriz de colágeno dentinária.

No entanto, para a análise da atividade proteolítica dessas enzimas em tecidos mineralizados é imprescindível a utilização de um protocolo que promova a extração das proteínas do tecido (Kato et al., 2011), uma vez que as MMPs mantêm-se incorporadas à estrutura mineral após a mineralização da matriz dentinária (Martin-De Las Heras et al., 2000).

Existem diversos protocolos descritos na literatura para a extração das proteínas na dentina sadia, os quais muitas vezes, resultam na desmineralização do

tecido (Vidal, 2012). Para este estudo foi selecionado o protocolo de extração das proteínas, em que se utiliza o ácido fosfórico a 1% para a desmineralização da dentina (Breschi et al., 2010a). Este protocolo foi selecionado por ser um protocolo de simples realização laboratorial, comparado aos demais e pelo fato de outros estudos que utilizaram este mesmo protocolo, terem conseguido identificar a presença das gelatinases MMP-2, na sua forma ativa, bem como, a presença da MMP-9, mesmo que em bandas menos evidentes, correspondendo a sua forma ativa (Breschi et al., 2010a) e latente (Breschi et al., 2010b). Estes achados estão de acordo, em parte, com os resultados do presente estudo, no que diz respeito à identificação da forma ativa da MMP-2, mas diferem-se em relação à identificação das formas ativa e latente da MMP-9. Um outro estudo utilizando o mesmo protocolo, também relatou não ter observado atividade gelatinolítica correspondente a MMP-9, mas apenas, a atividade relacionada a MMP-2, sugerindo que este protocolo não foi suficiente para extração da MMP-9 (Vidal, 2012).

No que diz respeito à ativação das MMPs, embora a exposição aos baixos pHs realizada para análise gelatinolítica neste estudo tenha resultado na ativação da MMP-2, não se pode deixar de considerar que o próprio protocolo de extração das proteínas pode ter causado uma ativação destas enzimas, como já descrito por Kupai et al. (2010), mesmo que tenha sido uma ativação parcial. Alguns estudos na literatura identificaram por zimografia a atividade gelatinolítica da MMP-2, nas dentinas coronária e radicular, após a realização do protocolo de extração, sem que algum ativador tenha sido utilizado, o que pode reforçar esta suposição (Santos et al., 2009; Boushell et al., 2011).

Pode-se especular que este fato tenha ocorrido no nosso estudo, uma vez que, para a análise de liberação da HYP a incubação nos respectivos pHs para a verificação da solubilização do colágeno resultou em maior liberação para o pH 7.0, enquanto que os pHs 2.5 e 4.5 não resultaram na liberação deste aminoácido. Isso está de acordo com o que já foi discutido anteriormente, em que a maior degradação da matriz de colágeno dentinária ocorre no retorno ao pH neutro. No entanto, como já mostrado na literatura, essa degradação não irá ocorrer até que se tenha uma desmineralização prévia (Klontz e Cate, 1991). Nesse caso, houve a desmineralização durante o protocolo de extração, o que pode ter ativado as MMPs. Outra hipótese, pode estar relacionada a uma ativação parcial das MMPs, possivelmente causada pelas cisteíno-catepsinas, que são outras proteases

presentes na dentina humana (Tersariol et al., 2010), as quais são ativadas pelo pH baixo e apresentam atividade funcional neste meio (Nascimento et al., 2011). Estas proteases, ativadas em condições ácidas, podem ter causado a ativação das MMPs (Scaffa, 2012), as quais tornaram-se funcionais quando incubadas em pH neutro (7.0) resultando na maior liberação de HYP e, conseqüentemente, maior degradação da matriz de colágeno.

Os resultados do presente estudo correspondem aos achados prévios da literatura, que descrevem a MMP-2 como a principal gelatinase encontrada na dentina, uma vez que a atividade funcional relacionada a esta enzima foi detectada na dentina como forma predominante quando comparada à MMP-9 (Mazzoni et al., 2007; Niu et al., 2011). Além do mais, a MMP-9 embora presente na dentina, já foi descrita como sendo a principal metaloproteinase encontrada na saliva (Ingman et al., 1994; Mäkelä et al., 1994).

De maneira geral, os resultados deste estudo mostram que o mecanismo de ativação da MMP-2 presente na dentina humana coronária e radicular ocorre de forma semelhante ao descrito para as MMPs salivares. Acredita-se que os agentes ácidos responsáveis pela erosão dental, devido ao seu baixo pH são capazes de promover a ativação desta enzima, as quais, após a neutralização do meio pela saliva, mostram sua atividade funcional para a degradação da matriz de colágeno dentinária, exposta previamente durante a desmineralização. A partir disso, outros fatores relacionados a erosão dental, como o tipo de ácido, o tempo de exposição e a presença da saliva devem ser pesquisados, para que mais respostas à respeito da participação destas enzimas endógenas em processos semelhantes aos que acontecem na erosão em dentina sejam devidamente elucidadas, contribuindo para explicar a complexidade das perdas estruturais que ocorrem na dentina.

7 CONCLUSÕES

A partir deste estudo in vitro, pode-se concluir que:

- A atividade funcional da MMP-2 presente na dentina coronária e radicular humana é dependente do pH; Não foi observada atividade gelatinolítica correspondente à MMP-9, para ambos os substratos avaliados
- As soluções que apresentaram os menores pHs (2.5, 4.5 e 5.0) causaram a maior ativação da MMP-2, tanto para a dentina coronária como para a radicular
- A maior solubilização da matriz de colágeno desmineralizada foi observada após incubação nos pHs próximos ao neutro (6.0 e 7.0)
- A maior atividade funcional correspondente a MMP-2 foi observada para a dentina radicular, no entanto, a solubilização do colágeno mostrou-se semelhante para ambos os substratos (dentina coronária e radicular)

REFERÊNCIAS¹

Armstrong WG. Further studies on the action of collagenase on sound and carious human dentin. *J Dent Res*. 1958;37:1001-1015.

Baig AA, Fox JL, Young RA, Wang Z, Hsu J, Higuchi WI, et al. Relationships among carbonated apatite solubility, crystallite size, and microstrain parameters. *Calcif Tissue Int*. 1999 May;64(5):437-49.

Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol*. 1993 May;64(5 Suppl):474-84.

Bornstein P, Sage H. Structurally distinct collagen types. *Annu Rev Biochem*. 1980;49:957-1003.

Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Yamauchi M. Distribution and relative activity of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin. *Int J Oral Sci*. 2011 Oct;3(4):192-9.

Breschi L, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M, Ellis TH, Stangel I. High resolution SEM evaluation of dentin etched with maleic and citric acid. *Dent Mater*. 2002 Jan;18(1):26-35.

Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L, et al. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dent Mater*. 2010b Jun;26(6):571-8

Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L, et al. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dent Mater*. 2010a Apr;26(4):320-5.

Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Mar 7;1477 (1-2):267-83.

Buzalaf MA, Kato MT, Hannas AR. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. *Adv Dent Res*. 2012 Sep;24(2):72-6.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res*. 2006 Jan;85(1):22-32.

Dayan D, Binderman I, Mechanic GL. A preliminary study of activation of collagenase in carious human dentine matrix. *Arch Oral Biol*. 1983;28(2):185-7.

Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Mar;2(3):161-74.

Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc*. 2000 Jul;131(7):887-99.

Featherstone JD, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci*. 2006;20:66-76.

Featherstone JD, Mayer I, Driessens FC, Verbeeck RM, Heijligers HJ. Synthetic apatites containing Na, Mg, and CO₃ and their comparison with tooth enamel mineral. *Calcif Tissue Int*. 1983;35(2):169-71.

Featherstone JD, Shields CP, Khademazad B, Oldershaw MD. Acid reactivity of carbonated apatites with strontium and fluoride substitutions. *J Dent Res*. 1983 Oct;62(10):1049-53.

Ganss C, Hardt M, Lussi A, Cocks AK, Klimek J, Schlueter N. Mechanism of action of tin-containing fluoride solutions as anti-erosive agents in dentine - an in vitro tin-uptake, tissue loss, and scanning electron microscopy study. *Eur J Oral Sci*. 2010 Aug;118(4):376-84.

Ganss C, Klimek J, Brune V, Schürmann A. Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in situ. *Caries Res*. 2004b Nov-Dec;38(6):561-6.

Ganss C, Klimek J, Starck C. Quantitative analysis of the impact of the organic matrix on the fluoride effect on erosion progression in human dentine using longitudinal microradiography. *Arch Oral Biol*. 2004a Nov;49(11):931-5.

Ganss C, Lussi A, Scharmann I, Weigelt T, Hardt M, Klimek J, et al. Comparison of calcium analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosion in dentine. *Caries Res*. 2009;43(6):422-9.

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997 Oct;74(2):111-22.

Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1962 Jun 15;48:1014-22.

Gusman H, Santana RB, Zehnder M. Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. *Eur J Oral Sci.* 2002 Oct;110(5):353-7.

Hannas AR, Kato MT, Magalhães AC, Pereira JC, Tjäderhane L, Buzalaf MA. Toothpastes with MMP inhibitors reduce dentin erosion in vitro [abstract]. *J Dent Res.* 2010; 89 (Spec Iss B).

Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand.* 2007 Feb;65(1):1-13.

Hara AT, Ando M, Cury JA, Serra MC, González-Cabezas C, Zero DT. Influence of the organic matrix on root dentine erosion by citric acid. *Caries Res.* 2005 Mar-Apr;39(2):134-8.

Hara AT, Lussi A, Zero DT. Biological factors. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:88-99.

Ingman T, Sorsa T, Lindy O, Koski H, Konttinen YT. Multiple forms of gelatinases/type IV collagenases in saliva and gingival crevicular fluid of periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 1994 Jan;21(1):26-31.

Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:44-65.

Jamall IS, Finelli VN, Que Hee SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem.* 1981 Mar 15;112(1):70-5.

Kato MT, Hannas AR, Leite AL, Bolanho A, Zarella BL, Santos J, et al. Activity of matrix metalloproteinases in bovine versus human dentine. *Caries Res.* 2011;45(5):429-34.

Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MA. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. *J Dent Res*. 2010a May;89(5):468-72.

Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Calabria MP, Magalhães AC, Pereira JC, et al. Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase. *J Dent Res*. 2012 Dec;91(12):1119-23.

Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Oliveira RC, Pereira JC, Tjäderhane L, et al. Effect of iron on matrix metalloproteinase inhibition and on the prevention of dentine erosion. *Caries Res*. 2010b;44(3):309-16.

Kato MT, Magalhães AC, Rios D, Hannas AR, Attin T, Buzalaf MA. Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. *J Appl Oral Sci*. 2009 Nov-Dec;17(6):560-4.

Katz S, Park KK, Palenik CJ. In-vitro root surface caries studies. *J Oral Med*. 1987 Jan-Mar;42(1):40-8.

Kawasaki K, Featherstone JD. Effects of collagenase on root demineralization. *J Dent Res*. 1997 Jan;76(1):588-95.

Kinney JH, Balooch M, Haupt DL Jr, Marshall SJ, Marshall GW Jr. Mineral distribution and dimensional changes in human dentin during demineralization. *J Dent Res*. 1995 May;74(5):1179-84.

Kleter GA, Damen JJ, Everts V, Niehof J, Ten Cate JM. The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin in vitro. *J Dent Res*. 1994 Sep;73(9):1523-9.

Klont B, ten Cate JM. Susceptibility of the collagenous matrix from bovine incisor roots to proteolysis after in vitro lesion formation. *Caries Res*. 1991;25(1):46-50.

Kupai K, Szucs G, Cseh S, Hajdu I, Csonka C, Csont T, et al. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2010 Mar-Apr;61(2):205-9.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.

Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:2-12.

Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MA. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. *J Dent.* 2009 Dec;37(12):994-8

Mahoney E, Beattie J, Swain M, Kilpatrick N. Preliminary in vitro assessment of erosive potential using the ultra-micro-indentation system. *Caries Res.* 2003 May-Jun;37(3):218-24.

Mäkelä M, Salo T, Uitto VJ, Larjava H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res.* 1994 Aug;73(8):1397-406.

Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent.* 1997 Nov;25(6):441-58.

Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol.* 2000 Sep;45(9):757-65.

Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GA, Papa S, Mazzotti G, et al. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res.* 2007 May;86(5):436-40.

Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials.* 2006 Sep;27(25):4470-6.

Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med.* 2008 Oct;29(5):290-308.

Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999 Jul 30;274(31):21491-4.

Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem.* 1997 Mar-Apr;378(3-4):151-60.

Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldeli S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. *J Dent Res*. 2011 Apr;90(4):506-11.

Niu LN, Zhang L, Jiao K, Li F, Ding YX, Wang DY, et al. Localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. *J Dent*. 2011 Aug;39(8):536-42.

Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Mar;8(3):221-33.

Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci*. 2003 Apr;111(2):117-27.

Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Rönkä H, Sorsa T, Salo T, et al. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF-beta1. *J Dent Res*. 2000 Jan;79(1):77-84.

Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res*. 2004 Mar;83(3):216-21.

Reddy GK, Enwemeka CS. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem*. 1996 Jun;29(3):225-9.

Santos J, Carrilho M, Tervahartiala T, Sorsa T, Breschi L, Mazzoni A, et al. Determination of matrix metalloproteinases in human radicular dentin. *J Endod*. 2009 May;35(5):686-9.

Scaffa PMC. Estudo do perfil proteolítico da matriz dentinária e interface adesiva: comportamento mecânico, bioquímico e efeito da clorexidina [tese]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2012.

Schlueter N, Hardt M, Klimek J, Ganss C. Influence of the digestive enzymes trypsin and pepsin in vitro on the progression of erosion in dentine. *Arch Oral Biol*. 2010 Apr;55(4):294-9.

Schlueter N, Jaeggi T, Lussi A. Is dental erosion really a problem? *Adv Dent Res.* 2012 Sep;24(2):68-71.

Shellis RP, Barbour ME, Jones SB, Addy M. Effects of pH and acid concentration on erosive dissolution of enamel, dentine, and compressed hydroxyapatite. *Eur J Oral Sci.* 2010 Oct;118(5):475-82.

Shellis RP, Featherstone JD, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:163-79.

Shellis RP. A scanning electron-microscopic study of solubility variations in human enamel and dentine. *Arch Oral Biol.* 1996 May;41(5):473-84.

Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques.* 2005 Jan;38(1):73-83.

Sorsa T, Suomalainen K, Uitto VJ. The role of gingival crevicular fluid and salivary interstitial collagenases in human periodontal diseases. *Arch Oral Biol.* 1990;35 Suppl:193S-196S.

Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis.* 2004 Nov;10(6):311-8.

Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:463-516.

Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res.* 2002 Sep;81(9):603-7.

Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, et al. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *J Dent Res.* 2001 Jun;80(6):1545-9.

Ten Cate AR, Arana-Chavez VE, dos Santos CWN, et al. *Histologia Oral desenvolvimento, estrutura e função.* 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Pääkkönen V, Martins MT, et al. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *J Endod*. 2010 Mar;36(3):475-81.

Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Hoshika T, et al. The requirement of zinc and calcium ions for functional MMP activity in demineralized dentin matrices. *Dent Mater*. 2010 Nov;26(11):1059-67.

Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res*. 1998a Aug;77(8):1622-9.

Tjäderhane L, Salo T, Larjava H, Larmas M, Overall CM. A novel organ culture method to study the function of human odontoblasts in vitro: gelatinase expression by odontoblasts is differentially regulated by TGF-beta1. *J Dent Res*. 1998b Jul;77(7):1486-96.

van Strijp AJ, Jansen DC, DeGroot J, ten Cate JM, Everts V. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. *Caries Res*. 2003 Jan-Feb;37(1):58-65.

van Strijp AJ, van Steenberg TJ, ten Cate JM. Bacterial colonization of mineralized and completely demineralized dentine in situ. *Caries Res*. 1997;31(5):349-55.

Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jul;87(14):5578-82.

Vidal CMP. Estudo da atividade proteolítica da dentina humana sadia e cariada [tese]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2012.

Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003 May 2;92(8):827-39.

Wahlgren J, Salo T, Teronen O, Luoto H, Sorsa T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpal and periapical inflammation and periapical root-canal exudates. *Int Endod J*. 2002 Nov;35(11):897-904.

White A. Principles of Biochemistry. 4a ed. New York: McGraw Hill Book Company; 1968.

Xu C, Wang Y. Chemical composition and structure of peritubular and intertubular human dentine revisited. Arch Oral Biol. 2012 Apr;57(4):383-91.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP														
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA														
Título da Pesquisa: Análise da variação do pH na atividade de enzimas (metaloproteinases -2, -8 e -9) que degradam a matriz de colágeno da dentina humana quando expostas à ácidos sem a presença de bactérias														
Pesquisador: Maria Angela Pita Sobral														
Área Temática:														
Versão: 5														
CAAE: 12848613.0.0000.0075														
Instituição Proponente: Universidade de São Paulo														
Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO														
DADOS DO PARECER														
Número do Parecer: 544.544														
Data da Relatoria: 27/02/2014														
Apresentação do Projeto:														
<p>As metaloproteinases parecem ter um papel importante no que diz respeito à degradação da matriz de colágeno da dentina, no entanto, o papel dessas enzimas no processo da erosão dental ainda não está totalmente esclarecido. O objetivo deste estudo será avaliar a correlação da variação do pH de uma solução ácida simples na atividade das metaloproteinases (MMPs) -2, -8 e -9, e avaliar de que forma, diferentes substâncias ácidas causadoras da erosão dental, participam da ativação destas metaloproteinases quando submetidas a uma ciclagem de pH. Este estudo será realizado em duas fases independentes, onde na primeira fase serão obtidas as amostras de dentina em pó, na qual serão expostas à uma solução ácida simples com uma variação de pH de 1,0 a 6,5 para a ativação das MMPs -2, -8 e -9. Após o tratamento das</p>														
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2">Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227</td> <td>CEP: 05.508-900</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Cidade Universitária</td> <td colspan="2">Município: SÃO PAULO</td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td>Telefone: (11)3091-7990</td> <td>Fax: (11)3091-7914</td> </tr> <tr> <td colspan="3">E-mail: cepito@usp.br</td> </tr> </table>			Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227		CEP: 05.508-900	Bairro: Cidade Universitária	Município: SÃO PAULO		UF: SP	Telefone: (11)3091-7990	Fax: (11)3091-7914	E-mail: cepito@usp.br		
Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227		CEP: 05.508-900												
Bairro: Cidade Universitária	Município: SÃO PAULO													
UF: SP	Telefone: (11)3091-7990	Fax: (11)3091-7914												
E-mail: cepito@usp.br														

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Continuação de Parecer: 544.544

amostras de dentina será realizada a extração das MMPs através de um tampão de extração, e em seguida as amostras serão analisadas através da zimografia. Na segunda fase, serão utilizadas 4 fontes ácidas causadoras da erosão dental para a ativação das MMPs: suco de laranja (SL), coca-cola (CC), vinho tinto (VT) e suco gástrico (SG). Inicialmente, será feito a medição do pH dessas substâncias, e em seguida as amostras de dentina serão expostas à uma ciclagem de pH (desmineralização x remineralização), com exposição às substâncias ácidas, seguida pela neutralização pela saliva (pH 7,0). Ao final, será realizada a extração das MMPs e avaliação através da zimografia, como na primeira fase. As imagens obtidas pela zimografia serão analisadas e comparadas através do teste de correlação, com nível de significância de 5%.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar in vitro:

- (1) a variação do pH de uma solução ácida simples na atividade das metaloproteinases -2, -8 e -9; e,
- (2) identificar se as diferentes substâncias ácidas causadoras da erosão dental, participam da ativação destas metaloproteinases quando submetidas a uma ciclagem de pH.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Avaliar in vitro:

- (1) a variação do pH de uma solução ácida simples na atividade das metaloproteinases -2, -8 e -9; e,
- (2) identificar se as diferentes substâncias ácidas causadoras da erosão dental, participam da ativação destas metaloproteinases quando submetidas a uma ciclagem de pH.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todos os pedidos de ajustes foram atendidos.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3091-7900 Fax: (11)3091-7914 E-mail: cepfo@usp.br

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Continuação do Parecer: 544.544

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As discordâncias entre as informações dos documentos foram corrigidas.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais semestrais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais e critério do CEP:

SAO PAULO, 27 de Fevereiro de 2014

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Blazevic
 (Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3091-7980 Fax: (11)3091-7914 E-mail: cepfo@usp.br

ANEXO B – Termo de doação dos dentes

MODELO DE INSTRUMENTO DE DOAÇÃO DE DENTES**Identificação do Doador**

Nome (Legível): _____
Data de Nascimento: _____ Local de Nascimento: _____ UF: _____
RG nº: _____ CPF nº _____
Endereço (Rua ou Av. n.º e complemento): _____
Cidade: _____ UF: _____ CEP: _____
Telefones para contato: _____
E-mail: _____

DECLARAÇÃO

Declaro ter sido esclarecido sobre quais os motivos que levaram a necessidade de remoção do(s) dente(s) _____ – por razões _____ e concordo que os mesmos sejam utilizados na pesquisa intitulada “Influência do pH na atividade funcional de enzimas endógenas (metaloproteinases -2 e -9) que degradam a matriz de colágeno dentinária sem a presença de bactérias”, objetivando avaliar a influência do pH sobre a atividade funcional das metaloproteinases -2 e -9, a ser realizada na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pela aluna Stella da Silva Ferreira, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Maria Angela Pita Sobral.

Fui ainda esclarecido pelo pesquisador que minha identidade não será divulgada por qualquer meio, e que o material recolhido será utilizado unicamente para a presente pesquisa, sendo realizado o descarte dos dentes que não forem utilizados.

São Paulo, ____ de _____ de 20__

Assinatura