UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MARIA CECÍLIA RIBEIRO DE MATTOS

ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE MMP-2, -9 e -8 EM TECIDO HUMANO PULPAR NORMAL E INFLAMADO

BAURU
2009

MARIA CECÍLIA RIBEIRO DE MATTOS

ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE MMP-2, -9 e -8 EM TECIDO HUMANO PULPAR NORMAL E INFLAMADO

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Dentística
Orientador: José Carlos Pereira

BAURU
2009

Mattos, Maria Cecília Ribeiro de

M436a Análise do padrão de expressão de mmp-2, -9 e -8 em tecido humano pulpar normal e inflamado / Maria Cecília Ribeiro de Mattos -- Bauru, 2009.
146 p.; il.; 30 cm.

Tese (Doutorado). – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Pereira

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data: 31/07/2009

Comitê de Ética da FOB – USP
Protocolo n.º: 92/2003
Data: 23/06/2003

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dedicatória

Aos meus pais, **Raul** e **Cidinha**

Amo-os!

Muito Obrigada! Sempre!

Meu Agradecimento Especial

Ao Prof. Dr. José Carlos Pereira

Obrigada por me orientar em mais este trabalho. Tenha sempre a certeza de meu respeito e admiração!

Aos meus pais

Quaisquer palavras de agradecimento, neste momento, seriam insuficientes para demonstrar minha gratidão e amor aos senhores!

Apenas tenham uma certeza: **amo-os**! E é aos senhores que dedico esta minha conquista!

Aos meus irmãos Ana Zilda e Raul Jr.

Obrigada por me apoiarem nessa fase tão importante de nossas vidas! Sem o apoio de vocês, não tenho dúvida, a conclusão deste trabalho não seria viável!

Amo-os!

Aos meus tios e primos

Minha família é uma das coisas que mais prezo em minha vida! A vocês, tios e primos-irmãos, todo meu amor e respeito! Também posso dizer que os amo!

Agradecimentos Institucionais

Ao **Prof. Dr. José Mauro Granjeiro** pela co-orientação desse trabalho.

Às funcionárias da *Pós-Graduação* **Ana Letícia Palombo Momesso, Cleusa Gonçalves Leite (Cleusinha), Graciane Mainini, Hebe Joselina de Freitas Pereira (Hebitcha), Maria Margareth Pereira Mokarzel (Meg)** por todo o apoio e paciência. Vocês não sabem o quanto foram importantes para a conclusão deste curso. Cada uma, à sua maneira, no desempenho de sua respectiva função, contribuiu para minha formação e é com grande carinho que levarei comigo as lembranças de cada uma de vocês.

Aos professores do *Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários, Disciplina de Dentística Restauradora da FOB/USP* **Prof. Dr. Ákira Ishikiriama, Carlos Eduardo Francischone, Eduardo Batista Franco, Linda Wang, José Mondelli, Maria Fidela de Lima Navarro, Maria Teresa Atta, Rafael Francisco Lia Mondelli, Sérgio Kiyoshi Ishikiriama.**

Aos funcionários do *Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários, Disciplina de Dentística* **Ângela Maria Amantini, Benedito Bueno de Moura, Clélia Rita C. Capossi dos Santos, Maria Aparecida Pereira de Souza, Mauro de Souza, Nélson Queiroz, Wilson Fiorillo Júnior, Zuleica Valderes Roberto.** Muito obrigada por sempre atenderem tão prontamente minhas solicitações! Agradeço ainda a amizade e carinho com que sempre me trataram durante todos esses 13 anos de estudos nesta instituição de ensino.

Aos professores do *Departamento Ciências Biológicas, Disciplina de Histologia e Embriologia* **Prof. Dr Gérson Francisco de Assis, Gustavo Pompermaier Garlet e Rumio Taga.**

Aos amigos do *Departamento Ciências Biológicas, Disciplina de Histologia e Embriologia*, **Aldivina Mendes da Silva (Divina), Beonildes Teresinha Ruiz Correia (Tera), Danielle Santi Ceolin (Dani), Patrícia de Sá M. Germino (Pat) e Tânia Mary Cestari.** A execução deste trabalho, afirmo, foi muito mais prazerosa em virtude de cada um de vocês! Obrigada por me fazerem sentir como "parte" deste Departamento! Obrigada pelos conhecimentos agregados!

À **Profª Drª Sílvia Helena de Carvalho Peres**, que me orientou em algumas das pesquisas realizadas no decorrer deste curso de Pós-Graduação, agradeço pelo constante incentivo e carinho a mim concedidos.

Ao **Prof. Dr. José Roberto Lauris**, pelas orientações quanto às análises estatísticas.

Ao *arte-finalista,* funcionário deste instituição de ensino superior **Rubens Kazuo Kato**, por quem tenho tanta consideração e carinho! Agradeço sua disponibilidade e confecção dos desenhos e capa deste trabalho.

Às secretárias da *Diretoria da FOB/USP* **Eloísa Elena Turbiani e Valéria Regina S. Delladona.** Agradeço a paciência, solicitude e tão grande gentileza nos momentos em que precisei da atenção de vocês! Que Deus ilumine sempre seus caminhos!

À *Faculdade de Odontologia de Bauru*, na pessoa do diretor **Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro**, do vice-diretor **Prof. Dr. José Carlos Pereira** e a presidente da Pós-Graduação **Profª. Drª. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado** e vice-presidente **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti.**

À **CAPES**, através do Programa de Demanda Social (DS), pela concessão da bolsa de estudos ao curso de Pós-Graduação *stricto sensu* (Doutorado em Odontologia).

Agradecimentos

A todos vocês que fazem meus dias melhores!

Às queridas amigas, que estiveram ao meu lado durante a confecção deste trabalho, proferindo sempre palavras de incentivo, **Adriana Maria Jorge Dal'acqua, Danielle Santi Ceolin, Fernanda Gomes de Moraes, Luciana de Rezende Pinto, Lucimara de Castro Figueiredo, Maria Catarina Rui Cano Silva (Kate), Marizilda de Castro Figueiredo, Patrícia de Sá M. Germino, Renata Rodrigues de Freitas Blagitz, Tânia Mary Cestari e Ticiane Cestari Fagundes.** A vocês, meu eterno carinho e amizade! Muito Obrigada, de coração!

Aos amigos e queridos companheiros de pesquisa **Álvaro H. Cury, Angélica Reis Hannas, Anuradha Prakki, Leonardo César Costa, Giovana Calicchio Canova, Juliane Avansini, Marcela Pagani Calábria** e **Renato Cilli**.

Aos colegas de turma do Doutorado **Adílson Furuse, Ana Carolina Francischone, Juliana Fellipe, Nádia Svizero, Renato Savi de Carvalho** e **Odirlei Malaspina**.

À **Ana Regina Salgueiro Figueiredo** e **Marta Pereira Luiz**, pelos cuidados, em especial com minha mãe, sem os quais eu certamente não teria a tranqüilidade necessária para a execução deste trabalho. A vocês, meu agradecimento e reconhecimento por cada uma de suas atitudes e pelo carinho que cada uma de vocês sempre demonstrou por mim!

À **Ana Carolina Gonçalves Valença**, minha querida afilhada, por quem tenho grande amor e carinho!

À grande amiga **Mónica Mercedes Hermoza-Novoa**, com quem fiz grande parte deste trabalho. Nossa convivência, durante nossos cursos de Especialização e Mestrado, traz-me saudade! Embora estejamos geograficamente distantes, meu carinho e amizade nos deixam muito perto. Esse trabalho, Monique, é nosso!

À **Meg**, que com cada "disparar pela casa" sempre que eu nela adentro, faz-me perceber o quanto "a felicidade" pode ser algo... "simples assim"!

"Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha; é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso."

Charles Chaplin

Resumo

RESUMO

As metaloproteinases da matriz (MMPs) foram relacionadas a diversas doenças inflamatórias como artrite e também ao câncer. O presente trabalho tem por objetivo estabelecer o papel da MMP-2, MMP-9 e MMP-8 no processo de inflamação pulpar. Foram adotadas as seguintes hipóteses nulas: (1) o padrão de expressão das MMP-2, MMP-9 e MMP-8 não sofre alteração nos diferentes estágios da polpa humana: normal, reversível, transição, irreversível ou necrose; (2) não há diferença de expressão das MMP-2, -9 e MMP-8, considerando-se um mesmo estágio de inflamação tecidual pulpar. Os métodos utilizados foram: (I) Obtenção dos espécimes, que foram divididos em grupos de acordo com critérios adotados de semiologia subjetiva e objetiva. Obtiveram-se os seguintes grupos: GI (Controle) – dentes hígidos (n=7); GII (Pulpite Reversível – n=4); GIII (Pulpite Transição – n=4); GIV (Pulpite Irreversível/Necrose – n=8). Logo após exodontia, os dentes obtidos foram cortados ligeiramente abaixo da junção amelodentinária e fixados em formol a 10% por 48h. Foram lavados em água corrente (24h) para então serem processados histologicamente. Foram obtidas secções de 4□m, aderidas em lâminas silanizadas e submetidas à imunomarcação (Técnica da Peroxidase), utilizando os anticorpos anti MMP-2, MMP-9 e MMP-8 humanos. A presença de imunomarcação foi realizada através da análise semi-quantitativa por escores, sendo que a quantificação de marcação por corte seguiu o seguinte escore: 0= ausente; 1= leve; 2= moderada; 3= intensa. Realizou-se teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis, $p<0,05$. As comparações intergrupos revelaram, para CO: (1)MMP-2 - GI=GII=GIII, GIII=GIV, GI>GIV ($p<0,01$) e GII>GIV ($p<0,05$); (2)MMP-9 – GI=GII=GIV, GII=GIII e GIII>GI ($p<0,01$); (3)MMP-8 – GI=GII=GIII=GIV. Na região central da polpa, obteve-se: (1)MMP-2 – GI=GII=GIII, GIII=GIV, GI>GIV ($p<0,001$) e GII>GIV ($p<0,01$); (2)MMP-9 – GI=GII=GIII, GIII=GIV, GIV>GI ($p<0,001$) e GIV>GII ($p<0,01$); (3)MMP-8 – GI=GII, GIII=GIV, GIII>GI ($p<0,05$), GIV>GI ($p<0,01$), GIII>GII ($p<0,05$) e GIV>GII ($p<0,05$). Quanto às comparações intragrupos, na CO mostraram: (1)GI - MMP-2>MMP9 ($p<0,001$), MMP-2=MMP-8 e MMP-9=MMP-8; (2)GII – MMP-2>MMP-9 ($p<0,01$); MMP-2=MMP-8 e MMP-9=MMP-8; (3)GIII e GIV – MMP-2=MMP-9=MMP-8. Para a região mais central da polpa: (1)GI e GII – MMP-2=MMP-9=MMP-8; (2)GIII – MMP9>MMP-2 ($p<0,05$), MMP-2=MMP-8 e MMP-9=MMP-8; (3)GIV – MMP-9>MMP-2 ($p<0,01$), MMP-2=MMP-8 e MMP-9=MMP-8. Sendo assim, as duas hipóstese nulas foram rejeitadas. Conclui-se ainda que MMP-2, MMP-9 e MMP-8 atuam no processo de inflamação pulpar de maneira distinta na CO e polpa central; MMP-2 é mais expressa em polpa sadia; a maior expressão de MMP-9 relaciona-se à presença de inflamação pulpar; em polpas inflamadas, a expressão de MMP-8 é maior quando comparadas a polpas normal, embora tal enzima seja também levemente expressada em tecido pulpar normal.

Palavras-chave: Polpa. Tecido pulpar. Metaloproteinases da matriz. Gelatinases. Colagenases. Inflamação.

Abstract

ABSTRACT

Analysis of the expression perfile of MMP-2, -9 and -8 in normal and inflamed human pulp tissue

The matrix metalloproteinases (MMPs) have been related to various inflammatory diseases, such as arthritis, as well as to cancer. The aim of the present study was to establish the role of MMP-2, MMP-9 and MMP-8 in the process of dental pulp inflammation. The following null hypotheses were adopted: (1) the pattern of MMP-2, MMP-9 and MMP-8 expression does not undergo alteration in the following different stages of human pulp: normal, reversible, transition, irreversible or necrosis; (2) there is no difference in the expression of MMP-2, -9 and MMP-8, when considering the same stage of pulp tissue inflammation. The methods used were: (I) Obtainment of specimens, which were divided into groups according to the subjective and objective criteria of semiology adopted. The following groups were obtained: GI (Control) – healthy teeth (n=7); GII (Reversible Pulpitis – n=4); GIII (Transition Pulpitis – n=4); GIV (Irreversible Pulpitis/Necrosis – n=8). Soon after extraction the teeth obtained were cut slightly below the amelodentinal junction and fixed in 10% formol for 48h. They were washed under running water (24h) and were histologically processed afterwards. Sections of 4□m were obtained, adhered to silanized slides, and submitted to immunomarking (Peroxidase Technique), using human anti MMP-2, MMP-9 and MMP-8 antibodies. The presence of immunomarking was determined through semi-quantitative analysis by scores, and marking by cut was quantified using the following score: 0= absent; 1= slight; 2= moderate; 3= intense. The Kruskal-Wallis non-parametric statistical test was performed, $p<0.05$. Intergroup comparisons revealed the following: for CO: (1)MMP-2 - GI=GII=GIII, GIII=GIV, GI>GIV ($p<0.01$) and GII>GIV ($p<0.05$); (2)MMP-9 – GI=GII=GIV, GII=GIII and GIII>GI ($p<0,01$); (3)MMP-8 – GI=GII=GIII=GIV. In the central region of the pulp, the following results were obtained: (1)MMP-2 – GI=GII=GIII, GIII=GIV, GI>GIV ($p<0.001$) and GII>GIV ($p<0.01$); (2)MMP-9 – GI=GII=GIII, GIII=GIV, GIV>GI ($p<0.001$) and GIV>GII ($p<0.01$); (3)MMP-8 – GI=GII, GIII=GIV, GIII>GI ($p<0.05$), GIV>GI ($p<0.01$), GIII>GII ($p<0.05$) and GIV>GII ($p<0.05$). With regard to intragroup comparisons, in CO the following were shown: (1)GI - MMP-2>MMP9 ($p<0.001$), MMP-2=MMP-8 and MMP-9=MMP-8; (2)GII – MMP-2>MMP-9 ($p<0.01$); MMP-2=MMP-8 and MMP-9=MMP-8; (3)GIII and GIV – MMP-2=MMP-9=MMP-8. For the most central region of the pulp: (1)GI and GII – MMP-2=MMP-9=MMP-8; (2)GIII – MMP9>MMP-2 ($p<0.05$), MMP-2=MMP-8 and MMP-9=MMP-8; (3)GIV – MMP-9>MMP-2 ($p<0.01$), MMP-2=MMP-8 and MMP-9=MMP-8. Therefore, the two null hypotheses were rejected. Moreover, it was concluded that MMP-2, MMP-9 and MMP-8 act in the process of pulp inflammation in a distinct manner in CO and central pulp; more MMP-2 is expressed in healthy pulp; the highest expression of MMP-9 is related to the presence of pulp inflammation; in inflamed pulp, the expression of MMP-8 is higher when compared with that of normal pulp, although this enzyme is also slightly expressed in normal pulp tissue.

Key Words: Pulp. Pulp tissue. Matrix metalloproteinases. Gelatinases. Collagenases. Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 - Ilustração esquemática indicando a estrutura das MMPs de acordo com a sua classificação..... 51

Figura 2 - Representação esquemática da estrutura das Colagenases..... 58

Figura 3 - Representação esquemática da estrutura das Gelatinases..... 60

Figura 4 - Coleta e processamento dos dentes..... 72

Figura 5 - Representação do método indireto..... 76

Figura 6 - Grupo Controle – Região da camada odontoblástica: (A) coloração em HE; (B) imunomarcação para MMP-2; (C) imunomarcação para MMP-9; (D) imunomarcação para MMP-8..... 85

Figura 7 - Grupo Controle – Região da polpa coronária: (A) coloração em HE; (B) imunomarcação para MMP-2; (C) imunomarcação para MMP-9; (D) imunomarcação para MMP-8..... 87

Figura 8 - Grupo Reversível – Região da camada odontoblástica: (A) coloração em HE; (B) imunomarcação para MMP-2; (C) coloração em HE; (D) imunomarcação para MMP-2; (E) imunomarcação para MMP-9; (F) imunomarcação para MMP-8..... 89

Figura 9 - Grupo Reversível – Região da polpa coronária: (A) Coloração em HE; (B) imunomarcação para MMP-2; (C) imunomarcação para MMP-9; (D) imunomarcação para MMP-8..... 91

Figura 10 - Grupo Transição – Região da camada odontoblástica: (A) Coloração em HE; (B) imunomarcação para MMP-2; (C) imunomarcação para MMP-9; (D) imunomarcação para MMP-8..... 93

Figura 11 - Grupo Transição – Região da polpa coronária: (A) Coloração em HE; (B) imunomarcação para MMP-2; (C) imunomarcação para MMP-9; (D) imunomarcação para MMP-8..... 95

Figura 12 - Grupo Irreversível/Necrose – Região com exposição pulpar: (A) Coloração em HE; (B) imunomarcação para MMP-2; (C) imunomarcação para MMP-9; (D) imunomarcação para MMP-8..... 97

Figura 13 - Grupo Irreversível/Necrose – Região da polpa coronária, próxima à polpa radicular: (A) Coloração em HE; (B) imunomarcação para MMP-2; (C) imunomarcação para MMP-9; (D) imunomarcação para MMP-8..... 99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das MMPs e seu principal substrato de atuação..... 53

Tabela 2 - Total de espécimes distribuídos nos diferentes grupos, de acordo com o diagnóstico clínico..... 81

Tabela 3 - Apresentação dos escores, distribuídos em grupos, para a MMP-2, MMP-9 e MMP-8..... 103

Tabela 4 - Comparação intergrupos – comparação entre os grupos dos resultados obtidos para MMP-2, MMP-9 e MMP-8 para as diferentes áreas analisadas (Camada Odontoblástica e Polpa), sendo p<0,05 (Kruskall Wallis)..... 104

Tabela 5 - Comparação intragrupos - comparação dos resultados obtidos para MMP-2, MMMP-9 e MMP-8 para um mesmo grupo nas diferentes áreas analisadas (Camada Odontoblástica e Polpa), sendo p<0,05 (Kruskall Wallis)..... 104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CO	Camada Odontoblástica
kDa	Kilo Dalton
IHC	Imunohistoquímica
MEC	Matriz extra celular
μm	Micrometros
MMP	Metaloproteinase da matriz
min	minutos
pH	Potencial hidrogênico
PMN	polimorfonuclear
TGF	Fator transformador de crescimento
TIMP	Inibidor tissular das metaloproteinases

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 35

2 REVISÃO DE LITERATURA 41
2.1 COMPLEXO DENTINOPULPAR 43
2.1.1 Dentina 44
2.1.2 Polpa dentária 45
2.2 O TECIDO PULPAR E A INFLAMAÇÃO 47
2.3 METALOPROTEINASES (MMPS) 49
2.3.1 Considerações Gerais 49
2.3.2 Nomenclatura 51
2.3.3 Estrutura das MMPs 54
2.3.4 MMPs no meio bucal 55
2.3.5 MMPs na polpa 56
2.3.5.1 Colagenases 58
2.3.5.2 Gelatinases 59

3 PROPOSIÇÃO 63

4 MATERIAL E MÉTODOS 67
4.1 AQUISIÇÃO DOS DENTES 69
4.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA 69
4.3 CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA 70
4.4 COLETA, ARMAZENAMENTO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS DENTES 71
4.5 TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA (IHC) 74
4.6 ANÁLISE POR ESCORE 77
4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS 78

5 RESULTADOS 79
5.1 EXAME CLÍNICO E COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS 81
5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS CORTES TECIDUAIS CORADOS PELA HE E DOS SUBMETIDOS À IMUNOMARCAÇÃO 81
5.3 ESCORES OBTIDOS PARA CADA IMUNOMARCAÇÃO 101

6 DISCUSSÃO 107
6.1 METODOLOGIA 109
6.1.1 Obtenção dos espécimes 109
6.1.2 Considerações sobre a técnica de imunomarcação 109
6.2 RESULTADOS 111
6.2.1 Expressão de MMP-2 111
6.2.2 Expressão de MMP-9 112
6.2.3 Expressão de MMP-8 115
6.2.4 Expressão diferencial da MMP-2, MMP-9 e MMP-9 nos diferentes estágios de inflamação da polpa 117
6.2.5 Correlação entre o diagnóstico histológico e a expressão de MMP-2, MMP-9 e MMP-8 119

7 CONCLUSÕES 121

REFERÊNCIAS 125

ANEXOS 135

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A dor dentária de origem pulpar, decorrente da reação inflamatória deste tecido conjuntivo frouxo com características próprias, é algo relatado com freqüência pelos pacientes tratados na clínica odontológica. O mais novo conceito do que constitui a dor, proposto pelo Subcomittee on Taxomony of the International Association for the Study of Pain, define-a como "... uma experiência desagradável, sensorial e emocional, associada com um dano real ou potencial do tecido", ficando evidente, portanto, a necessidade de seu tratamento.

Por ser assim, a compreensão dos fatores envolvidos na instalação e progressão do processo de inflamação pulpar, que causa danos reais ao referido tecido é tão necessária quanto à elucidação da terapia mais efetiva para o tratamento de cada um dos estágios da reação inflamatória que pode acometer a polpa dental.

A polpa dental, como já mencionado, é um tecido conjuntivo frouxo com características próprias e está circunscrita e protegida pela dentina. Na sua região periférica, existem os odontoblastos, seguidos de uma zona praticamente acelular (basal ou acelular de WEIL), e da zona rica em células. Sua região central evidencia vasos sangüíneos em abundância, fibras nervosas e células distribuídas na Matriz Extracelular (MEC), de natureza fibrilar e fundamental. Esta porção fibrilar aumenta com a idade (fisiologicamente) ou como resultado de influências externas, até formarem-se feixes de grande volume (BHASKAR, 1989; HARGREAVES, GOODIS, 2002; SELTZER, BENDER, 1963; TEN CATE, 2001)

Nota-se que, em condições de normalidade, a polpa apresenta uma elevada capacidade de defesa e reparo e, frente a uma agressão, como o estabelecimento e progressão da cárie na superfície dentinária, este mecanismo de defesa pulpar pode ser evidenciado através de três formas principais, que podem ocorrer isoladamente ou em conjunto: (1) a formação de esclerose dentinária; (2) formação de dentina reacional ou reparadora na superfície interna da câmara pulpar; (3) indução de um processo inflamatório (CONSOLARO, 1996; TZIAFAS, SMITH, LESOT, 2000), sendo que este último pode levar tanto ao reparo quanto à necrose da polpa dentária.

A inflamação pode ser um fator causador de dor pulpar, porém, na realidade, tem a finalidade de expulsar o agente agressor e levar o tecido à cura. No entanto, quando não controlada, como relatado, pode determinar, ao invés do reparo e cura, a morte tecidual. É considerável destacar que na polpa tais reações tomam as características próprias desse tecido conjuntivo, visto que o mesmo encontra-se aprisionado por um tecido duro e inelástico: a dentina. Dessa forma, a resposta tecidual frente ao agente agressor varia com a intensidade e a freqüência do estímulo agressor, correlacionando-se sempre às condições anátomo-clínicas do dente envolvido (SELTZER, BENDER, 1979).

É em virtude da função protetora, manifestada através da dor, que o indivíduo é capaz de perceber alterações que comprometem a fisiologia de seu organismo, mediada por estímulos físicos e químicos. O feixe vásculo-nervoso, que penetram as foraminas apicais, é o responsável pela mediação das sensações dolorosas (BYERS, NÄRHI, 1999). No caso do dente, a dor é uma característica peculiar das alterações pulpares e sua sensação e intensidade variam conforme o estado de comprometimento pulpar e a natureza do agente agressor. Entretanto, as manifestações da doença nem sempre mostram uma correspondência entre o comportamento clínico da condição pulpar e o seu aspecto histológico (ARAUJO, 1981; BAUME, 1970; GARFUNKEL, SELA, ULMANSKI, 1973; HEBERT, 1946; SELTZER, BENDER, ZIONTS, 1963; SELTZER, BENDER, 1963)

Ao relacionar a dor com uma alteração pulpar, pode-se dizer que, embora seja ela a única “linguagem” que a polpa dentária apresenta para manifestar alterações biológicas, a dor pouco informa sobre a real existência ou extensão do processo patológico. Algumas características clínicas da dor corroboram com a definição do diagnóstico, como a sua localização, a duração, a freqüência, forma de manifestação e a intensidade (ESTRELA, 2004). Assim também o aparecimento da dor, provocada ou espontânea, pode sugerir o grau de comprometimento pulpar. No entanto, é importante que se diferencie a dor de origem dentinária daquela de origem pulpar.

Atualmente, a melhor compreensão de eventos relacionados à biologia molecular tem contribuído para o maior entendimento de processos fisiológicos e patológicos que ocorrem no organismo humano. As inúmeras pesquisas nesta área

têm possibilitado novos conceitos, primordiais à maior percepção dos distintos fenômenos biológicos e patológicos que acometem também a cavidade bucal.

Vários estudos nesse nível têm demonstrado que muito do que ocorre no organismo humano é comandado por eventos moleculares, presentes nos diferentes tecidos, e que são ativados na presença de determinados fatores locais. Exemplo recente da interpretação de eventos clássicos da cavidade bucal à luz da biologia molecular é o desenvolvimento das lesões de cárie. Classicamente, o processo de cárie dental envolve a dissolução de minerais orgânicos, principalmente a hidroxiapatita, pelos ácidos produzidos por bactérias (VAN HOUTE et al., 1996). A desmineralização ocorre quando o pH da placa dental cai abaixo de 5,5, dentro de minutos após a ingestão de açúcar, até ser neutralizado pela ação tampão da saliva. Em seqüência à desmineralização, a degradação do colágeno exposto é tida como resultado da ação de proteases bacterianas. Embora algumas bactérias, de fato, produzam enzimas proteolíticas, não há, até o momento, evidências de que as bactérias, associadas à iniciação e progressão da cárie, produzam enzimas capazes de degradar a matriz orgânica dentinária composta, principalmente, de colágeno do tipo I (LINDE, GOLDBERG, 1993). Experimentos *in vitro* têm demonstrado que as bactérias cariogênicas são capazes, apenas, de desmineralizar a superfície da dentina (KATZ et al., 1987; VAN STRIJP et al., 1997). Por outro lado, foi demonstrado que *o S. mutans* apresentou atividade colagenolítica (JACKSON et al., 1997), por ter sido capaz de degradar um peptídeo sintético de estrutura semelhante à do colágeno. No entanto, a degradação das fibrilas colágenas, estruturadas em tripla hélice, é bem mais complexa que a degradação de peptídeos sintéticos. Dois estudos mostraram ser necessária a adição de colagenases externas para que houvesse a degradação da matriz de dentina cariada, em experimentos *in vitro* (KATZ et al., 1987; KAWASAKI, FEATHERSTONE, 1997). Sabe-se, por outro lado, que**,** em humanos, várias metaloproteinases **(MMPs)** da MEC estão presentes na saliva (INGMAN T, 1994a), na placa dental (SORSA et al., 1995), no esmalte (CATERINA et al., 2002) e na dentina (HANNAS, 2007; MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; SULKALA et al., 2002). As **MMPs,** assim denominadas em função da dependência de íons metálicos para sua atividade catalítica (STOCKER et al., 1995), formam uma família de enzimas dentro da classe das endopeptidases que, em concerto, são capazes de degradar quase todas as proteínas da MEC, incluindo o

colágeno em sua forma natural ou desnaturado (BIRKEDAL-HANSEN, 1995). Elas são reguladas por controles transcricionais positivos e negativos, por ativação de seus estados latentes e pela influência de inibidores tissulares endógenos - **TIMPs** (HANNAS, 2007; KREIS, VALE, 1999).

A ativação de certas MMPs, tais como a MMP-2, MMP-9 e a MMP-8, está relacionada à degradação do colágeno em lesões de cárie. Esse mesmo fenômeno pode também estar associado à progressão do processo de inflamação pulpar, fato este que possibilita uma nova perspectiva para maior compreensão do processo inflamatório pulpar. A literatura atual oferece ainda informações sobre a participação dessas enzimas em diversos eventos patológicos algumas condições inflamatórias envolvendo injúria tecidual, tais como em doenças no pulmão, pele e nos olhos, assim como doenças do sistema esquelético e mesmo câncer (HANNAS, 2007; NYBERG et al., 2006; OWEN, CAMPBELL, 1999).

Somando-se á necessidade de um entendimento mais apurado dos fenômenos moleculares que possam estar envolvidos durante o processo de inflamação e degradação do tecido pulpar, a análise da literatura mostra que ainda existe uma substancial dificuldade em se compreender, clinicamente, as alterações histopatológicas do tecido pulpar. Por essa razão, justificam-se investigações com o objetivo de trazer mais informações sobre esse tema.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COMPLEXO DENTINOPULPAR

Dentina e polpa, presentes em toda a extensão do dente, formam o que se denomina complexo dentinopulpar, já que ambas atuam em conjunto, podendo ser consideradas, portanto, como uma entidade funcional única[78]. Tiveram o mesmo processo de formação embrionária e também pelo fato de encontrarem-se ligadas, dentina e polpa compartilham todos os fenômenos fisiológicos que ocorrem em função do amadurecimento do órgão dental (LUNDY, STANLEY, 1969; MUNFORD, BJÖRN, 1962). Por ser assim, é correto imaginar que quaisquer eventos patológicos que acometam uma, terá conseqüências para a outra.

O íntimo relacionamento entre a dentina e a polpa pode ser evidenciado desde o processo de desenvolvimento do órgão dentário, onde os odontoblastos da polpa são responsáveis desde a formação até a organização e maturação de fibras colágenas e proteoglicanas para a constituição de dentina. Simultaneamente, nesse período, o início da dentinogênese determina a diferenciação da papila dentária em polpa e, à medida que o processo de formação e maturação do órgão dentário evolui, a interação entre ambas torna-se ainda mais clara. Durante a deposição da matriz, responsável pela formação da dentina, os odontoblastos deixam nela aprisionados seus prolongamentos, formando verdadeiras vias de comunicação direta entre dentina e polpa através dos denominados túbulos dentinários. É através delas que se dá a formação e nutrição da dentina como também a percepção de estímulos externos através das terminações nervosas da polpa que foram aprisionadas na dentina no decorrer de sua formação. Enquanto a vitalidade pulpar for mantida, a interação entre dentina e polpa é inquestionável (HERMOZA-NOVOA, 2005; MUNFORD, BJÖRN, 1962).

2.1.1 Dentina

A dentina, um tecido conjuntivo diferenciado, secretado pela polpa, constitui-se, em peso, por aproximadamente 65% matéria inorgânica, sendo praticamente toda ela na forma de hidroxiapatita, 20% de matéria orgânica, composta basicamente por colágeno, 2% de proteoglicanas, glicosaminoglicanas, glicoproteínas e lipídios e 13% de água. Tal relação, em volume, modifica-se para 45% de matéria inorgânica, 33% de conteúdo orgânico e 22% de água (LUNDY, STANLEY, 1969; MORAES, AL.; 1990; MUNFORD, BJÖRN, 1962).

As células odontoblásticas, presentes na polpa e responsáveis pela produção de dentina, no decorrer do processo de formação da dentina, deixam seus prolongamentos nela aprisionados, formando vias de comunicação direta entre dentina e polpa e permitindo, dessa maneira, uma interação entre esses dois tecidos. Os canais onde se encontram tais prolongamentos são os também denominados túbulos dentinários que, em teoria, independente de conter ou não um prolongamento citoplasmático de um odontoblasto, representa uma célula odontoblástica (MUNFORD, 1964).

GARBEROGLIO e BRANNSTRÖN, 1976, demonstraram que os túbulos dentinários estão dispostos radialmente, sendo que seu maior diâmetro encontra-se voltado à câmara pulpar e, por ser assim à medida que se aproxima da polpa, maior a densidade de túbulos dentinários por área delimitada, maior o diâmetro dos túbulos e maior a permeabilidade dentinária. Esta última, por sua vez, pode variar de acordo com a idade do dente, o grau de mineralização dos túbulos, com as modificações teciduais que podem ocorrer na dentina com o passar dos anos, com a localização na própria dentina, de acordo com a razão entre os túbulos e a dentina intertubular e a presença de qualquer substância capaz de alterar a condutividade de fluidos através dos túbulos (COOLEY, COLONEL, ROBINSON, 1980; LUNDY, STANLEY, 1969).

Apesar do seu alto grau de mineralização, a dentina é rica em matriz orgânica composta de fibras colágenas envolvidas por substância amorfa (AUSBURGER, PETERS, 1981; HERMOZA-NOVOA, 2005) e tal característica estrutural caracterizam-na como um substrato rico em fibras colágenas, circunjacente à junção

amelodentinária, ou farto em matéria inorgânica, à medida que se aproxima da polpa (MUNFORD, BJÖRN, 1962).

A dentina ainda apresenta como componentes os fatores de crescimento na matriz dentinária, sendo que sua liberação no decorrer de procedimentos clínicos ou mesmo como resultado da progressão de lesões cariosas pode atuar como moléculas de sinalização no processo de reparo (RICKPFF, 1988). A identificação dessas moléculas destaca, mais uma vez, a relação íntima entre o comportamento celular da polpa e a matriz dentinária (LUNDY, STANLEY, 1969). É possível que esses fatores sejam responsáveis por mediar as respostas pulpares a injúrias, preparos cavitários ou procedimentos restauradores (HERMOZA-NOVOA, 2005; MUNFORD, BJÖRN, 1962).

2.1.2 Polpa dentária

A polpa é um tecido mole de origem mesenquimal que contém células especializadas, os odontoblastos, dispostos perifericamente e em contato direto com a matriz dentinária, motivo pelo qual dentina e polpa devam ser consideradas uma entidade funcional, o complexo dentinopulpar (HYMAN, COHEN, 1984). Constituída de 75% de água e 25% de matéria orgânica, à sua região periférica, após camada de odontoblastos, segue-se uma zona praticamente acelular (basal ou acelular de WEIL) e a zona rica em células. Sua região central é rica em vasos sanguíneos e fibras nervosas de função sensorial (fibras mielínicas) e mecânica (fibras amielínicas) (AUSBURGER, PETERS, 1981; HARGREAVES, GOODIS, 2002, HERMOZA-NOVOA, 2005; PEREIRA, et al., 2004).

A camada odontoblástica, a mais externa camada pulpar, é constituída pelos corpos celulares dos odontoblastos, os quais se encontram localizados imediatamente subjacentes à pré-dentina. Esse grupo celular apresenta como principal função a produção de dentina e é unido por junções estáveis denominadas desmossomos (HERMOZA-NOVOA, 2005), que limitam a permeabilidade da camada odontoblástica através da restrição da passagem de moléculas, íons e fluidos para a polpa. Logo abaixo desta camada, dispõe-se a

zona acelular de Weil, rica em capilares sanguíneos, fibras nervosas amielínicas (mecâncas) e processos citoplasmáticos de fibroblastos (MUNFORD, BJÖRN, 1962). Já a zona celular, localizada imediatamente após a zona acelular, esta é densamente povoada por fibroblastos, células mesenquimais indiferenciadas, macrófagos e linfócitos.

A morte de odontoblastos,seja ela fisiológica ou patológica, leva ao aumento de mitoses na zona celular e à migração destas células para a camada odontoblástica, sendo este, provavelmente, o primeiro passo para a recomposição da camada odontoblástica após injúria pulpar. A capacidade das células ectomesenquimais diferenciarem-se em odontoblastos e, conseqüentemente, reativarem a condição reparadora da polpa em uma região afetada possibilita, portanto, a constante remodelação da camada odontoblástica (HERMOZA-NOVOA, 2005).

Ainda em relação à estrutura do tecido pulpar, observa-se ainda uma massa central constituída por vasos sangüíneos e nervos, entremeados por tecido conjuntivo rico em fibroblastos e células ectomesenquimais indiferenciadas.

São as fibras sensoriais presentes no tecido pulpar adentram este tecido através forame apical ou canais acessórios e seguem, principalmente, o trajeto dos vasos sangüíneos (LUNDY, STANLEY, 1969), sendo elas as responsáveis pela transmissão de estímulos de dor. Dentre as fibras sensoriais (mielínicas) da polpa, foram identificadas as fibras mielínicas A-δ e fibras C amielínicas (LUNDY, STANLEY, 1969; MOODY, BROWNE, ROBINSON, 1989). As fibras A-δ estão próximas à junção dentinopulpar, apresentando limiar de estimulação relativamente baixo, o que lhes permite captar dores lancinantes. Já as fibras nociceptivas C, encontram-se distribuídas por todo o tecido pulpar e apresentam limiar para estimulação relativamente alto, captando estímulos de dor relacionados a danos teciduais. Essas fibras captam sensações de queimação e dor menos suportável que aquelas captadas pelas fibras A-δ. Essa rede de fibras se ramifica em terminações nervosas na região odontoblástica, subodontoblástica e nos espaços periodontoblásticos dos túbulos dentinários (BAUME, 1970; HERMOZA-NOVOA, 2005).

Quando saudável, a polpa apresenta uma elevada capacidade de defesa, cicatrização e reparo e, em virtude de suas terminações sensoriais, os estímulos aplicados sobre o complexo dentinopulpar, independente de sua natureza ou intensidade, são traduzidos como dor[76], o que permite ao organismo desencadear mecanismos para o restabelecimento da .hemostasia tecidual.

2.2 O TECIDO PULPAR E A INFLAMAÇÃO

É amplamente aceito que o complexo dentinopulpar responde ao estímulo cariogênico, exibindo uma variedade de reações interrelacionadas de defesa tais como a formação de dentina reparadora e a inflamação pulpar (KAMAL, et al., 1997).

Define-se inflamação (do Latim, *inflammatione*) como uma resposta do organismo a uma agressão sofrida, ou seja, a qualquer processo capaz de causar lesão celular ou tecidual. À agressão tecidual, seguem-se fenômenos vasculares mediados principalmente pela histamina, tendo como consequência um aumento localizado e imediato da irrigação sangüínea, que se traduz em um halo avermelhado em torno da lesão (hiperemia ou rubor). Inicia-se, seguidamente, a produção local de mediadores inflamatórios que promovem um aumento da permeabilidade capilar e também quimiotaxia, processo químico através do qual células polimorfonucleares (neutrófilos e macrófagos) são atraídos para as proximidades da lesão, célusas estas que, por sua vez, realizam a fagocitose dos elementos que estão na origem da inflamação e produzem outros mediadores químicos, dentre os quais estão as citocinas (como o fator de necrose tumoral, fator de transformação de crescimento, interleucinas), quimiocinas, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos. Todos estes fatores, atuando em concomitância, levam aos eventos celulares e vasculares da inflamação e resultam, dessa maneira, no aumento do calibre de capilares responsáveis pela irrigação sanguínea local, produzindo mais hiperemia e aumento da temperatura local (calor). O edema ocorre a partir do aumento da permeabilidade vascular aos componentes do sangue, o que leva ao extravassamento do líquido intravascular para o espaço intersticial extra-

celular e a dor, outro sintoma característico da inflamação, é causada primariamente pela estimulação das terminações nervosas por algumas destas substâncias liberadas durante o processo inflamatório, por hiperalgesia (aumento da sensibilidade dolorosa) promovida pelas prostaglandinas e também, em parte, por compressão relacionada ao edema.

Com relação à inflamação pulpar, no momento em que se instala um processo de cárie dental, por exemplo, enquanto há a invasão dentinária pelo processo carioso, algumas modificações ocorrem na polpa como resposta a difusão dos irritantes e estímulos inflamatórios na polpa, já que, nesse mesmo instante, no intuito de defender o complexo dentinopulpar, uma reação de inflamação se origina no tecido pulpar. Dentre as substâncias envolvidas neste processo, incluem-se as toxinas e enzimas bacterianas, antígenos, quimiotoxinas, ácidos orgânicos e produtos da destruição tecidual e logo no início dele, uma evidência morfológica precoce da reação pulpar à instalação da cárie é redução global no número e tamanho dos corpos celulares dos odontoblastos antes mesmo que se observe processo inflamatório na polpa (TROWBRIDGE, 1981; COHEN, BURNS, 1998).

Sendo a inflamação pulpar causada por microorganismos e seus produtos, fica claro que as reações imunológicas são importantes nesta etapa. Entretanto, a sequência desta resposta imunológica bem como o conhecimento minucioso a respeito das moléculas envolvidas nesse evento ainda é um caminho a ser pouco mais esclarecido pela ciência.

Durante a reação inflamatória pulpar, os anticorpos produzidos por células B ativadas são capazes de neutralizar toxinas bacterianas e prevenir a aderência bacteriana. O resultado final de todo esse processo imunológico instalado na polpa devido a um processo de cárie é uma exagerada resposta inflamatória (inflamação imune) com a finalidade de eliminar a infecção. Porém, se a fonte de infecção (a cárie) não for eliminada, todo esse processo inicialmente deflagrado para a defesa do organismo levará à destruição irreversível do tecido pulpar (HABN, LIEWEBR, 2007).

Relatando ainda eventos de natureza molecular que ocorrem na polpa durante a inflamação, a interleucina 8 (IL-8), um potente quimiotático e ativador de neutrófilos, comprovadamente associada a doenças infecciosas e inflamatórias, esta

também encontra-se em altas concentrações em tecido pulpar diagnosticado com pulpite irreversível. Já na polpa normal, a quantidade dessa citocina mostra-se irrelevante (HUANG et al., 1999). Da mesma forma, RAUSCHENBERGER, BAYLEY e COOTAUCO, 1997, já mencionavam, baseados em dados obtidos em pesquisas, que a interleucina 2 (IL-2), um potente imunoestimulante, pode ser um bom marcador da atividade da patologia inflamatória pulpar nos casos de pulpite irreversível, ratificando que o deflagrar da inflamação envolve uma série de modificações moleculares na polpa, modificações estas ainda não muito bem entendidas e esclarecidas e, cuja melhor compreensão, pode ser essencial ao desenvolvimento de terapias mais eficazes e conservativas para o tratamento da inflamação da polpa.

Se compreendermos, portanto, o fato de que o processo de inflamação pelo qual passa o tecido pulpar envolve uma reação antígeno/anticorpo, assim como em qualquer processo inflamatório instalado nos diferentes tecidos do organismo, fica fácil compreender que as MMPs, já comprovadamente presentes na dentina e saliva, podem ter alguma participação no processo de degradação tecidual da polpa. As citotoxinas (como as interleucinas), que são proteínas intercelulares reguladoras que medeiam várias funções imunológicas e não imunológicas, muitas delas já foram associadas à inflamação pulpar (RAUSCHENBERGER, BAILEY, COOTAUCO, 1997; HUANG et al., 1999).

A maior percepção da atuação dessas enzimas endógenas talvez possa ser valiosa para o estabelecimento de terapias pulpares cada vez mais conservativas, que visam à manutenção da vitalidade pulpar.

2.3 METALOPROTEINASES (MMPS)

2.3.1 Considerações Gerais

As metaloproteinases (MMPs), coletivamente referidas como matrixinas, formam uma importante família de endopeptidases metal-dependentes,

representando a maior classe de enzimas responsáveis pela degradação dos componentes da ECM (SOUZA, LINE, 2002). São sintetizadas e secretadas como pro-enzimas transmembrana, que são processadas para uma forma ativa pela remoção de um peptídeo amino-terminal. Atualmente, destacou-se sua importância também para a diferenciação celular, como a MMP-13, fortemente associada à diferenciação de condrócitos e osteoblastos bem como à formação de matriz extracelular mineralizada (SURI et al., 2008).

A primeira MMP a ser relatada foi a colagenase, cuja atividade foi descrita por Jerome Gross e Charles M. Lampiere, em 1962, em estudo da cauda de um girino sob metamorfose (VISSE, NAGASE, 2003). Até o momento, em vertebrados, identificaram-se 24 diferentes MMPs, das quais 23 já foram estabelecidas na espécie humana (VISSE, NAGASE, 2003). Compreende-se que o adequado colapso dos componentes da ECM é essencial ao desenvolvimento embrionário, morfogênese, reprodução e à reabsorção e remodelação tecidual (NAGASE, WOESSBER, 1999). Por ser assim, em situações de saúde, as MMPs, juntamente com outras proteinases extracelulares, estão envolvidas em diversos eventos fisiológicos, como remodelamento tecidual, coagulação e quebra do fibrinogênio, remodelação e reparação tecidual, reações imunológicas do hospedeiro, regulação de respostas inflamatórias, reprodução, fertilização e desenvolvimento. Já em situações patológicas, as matrixinas foram associadas a diversas condições inflamatórias envolvendo injúria tecidual, tais como em doenças no pulmão, atrite, doenças do sistema esquelético, condições patológicas bucais, como a pulpite, e câncer (TSAI et al., 2005; PALOSSARI et al., 2003; POLETTE et al., 2004).

Muitos dos estudos atuais sugerem que cada MMP possui seu substrato particular, conceito este que levou ao estabelecimento de uma nomenclatura baseada no substrato de ação para tais enzimas. Por ser assim, as colagenases degradam o colágeno fibrilar intacto; as gelatinases, o colágeno desnaturado (gelatina), e metaloelastase ataca a elastina. Atualmente, porém, reconhece-se que as MMPs usualmente degradam múltiplos substratos (HANNAS et al., 2007)

2.3.2 Nomenclatura

Até o momento, 24 MMPs distintas foram identificadas em vertebrados, sendo 23 delas encontradas na espécie humana. Baseado na especificidade de substrato, similaridade de sequência e organização do domínio, as MMPs podem ser divididas em 6 grupos: **colagenases**, **gelatinases (colagenases tipo IV)**, **estromelisinas**, **matrilisinas**, **MMP tipo membrana** e outras (SOUZA, LINE, 2002; VISSE, NAGASE, 2003) (Figura 1).

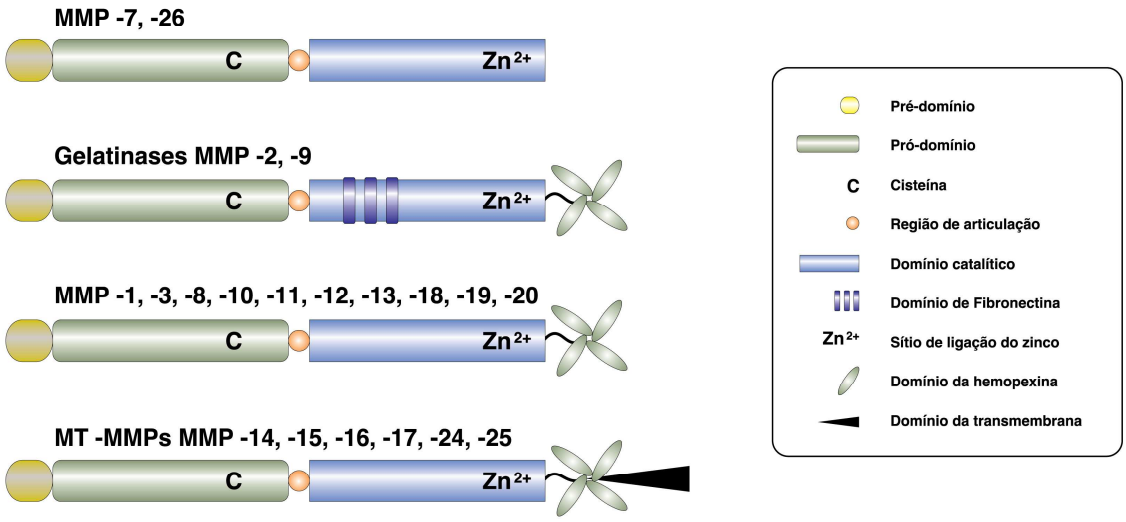


Figura 1 - Ilustração esquemática indicando a estrutura das MMPs de acordo com a sua classificação. Todas as MMPs são compostas por um pré-domínio, um pró-domínio contendo cisteína, uma região de articulação (hinge), um domínio catalítico com sítio de ligação ao zinco. Todas, exceto as matrilisinas (MMP-7, -26) contêm o domínio transmembrana, e as gelatinases MMP-2 e -9 contêm o domínio da fibronectina, com forte afinidade à gelatina (HANNAS, 2007, NAGASE et al., 2006; WU, 1996)

Entre as **colagenases**, encontram-se a MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP- A principal característica das enzimas deste grupo está na capacidade de clivar o colágeno intersticial tipo I, II e III, sendo capazes ainda de digerir algumas outras moléculas presentes ou não na MEC. Este trabalho teve por objetivo observar a colagenase MMP-8 no tecido pulpar normal e inflamado. Agrupadas como **gelatinases ou colagenases tipo IV,** e também avaliadas neste estudo, estão a MMP-2 (Gelatinase A) e MMP-9 (Gelatinase B), que possuem capacidade de digerir

rapidamente o colágeno desnaturado, também denominado gelatina. As **estromelisinas** (MMP-3 e MMP-10), além de degenerarem componentes da ECM, a MMP-3, em particular, é capaz de ativar algumas pro MMPs. A MMP-11, apesar de receber a denominação de estromelisina 3, agrupa-se entre as "outras" MMPs devido à sequência e especificdade de substrato divergir das estromelisinas 1 (MMP-3) e 2 (MMP-10). As **matrilisinas** (MMP-7 e MMP-26) degradam componentes da ECM e, especificamente a MMP-7, possui a aptidão para o processamento da superfície celular de moléculas. No grupo das **estromelisinas,** estão MMP-3 e MMP-10, que digerem componentes da ECM, sendo que a MMP-3 é capaz de ativar várias pro-MMPs. Dentre as **MMP de membrana (MT-MMP)**, destacam-se seis (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24, MMP-17, MMP-25). Exceto a MMP-14, todas são capazes de ativar a pró-MMP-2. As demais MMPs são classificadas como **outras** (MMP-11, MMP-12 ou metalo-elastase, MMP-20, MMP-22, MMP-23), sendo expressas principalmente em macrófagos. Além da elastina, estas degradam também outras proteínas. A Enamelisina (MMP-20) digere a amelogenina, localiza-se principalmente no esmalte dentário pré-formado. Nos casos de amelogênese imperfeita, um distúrbio genético que causa a formação defeituosa do esmalte, é devido a mutações no sitio de clivagem da MMP-20 (HANNAS, 2007; VISSE, NAGASE, 2003).

A tabela 1 mostra a classificação das MMPs bem como o principal substrato de atuação das mesmas.

Tabela 1 - Classificação das MMPs e seu principal substrato de atuação

Classificação	MMP	Substrato Prefencial
COLAGENSES	MMP-1	proMMP-9
	MMP-8	Colágeno helicoidal
	MMP-13	Colágeno tipo I, II, IV, IX, X, XIV; gelatina Proteínas não-colágenas (fibronectina, tenascina, fibrilina, etc)
	MMP-18	
GELATINASES	MMP-2	ProMMP-9, gelatina e fibronectina
	MMP-9	Gelatina, fibronectina, elastina, proteoglicana, colágeno IV, V, VIII, X e colágeno tipo I desnaturado
ESTROMELISINAS	MMP-3	Fibronectina, laminina, elastina, proteoglicanas, colágeno IV, V, IX e X, proMMP-1, -7, -8, -9, -13
	MMP-10	Fibronectina, laminina, elastina, proteoglicanas e colágeno IV, V, IX e X
MATRILISINAS	MMP-7	Fibronectina, elastina, colágeno IV
	MMP-26	
MT-MMP	MMP-14	ProMMP-2, -13, colágeno helicoidal
	MMP-15	Gelatina, macromoléculas da ECM como fibronectina, laminina, entre outras
	MMP-16	ProMMP-2
	MMP-24	_____
	MMP-17	
	MMP-25	_____
Outras MMPs	MMP-11	
	MMP-12	Elastina
	MMP-20	Matriz de esmalte dentário
	MMP-22	Podem estar envolvidas na ativação autocatalítica de várias MMPs.
	MMP-23	Em humanos, encontradas principalmente em ovários, testículos e próstata

.

2.3.3 Estrutura das MMPs

Todas as MMPs são sintetizadas como pré/pro-enzimas e secretadas como proMMP inativa, na maioria dos casos. (NAGASE, WOESSNER, 1999) Estruturalmente (Figura 1), apresentam grande homologia seqüencial, diferindo-se uma das outras com relação à especificidade do substrato e controle transcripcional. Todas as MMPs derivam de um protótipo de três a cinco domínios. Pré-domínio (mantém a enzima como um zimogênio inativo, até que seja removido por proteólise), domínio catalítico (contém o Zn no sítio ativo), domínio Hemopexina/Vitronectina (media a interação entre enzimas e TIMPs e a associação aos receptores celulares), domínio rico em cisteína. As gelatinases, enzimas estudadas neste trabalho, apresentam o domínio da fibronectina (requerido para a ligação e quebra do colágeno) e as MMPs tipo membrana possuem o domínio transmembrana (HANNAS, 2007; VISSE, NAGASE, 2003).

As MMPs são geralmente expressas na forma de zimogênio inativo, sendo que o pró-domínio se dissocia do domínio catalítico antes de sua ativação. Esta ativação pode ser alcançada através da autocatálise ou mesmo pela ação de enzimas proteolíticas como plasmina ou outra MMP. Alterações de pH também podem estar associadas, *in vitro* e *in vivo* com a ativação das destas enzimas e isso ocorre, por exemplo, no meio oral, quando há redução do pH salivar, acarretando na ativação das gelatinases. O tratamento com calor também pode promover sua ativação. (HANNAS et al., 2007; VISSE, NAGASE, 2003).

Portanto, uma das características marcantes das MMPs é que muitos desses genes são induzíveis. Incluem-se entre os efetores os fatores de crescimento, citocinas, agentes químicos, stress físico, transformação celular oncogênica e o reforço da expressão gênica de MMP pode ser regulada por fatores supressores como fator de crescimento tranformador β, ácidos retinóicos, glucocorticoides. Estudos recentes enfatizam, porém, que não apenas fatores solúveis, mas também interações célula-matriz e célula-célula são fundamentais à expressão gênica das MMPs (NAGASE, WOESSNER, 1999).

Já na forma ativada, a atividade funcional das MMPs é regulada através de quatro mecanismos: controle transcripcional positivo e negativo de genes MMP, pela

ativação do estado latente, por diferenças na especificidade de substrato e pela modulação pelos inibidores de tecido (TIMPs). Em situações de normalidade, a natureza estabelece, então, o perfeito equilíbrio entre os compostos moleculares ativos e inativos, regendo tanto os processos formadores como os de degradação e reparo teciduais (HANNAS, et al., 2007).

TIMPs são os maiores reguladores endógenos da atividade de MMPs e, até o momento, foram descritos quatro diferentes TIMPs (TIMP-1 a -4) em vertebrados e sua expressão é regulada no decorrer do desenvolvimento e remodelação tecidual. São proteínas de baixo peso molecular que, ao formar complexos com as MMPs, podem bloquear ativação de pró-MMP latentes ou podem influenciar a sua capacidade para a hidrólise de um determinado substrato (HANNAS et al., 2007; NAGASE, WOESSNER, 1999, SORSA, et al., 2004, VISSE, NAGASE, 2003).

2.3.4 MMPs no meio bucal

Se compreendermos as MMPs como enzimas endógenas que regulam muitos dos processos de desenvolvimento que ocorrem sistemicamente, fica claro o entendimento de que, também na cavidade bucal, elas apresentam importante função. A literatura atual já evidenciou que as MMPs não apenas participam do processo de remodelação da ECM como também têm influência em muitas das funções celulares, já que elas (I) degradam as células da MEC e permitem a migração celular; (II) alteram o microambiente da ECM resultando na alteração do comportamento celular e (III) modulam a atividade de moléculas bioativas através da clivagem direta, liberação de substâncias armazenadas ou através da modulação dos seus inibidores (VU, WERB, 2000).

As MMPs têm papel fundamental no desenvolvimento e remodelação dos tecidos orais. A literatura comprova, por exemplo, a participação dessas enzimas no desenvolvimento do esmalte dental e estabelecimento da fluorose (BARTLETT et al., 2004, HANNAS et al., 2007). As principais MMPs encontradas na cavidade bucal são a **MMP-8 (Colagenase)**, a **MMP-2 e MMP-9 (ambas Gelatinases)** e a **MMP-20 (Estromelisinas)**.

As MMPs estão relacionadas a vários processos patológicos da cavidade bucal. Sabe-se, por exemplo, que, embora a doença periodontal seja iniciada pela microflora subgengival, os mediadores da degradação do tecido conjuntivo durante tal doença inflamatória são gerados pela resposta do hospedeiro aos microorganismos e a degradação do tecido gengival durante a doença periodontal ativa ocorre, no mínimo parcialmente, em decorrência da ação das MMPs (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; LEE et al., 1995).

Relacionam-se à doença periodontal a quantidade aumentada de MMP-2 e MMP-9 (EJEIL et al., 2003; MÄKELÄ et al., 1994) bem como a presença da MMP-8, uma potencial desencadeadora da desta patologia (KINANE et al., 2003; LEE et al., 1995).

A inflamação pulpar em decorrência de pulpites é também mediada pelas MMPs (BIRKEDAL-HANSEN, 1993). Foram detectados níveis de MMP-9 consideravelmente superiores em polpas inflamadas em comparação a polpas saudáveis (GUSMAN, SANTANA, ZEHNDER, 2002). Outro estudo demonstrou a abundância de MMP-8 no tecido pulpar inflamado (WAHLGREN et al., 2002).

A MMP-20 ou enamelisina, capaz de degradar a amelogenina, é primariamente localizada no esmalte recém-formado e exerce importante função na sua formação (BARTLETT et al., 2004; HANNAS et al, 2007; NAGASE, 2003). Experimentos em ratos geneticamente modificados, que não realizavam síntese de MMP-20, mostraram deficiência no processamento da amelogenina, resultando na formação de esmalte alterado, semelhante àquele formado em pessoas com *amelogenesis imperfecta* (CATERINA et al., 2002). A presença de MMP-20 no fluido dentinário sugere que as MMPs dos processos odontoblásticos e do fluido dentinário também estejam envolvidas na formação de dentina peritubular (SULKALA et al., 2002).

2.3.5 MMPs na polpa

Os danos ao tecido pulpar (mecânico, químico, térmico e/ou por microorganismos) podem provocar vários tipos de resposta inflamatória, na qual

estão envolvidas complexas reações vasculares, linfáticas e reações teciduais locais. Assim como em qualquer outro processo inflamatório, a pulpite está associada à degradação tecidual e a literatura atual relaciona as MMPs aos mecanismos fisiológicos e patológicos de ocorrência pulpar (CREEMERS et al., 1998, GUSMAN, SANTANA, ZEHNDER, 2002; TSAI et al., 2005).

A polpa responde à injúria dentinária através da formação de matriz de dentina terciária (reacional ou reparadora), que se formam logo abaixo do local de injúria. É provável que cada passo nesse processo de reparação seja fortemente controlado pelo equilíbrio entre numerosas moléculas bioativas liberadas por dentina e polpa, de forma que, quando este equilíbrio é rompido, o processo de reparo não se viabiliza (MAGLOIRE et al., 2001). Por ser assim, o conhecimento detalhado da ação das metaloproteinases na polpa pode também ser importante à melhor compreensão dos eventos moleculares que ocorrem na inflamação pulpar. A principal força que parece estar por trás da reação inflamatória pulpar reside na resposta do sistema imunológico à contaminação desse tecido por bactérias, aumentando a produção de fatores inflamatórios e de reabsorção óssea (CREEMERS et al., 1998; TSAI et al., 2005). Com relação ao papel das MMPs na polpa, já está comprovado que, durante o estágio crônico de inflamação pulpar, células pulpares têm capacidade de aumentar a secreção de algumas MMPs que, por sua vez, podem destruir a matriz extracelular presente nesse tecido, ficando clara a importância do conhecimento dos fatores que podem regular síntese e secreção das MMPs em tecido pulpar inflamado (CHANG, YANG, HSIEH, 2001).

Estudos já comprovaram que, quando os níveis de MMP e atividade gelatinolítica na polpa humana saudável e inflamada são comparados, a MMP-9 pode ser fundamental para o colapso do tecido pulpar inflamado (GUSMAN, SANTANA, ZEHNDER, 2002; HANNAS et al., 2007). BIRKEDAL-HANSEN, 1993, corroboram tal afirmação quando demonstram em seu estudo que a inflamação pulpar é mediada pelas MMPs. Outro estudo estabelece o envolvimento da MMP-8 no processo inflamatório pulpar (WAHLGREN et al., 2002). Já a MMP-13 (colagenase-3), expressa em grande quantidade na polpa sã adulta, sugere-se importante participação desta enzima no *turnover* da MEC pulpar. Sua participação, entretanto, no processo de inflamação deste tecido continua inconclusiva (SULKALA et al., 2004).

2.3.5.1 Colagenases

Estruturalmente, as colagenases apresentam um pré-domínio, domínio rico em cisteína (pró-domínio), domínio catalítico (contém o Zn^{2+} no sítio ativo) (Figura 2).

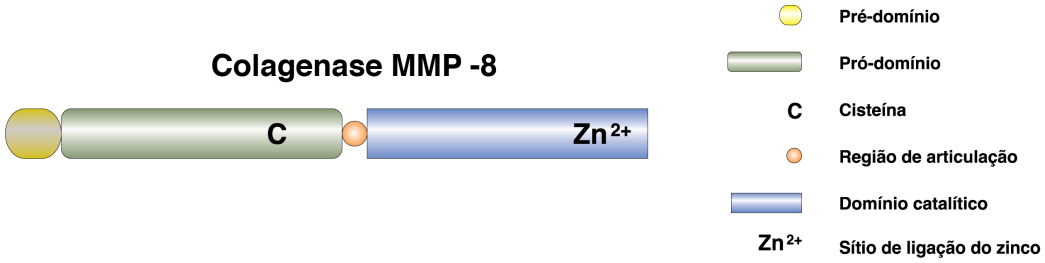


Figura 2 - Representação esquemática da estrutura das Colagenases, dentre as quais destaca-se a MMP-8, estudada neste trabalho (HANNAS, 2007, NAGASE et al., 2003; WU, 1996)

As colagenases (MMP-1, -8, -13 e 18) são comprovadamente sintetizadas no tecido pulpar por tecido conjuntivo, fibroblastos, queratinócitos, osteoblastos, macrófagos (VISSE, NAGASE, 2003) e por odontoblastos (POLASSARI et al., 2003). Compartilham a capacidade única de clivar a estrutura em tripla hélice do colágeno intersticial, tipos I, II, III, V, IX e XI em sítios específicos, produzindo os fragmentos ¾ e ¼ (BIRKEDAL-HANSEN, 1993, HANNAS, et al., 2007). Sendo a proteína mais abundante na matriz dentinária orgânica é o colágeno tipo I, tendo como principais produtores os odontoblastos (TJÄDERHANE et al., 2001), compreende-se a importância dessas enzimas (colagenases) para a fisiologia deste tecido.

A colagenase estudada neste trabalho, a MMP-8 ou colagenase neutrofílica, cujo substrato preferencial é o colágeno, tipos I e II (STERNLICHT, WERB, 2001), é especialmente sintetizada por leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos), sendo armazenada em grânulos intracelulares da medula óssea e é liberada em resposta a estímulos extracelulares. Entretanto, pode também ser produzida por células do epitélio sulcular, fibroblastos do ligamento periodontal, monócitos/macrófagos e células plasmáticas (TERVAHATIALA et al., 2000, SORSA et al., 2004, HANNAS, 2007). Pode

ser secretada tanto na forma não glicosilada, a 55 kDa, quanto na forma glicosilada, a 75 kDa. Quando ativada, adquire o peso molecular de 55-65 kDa (HANNAS, 2007).

Além de ser uma ferramenta para a monitoração da doença periodontal (MÄNTYLÄ et al., 2006), e ser comprovadamente importante para o *turnove*r celular, a quantidade de MMP-8 também indica presença de inflamação, já que esta enzima é um modulador da resposta do hospedeiro (SORSA et al., 2004). Recentemente, foi demonstrado que a MMP-8 apresenta atividade antiinflamatória (OWEN et al., 2004, SORSA, GOLUB, 2005).

Outras colagenases são também encontradas no tecido pulpar. SULKALA et al, 2004, em estudo, indicaram que a MMP-13 é a colagenase chave para a polpa, demonstrando sua síntese e expressão nesse tecido, uma característica interessante visto a limitada expressão de MMP-13 em tecido normal adulto.

2.3.5.2 Gelatinases

.As gelatinases de 72 kDa (MMP-2) e 92 kDa (MMP-9), inicialmente descritas como proteínas que degradam gelatina (colágeno desnaturado por colagenases intersticiais) (VARTIO, VAHERI, 1981), responsabilizam-se também pela degradação de várias proteínas da matriz extracelular, como o colágeno tipo IV e V, a elastina, a fibronectina e a vitronectina (VISSE, NAGASE, 2003), sendo por isso também denominadas colagenases tipo IV (HANNAS, 2007). Aceita-se atualmente que esta enzima possui ainda atividade chave na remodelação fisiológica do colágeno em tecido conjuntivo (CREEMERS et al., 1998), incluindo o tecido pulpar, apesar de sua constituição ser principalmente à base de colágeno fibrilar tipo I e III, conhecidamente resistentes à atividade gelatinolítica.

As gelatinases possuem em sua estrutura três domínios de fibronectina, responsáveis pela sua ligação à gelatina, laminina, elastina e aos colágenos tipos IV e VII (NAGASE, VISSE, MURPHY, 2006; VISSE, NAGASE, 2003) e é esta a diferença estrutural quando comparadas às colagenases (Figura 3). Há uma coordenação entre a cisteína presente no pró-domínio e o zinco presente no domínio catalítico. Essa ligação Cis-Zn^{2+} mantém as pro-MMPs inativas, prevenindo que

moléculas de água se liguem ao átomo de zinco, o que ocasiona a sua ativação (NAGASE et al., 2006).

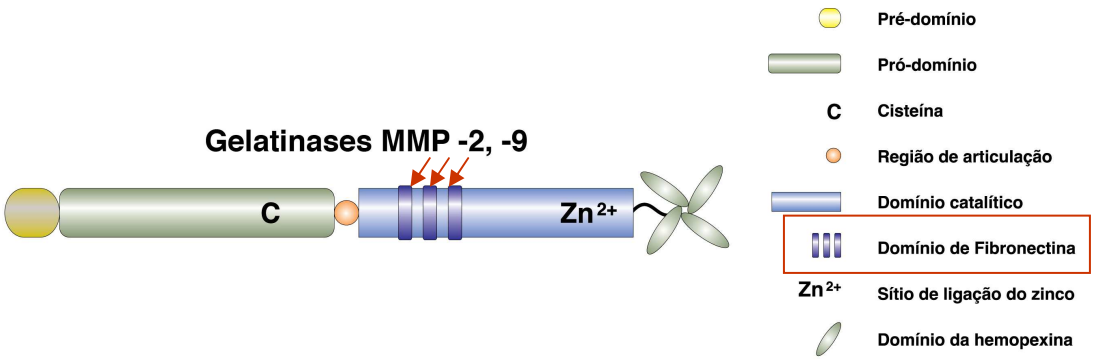


Figura 3 - Representação esquemática da estrutura das Gelatinases. As setas apontam para o domínio de Fibronectina, que diferem as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) das colagenases (entre elas, a MMP-8), justificando assim suas diferenças na degradação de substratos (HANNAS, 2007, NAGASE et al., 2006; WU, 1996)

A presença da forma ativa de gelatinase A na dentina humana mineralizada implica essa enzima no processo de mineralização dentinária (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000 Tais enzimas contribuem para a reorganização da matriz orgânica, que ocorre previamente ao processo de mineralização. Algumas delas podem ser ainda incorporadas à dentina durante o processo de mineralização, fato esse comprovado pela presença de gelatinase A (MMP-2), enamelizinas bem como uma enzima colagenolítica, na forma latente, ainda não identificada. Essas proteases dentinárias podem ser liberadas e ativadas durante o processo de cárie (SULKALA et al., 2007). Apesar de essas duas enzimas apresentarem-se similares quanto à estrutura e especificidade ao substrato, sua origem celular é diferente. A **MMP-2 (Gelatinase A)** foi inicialmente purificada de tumor de rato com metástase (SALO et al., 1983). É secretada por células endoteliais, fibroblastos, macrófagos ou células malignas (CHAKRABARTI, PATEL, 2005) na forma latente de 72 kDa e, quando clivada, adquire a forma de 59-62 kDa (SALO et al., 1983). Degrada principalmente a elastina. Quando não associada aos TIMPs, a MMP-2 é também capaz de degradar o colágeno tipo I, II, III (AIMES, QUIGLEY, 1995). Inicialmente, a quebra do colágeno gerando os fragmentos ¼ e ¾ é fortemente dependente do domínio Hemopexina tipo C, enquanto a posterior hidrólise é promovida pelo domínio fibronectina tipo II, resultando em rápida degradação do colágeno

desnaturado (PATTERSON et al., 2001). Por outro lado, a **MMP-9 (Gelatinase B)** é secretada por fatores de crescimento e células pró-inflamatórias, como neutrófilos, macrófagos, células alveolares e epiteliais dos brônquios, fibroblastos, células endoteliais e células malignas (ATKINSON, SENIOR, 2003; BJÖRKLUND, KOIVUNEN, 2005; MÄKELÄ et al., 1994). A MMP-9 é sintetizada e secretada na pró-forma latente de 92 kDa e processada para ser ativada nas formas de 68-82 kDa (SORSA et al., 1992). A pró-MMP-9 pode também ser encontrada associada ao TIMP-1, TIMP-2 formando um complexo de 92 kDa ou ainda em um complexo de 120 kDa com NGAL (Gelatinase-associated lipocalin) (KJELDSEN et al., 1993).

A MMP-2 é uma enzima constitutiva e possui atividade similar à da MMP-1 ou colagenase, sendo também capaz de degradar fibrilas de colágeno tipo I reconstituídas. Por outro lado, a MMP-9 não foi capaz de degradar o colágeno solúvel ou fibrilar sob as mesmas condições que a MMP-2, indicando que a atividade colagenolítica da MMP-2 não é uma propriedade inerente a todas as gelatinases (AIMES, QUIGLEY, 1995).

A MMP-9 degrada com maior eficácia a gelatina, mas também é capaz de atuar sobre o colágeno tipo IV, V e XI e sobre a fibronectina (KONTTINEN et al., 1998). Além de exercer papel importante na inflamação, a MMP-9, assim como a MMP-8, pode exercer atividade antiinflamatória com características protetoras (OWEN et al., 2004; SORSA et al., 2004). A MMP-9 exerce atividade protetora sobre o sistema cardiovascular, limitando o crescimento de plaquetas e aumentando a sua estabilidade. Quando uma ruptura de plaquetas ocorre, os processos dependentes da MMP-9 são ativados e iniciam um processo de cicatrização que envolve o recrutamento de células do músculo liso e a elaboração de matriz (JOHNSON et al., 2005).

Como se pode observar, ocorre um complexo de atividades em nível molecular responsável, ao mesmo tempo, pela organização e degradação estrutural dos tecidos. Isso se dá num equilíbrio que somente é interrompido com a interferência de fatores externos mal compreendidos ou assimilados, ou quando a própria natureza dos organismos vivos determina sua trajetória descendente de vida. No que diz respeito à polpa dental, o reconhecimento desses fenômenos e a tradução da combinação de eventos moleculares associados aos estágios de inflamação pulpar podem abrir novas perspectivas para o tratamento e a conservação da vitalidade dos dentes.

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O processo inflamatório da polpa (pulpite) tem sido exaustivamente investigado pela literatura científica. Até os dias atuais, são grandes os conhecimentos sobre o diagnóstico da condição pulpar e as formas de tratamento conservador da polpa. Entretanto, pouco ainda se conhece com relação aos eventos celulares e moleculares envolvidos nesse processo. Por ser assim, o objetivo deste estudo foi determinar o padrão de expressão das MMP-2, MMP-9 e MMP -8 durante os diferentes estágios de inflamação pulpar, conforme o diagnóstico clínico e histológico previamente determinado. Foram adotadas as seguintes hipóteses nulas:

1- O padrão de expressão das MMP-2, MMP-9 e MMP-8 não sofre alteração nos diferentes estágios da polpa humana: normal, reversível, transição, irreversível ou necrose.

2- Não há diferença de expressão das MMP-2, -9 e MMP-8, considerando-se um mesmo estágio de inflamação tecidual pulpar.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AQUISIÇÃO DOS DENTES

Foram selecionados 23 dentes sadios, restaurados ou cariados, de pacientes atendidos na Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na Faculdade de Odontologia da Universidade do Sagrado Coração, na Faculdade de Odontologia da Universidade Paulista e no Pronto-Socorro Municipal de Bauru, cuja extração era indicada por razões protéticas e ortodônticas, terapêuticas e profiláticas.

Previamente à extração dos dentes, os pacientes foram avaliados por dois operadores calibrados para diagnosticar clinicamente as diferentes alterações pulpares. Ratifica-se, no entanto, que a decisão de extração não era motivada pelas razões da presente pesquisa, já que a decisão pela extração de um dente era de responsabilidade dos profissionais das respectivas entidades mencionadas, atendendo à necessidade particular de cada paciente. Foram excluídos os dentes que apresentavam excessiva destruição coronária que impedisse a aplicação dos testes objetivos de diagnóstico ou inviabilizasse a posterior avaliação microscópica.

O Termo de Consentimento Esclarecido como o Termo de Doação do dente (Anexos A e B, respectivamente), conforme determinado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru e aprovado em reunião realizada no dia 27 de agosto de 2003 foi devidamente preenchido antes da doação dos dentes para utilização neste trabalho.

4.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os dentes selecionados foram agrupados de acordo com os diagnósticos clínico, histológico e histomorfométrico, definidos e relatados em trabalho anterior (HERMOZA-NOVOA, 2005), com o qual o presente estudo foi feito em parceria.

Os dados obtidos foram descritos em ficha clínica (Anexo C)

4.3 CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA

De acordo com o estado da polpa dentária, previamente estabelecido através dos dados semiológicos subjetivos e objetivos, os dentes foram divididos em quartro grupos abaixo discriminados (BRAMANTE, 1996; De DEUS, 1992; PEREIRA, SEGALA, 2003; SELTZER; BENDER, 1979):

1- Grupo I - Controle (Fase de Saniedade): Eram consideradas normais as polpas que apresentavam ausência de qualquer ocorrência clínica que pudesse suscitar resposta inflamatória. Nesses casos, a anamnese indicava ausência de dor antecedente ou presente no momento do exame. Nesse grupo, a resposta aos testes objetivos era lenta e com declínio rápido. Os dentes não apresentavam sensibilidade à percussão horizontal ou vertical, e as radiografias não apresentavam qualquer ocorrência digna de registro.

2- Grupo II (Fase Reversível): O relato do paciente para os dentes desse grupo reportavam sintomatologia dolorosa provocada por estímulos frios, açucarados ou ao tato, todos de curta duração e de alívio imediato, sem antecedente de dor espontânea. Os testes térmicos mostravam resposta imediata provocada pelo frio, com declínio rápido ou discretamente lento. A sensibilidade ao teste elétrico era obtida com voltagem de magnitude igual ou mais baixa que a requerida pelo dente homólogo ou dentes vizinhos normais. Nesse grupo, as radiografias mostravam, na maioria dos casos, cavidades cariosas de profundidades variáveis, restaurações com diferentes condições clínicas e ausência de imagem sugestiva de alteração do periápice. Dentes com ligeiro alargamento do espaço periodontal, mas com sinais objetivos acima descritos, eram também incluídos nesse grupo.

3- Grupo III (Fase de Tansição): Nesse grupo, o relato do paciente apontava sintomatologia dolorosa espontânea intermitente ou desencadeada por agentes frios ou quentes, necessitando do uso eventual de analgésicos comuns. Não havia relatos de antecedência dolorosa espontânea contínua. As respostas aos testes térmicos eram imediatas e com declínio ligeiramente lento. Ao teste elétrico as respostas eram geralmente mais rápidas do que aquelas registradas nos dentes dos Grupos I e II. Os dentes não apresentavam dor à percussão horizontal ou vertical, embora pudessem demonstrar alterações ligeiras da região apical.

4- Grupo IV (Fase Irreversível e Necrose Pulpar): Os dentes apresentavam os seguintes sinais e sintomas isoladamente ou sobrepostos: dor presente ou histórico de espontânea intermitente ou contínua, que não cessava com o uso de analgésicos comuns; dor localizada ou reflexa, provocada ou exacerbada pelo calor; sensibilidade à pressão ou à percussão vertical. Eventualmente, não apresentavam qualquer resposta aos testes de sensibilidade, fato que coincidia com as polpas necrosadas. Os sinais radiográficos encontrados isoladamente ou em conjunto eram alargamento do espaço periodontal, rarefações ósseas periapicais ou peridentais ou, ainda, reabsorções dentárias.

Seguindo os critérios acima mencionados, os espécimes foram divididos nos seguintes grupos:

Grupo I - Controle: 07 dentes hígidos, com características clínicas normais;

Grupo II: 04 dentes na fase de reversibilidade;

Grupo III: 04 dentes na fase de transição;

Grupo IV: 08 dentes na fase de irreversibilidade e/ou necrose pulpar.

4.4 COLETA, ARMAZENAMENTO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS DENTES

A exodontia dos dentes selecionados foi realizada sob anestesia local e executada pelos profissionais responsáveis pelas respectivas clínicas de Odontologia.

Imediatamente após a extração, os dentes foram seccionados no terço cervical da raiz com ponta diamantada (N° 2136 KG Sorensen) em alta rotação, sob refrigeração abundante, armazenados (coroa dentária e raiz, seccionadas) em formol a 10% (Formaldeído em solução 37% PA ACS, Merck®), onde permaneceram durante 48 horas para fixação do tecido. Completado este período, os dentes foram lavados em água corrente durante 24 horas para o início, em sequência, do processo de desmineralização. Para tanto, os dentes foram colocados em solução

de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) a 7%, que continha 4,13% de Titriplex III (Merck®) e 0,44% de hidróxido de sódio.

A solução de EDTA foi trocada semanalmente, por um período de aproximadamente 4 meses. O controle da desmineralização foi realizado através da realização de tomadas radiográficas dos espécimes. Prosseguia-se com a desmineralização até o momento em que não se notava qualquer sinal de radiopacidade nos espécimes. Para este controle radiográfico, empregou-se o aparelho de radiografia Yoshida Kaycor X-707, configurado para 7mA e 70KvP com tempo de exposição de 0,17 segundos, a uma distância de 40cm do objeto, utilizando-se o filme radiográfico Kodak Insight (Eastman Kodak Company, New York, USA), seguindo orientação dada na Disciplina de Estomatologia da FOB-USP. A Figura 4 representa, esquematicamente, as etapas desde a aquisição do dente até desmineralização total do espécime.

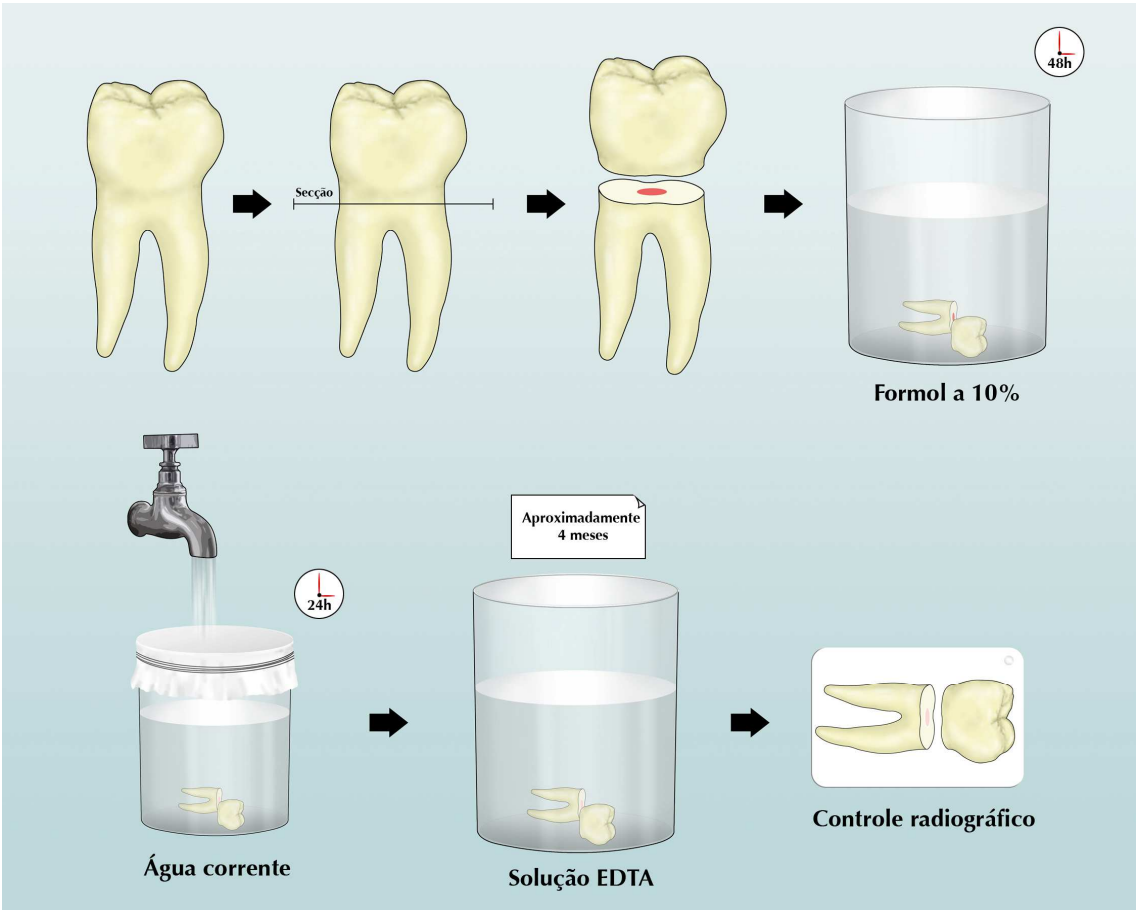


Figura 4 - Coleta e processamento dos dentes: (A) dente obtido; (B) secção transversal; (C) fixação em solução de formol tamponado a 10% (D) lavagem em água corrente; (E) desmineralização em solução de EDTA a 7%

Completada a desmineralização, os dentes eram lavados com água corrente por 24 horas, submetidas ao processo de desidratação crescente de álcool etílico (70%, 90% e 100%), ao processo de diafanização em xilol e incluídos em Histosec® (MERCK) Dos espécimes assim incluídos, foram obtidos 20 cortes semi-seriados de 5μm de espessura, corados pela técnica da HE (LUNA, 1969) ou Brown&Brenn (LUNA, 1969) para avaliação da condição histopatológica (trabalho realizado previamente por Hermoza-Novoa, em 2005).Por meio de escores, obtidos através da análise histomorfométrica, HERMOZA-NOVOA, 2005, atribuiu escores de 0 a 4, onde o 0 correspondeu ao melhor e o 4, ao pior resultado, para todos os grupos. Dessa forma, classificaram a condição pulpar de acordo com sua capacidade de resposta biológica, sendo considerados:

Polpa Normal – Escore 0 – ausência de processo inflamatório e de bactérias.

Polpa em fase Reversível – Escores 1 e 2 - inflamação leve a moderada, com bactérias presentes na superfície dentinária ou no interior dos túbulos até meia distância da câmara pulpar..

Polpa em fase de Transição – Escore 3 - inflamação restrita à polpa coronária e bactérias, quando presentes, encontravam-se em dentina terciária ou próximas à camada odontoblástica.

Polpa em fase Irreversível – Escores 3 e 4 – presença de áreas de inflamação e/ou abscesso, envolvendo o tecido pulpar coronário, estendendo-se às raízes, com bactérias no interior da polpa dentária.

Polpa Irreversível/Necrose – Escore 4 – amplas áreas de necrose, com bactérias presentes no interior da polpa dentária. Embora não haja diferença considerável na capacidade de resposta pulpar nas polpas desse grupo e do anterior, o estágio de polpa necrosada foi aqui adotado para permitir a equiparação com a polpa considerada clinicamente necrosada.

4.5 TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA (IHC)

Foram realizadas marcações de IHC para MMP-2, MMP-9 e MMP-8.

Os cortes teciduais obtidos, com 4 μm de espessura, foram aderidos em lâminas silanizadas (DAKO), confeccionadas sem gelatina. O tempo decorrido desde o corte do bloco de parafina até os procedimentos de imunomarcação obedeceu a um prazo mínimo de 07 dias com o objetivo de se minimizar a perda de cortes por descolamento da lâmina durante dos procedimentos de IHC.

Previamente ao início das marcações, as lâminas foram colocadas em estufa a 60º C, durante 40 minutos com a finalidade de eliminar o excesso de parafina dos cortes.

Retiradas da estufa, após atingirem a temperatura ambiente, as lâminas foram submetidas ao processo de **desparafinização**, sendo mergulhadas em 2 banhos de xilol de 10 minutos cada. Em sequência, foram **hidratadas** através da submersão em álcool absoluto (2 banhos com duração de 5 minutos cada) e álcool 70% (1 banho por 5 minutos). Após hidratação dos cortes, estes foram lavados em água destilada por 10 minutos para então prosseguir com o próximo passo: o **bloqueio da peroxidase endógena.** Para tanto, utilizou-se o bloqueador de peroxidase Peroxidase Blocking Reagente, Ref. 52001 (Dako North America, Inc), que foi gotejado sobre os cortes até cobertura total dos mesmos, permanecendo nestas condições durante 20 minutos.

Decorrido esse tempo, os cortes foram lavados com ***P**hosphate **B**uffered **S**aline* (PBS) a 0,01M, pH 7,4. Realizaram-se 2 banhos com PBS de 5 minutos de duração cada, trocando-se a solução para cada banho. Em seguida, as lâminas foram cobertas por **tampão citrato** previamente aquecido em *steemer* a 95º C, onde permaneceram durante 20 minutos. As lâminas foram então removidas deste recipiente e colocadas sobre a bancada para esfriar durante 40 minutos. Prosseguia-se, pois, com 2 banhos em PBS, num intervalo de 5 minutos cada, secagem das lâminas com papel filtro e delimitação da área do corte com caneta DAKO Pen (Dako North America, Inc) com finalidade de evitar o escoamento dos anticorpos e

cromógeno que serão posteriormente aplicados sobre os cortes, favorecendo à marcação uniforme dos cortes e à otimização do uso dos reagentes.

Em seguida, as lâminas eram submersas em leite desnatado (Molico® -Nestlé) a 4% (200mL de PBS : 8g de Leite Molico®) durante 40 minutos para o bloqueio das proteínas sorológicas. Na sequência, as lâminas eram meticulosamente secas com papel filtro para então receberem o **anticorpo primário.**

Para as diferentes imunomarcações realizadas neste trabalho, foram utilizados os seguintes anticorpos primários:

- ✓ MMP-2 → Anti-Goat, AF902 (R&D Science, Inc)
- ✓ MMP-9 → Anti-Goat, AF911 (R&D Science, Inc)
- ✓ MMP-8 → Anti-Rabbit, 3528-100 (Bio Vision Research Products)

Todos os anticorpos primários utilizados neste trabalho foram usados na concentração 1:200 para a obtenção dos controles positivos, os quais permaneceram em contato com os cortes por 2 horas, em câmara úmida. Ressalte-se que, para a obtenção dos controles negativos, utilizou-se apenas a solução diluidora dos respectivos anticorpos, que também deve permanecer em contato com os cortes durante 2 horas em câmara úmida.

A técnica usada neste trabalho foi a **de marcação indireta** (Figura 5). Nela, um anticorpo primário reage com o epítopo do antígeno, enquanto um anticorpo secundário é dirigido contra imunoglobulinas da mesma espécie animal que originou o primário.

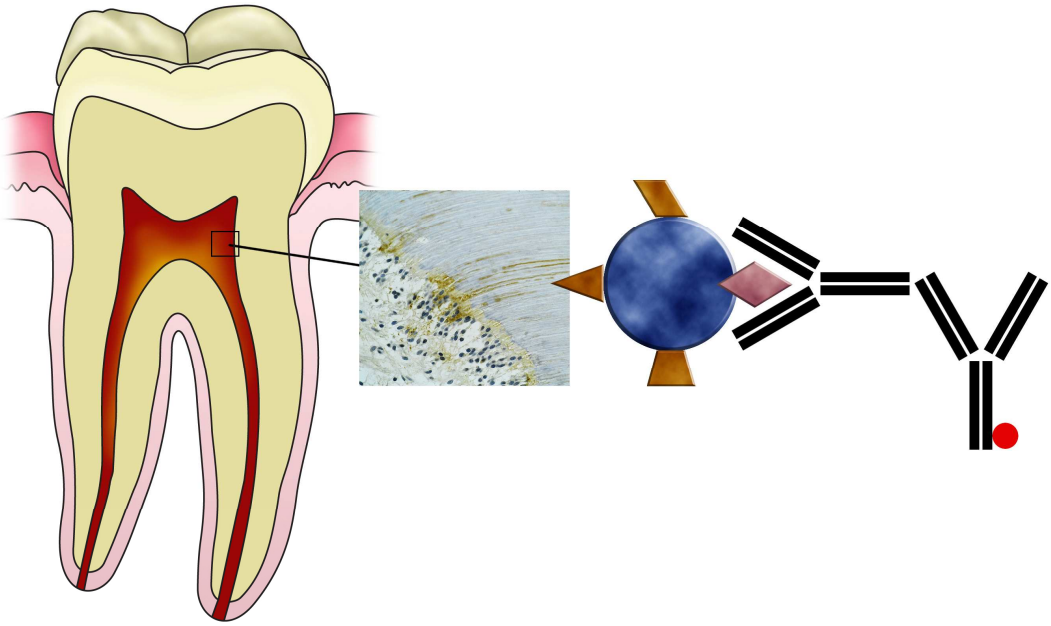


Figura 5 - Representação do método indireto

Posteriormente, os cortes foram lavados em solução de PBS (3 banhos de 5 minutos cada). O controle negativo (que não recebeu o anticorpo primário) foi lavado em cuba separada para não sofrer contaminação do anticorpo gotejado nos demais cortes. Como controle positivo, foi utilizado cortes de neoplasia maligna de soalho bucal.

As lâminas foram, então, secas com papel filtro para receberem o **anticorpo secundário** biotinilado**,** na diluição 1:500, durante 1 hora em câmara úmida. Neste trabalho, utilizou-se em todas as marcações o anticorpo secundário + Streptavidina Dako LSAB + System – HRP, Ref. K0690 (Dako North America, Inc).

Seguiram-se, pois, 3 banhos de PBS, 5 minutos cada, secagem cuidadosa das lâminas com papel filtro, preservando-se sempre a área contendo do corte. O passo seguinte foi a agregação de **diaminobenzidina - DAB (K3468, DAKO),** por 40 segundos a 1 minuto, empregada como cromógeno. Para a remoção do cromógeno, pipetava-se PBS sobre os cortes para então imergirem-se as lâminas em uma cuba contendo esta mesma solução.

Os cortes eram então lavados em água destilada (2 banhos de 10 minutos cada) para a remoção do PBS para serem então submetidos à contra-coloração com hematoxilina, que consta das seguintes etapas:

- Banho em hematoxilina durante 1 a 2 min.
- 2 banhos de 5 min cada, em água destilada.
- Desidratação:
    - Álcool 70%----------1banho rápido
    - Álcool Absoluto----------1 banho rápido
    - Álcool Absoluto----------3 minutos
    - Álcool Absoluto----------3 minutos
- Diafanização:
    - Xilol ----------3 minutos
    - Xilol ----------3 minutos
    - Xilol ----------3 minutos

As lâminas então foram montadas para posterior análise em microscópio comum.

4.6 ANÁLISE POR ESCORE

A avaliação IHC consistiu de uma análise de descrição detalhada do padrão de marcação e da avaliação por escores quanto à intensidade da imunomarcação, sendo avaliadas separadamente a camada odontoblástica e a dentina da região central da polpa. Dessa maneira, foram atribuídos os escores de 0 a 3, sendo considerados:

0= Ausência de marcação
1= Leve marcação
2= Moderada marcação
3= Intensa marcação

4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Realizou-se, para análise estatística, teste não paramétrico Kruskal-Wallis e, o teste de Dunn's para as comparações inter e intragrupos, adotando-se $p<0,05$.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 EXAME CLÍNICO E COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Através do exame clínico, coletaram-se dados nos quais se baseou para a distribuição das amostras conforme apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Total de espécimes distribuídos nos diferentes grupos, de acordo com o diagnóstico clínico

Grupos	Total de Espécimes	Diagnóstico Clínico
I – Controle	7	Polpa Normal / Sã
II	4	Pulpite Reversível
III	4	Transição
IV	8	Pulpite Irreversível / Necrose

5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS CORTES TECIDUAIS CORADOS PELA HE E DOS SUBMETIDOS À IMUNOMARCAÇÃO

Os resultados morfológicos estão ilustrados nas Figuras 6 a 13.

Para facilitar a compreensão, a análise morfológica dos cortes teciduais corados pela HE e submetidos à IHC será dividida em grupos:

A- Grupo Controle (GI)

A região da camada odontoblástica, nos cortes corados pela HE, exibiu dentina íntegra, com os odontoblastos paralelos entre si envolvendo toda a dentina. A polpa, formada por conjuntivo frouxo e vascularizado mostrou delgadas fibras colágenas. A imunomarcação para MMP-2 evidenciou expressão moderada por

odontoblastos. Com relação à MMP-9, rara expressão foi observada nesse grupo celular e para a MMP-8, verificou-se expressão leve neste grupo.

Na região da polpa coronária, a coloração pela HE evidenciou presença de tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos, fibras colágenas e fibroblastos, característicos de tecido pulpar sadio. A imunomarcação para MMP-2 foi ausente, assim como para MMP-9 e MMP-8.

B- Grupo Reversível (GII)

A região da camada odontoblástica em adjacência com a dentina afetada por cárie, pela coloração em HE, exibiu características similares ao do grupo controle: dentina íntegra, os odontoblastos paralelos entre si e dispostos “em paliçada”, envolvendo toda a dentina. A polpa mostrou composição por conjuntivo frouxo, vascularizado, rico em fibroblastos e com delgadas fibras colágenas.

Em alguns cortes foi possível verificar a presença de dentina reacional, seguida por camada odontoblástica mais desorganizada em relação ao grupo controle, mas com a polpa seguindo os padrões averiguados tecido normal. A IHC para MMP-2 revelou expressão moderada em odontoblastos , bem como no interior dos túbulos dentinários próximos a polpa. Para a MMP-9, expressão rara a ausente expressão em odontoblastos. A MMP-8 mostrou padrão de expressão leve por odontoblastos.

No que se diz respeito à região mais central da polpa, os cortes corados pela HE exibem tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos, fibras colágenas e fibroblastos, sugerindo normalidade tecidual. Os cortes imunomarcados não evidenciaram presença das enzimas estudadas.

C- Grupo Transição (GIII)

Esse grupo foi o que exibiu maior diversidade quanto à condição histológica tecidual. No geral, região da camada odontoblástica próxima à região cariada evidenciou, em HE, dentina reacional, camada odontoblástica e polpa periférica desorganizadas. No geral, a imunomarcação para MMP-2 foi moderada; para MMP-9, intensa tanto em odontoblastos como no interior dos túbulos da dentina reacional e para a MMP-8, intensa expressão foi observada em odontoblastos.

Na região central da polpa coronária, foi possível constatar, através da coloração em HE, a presença de infiltrado inflamatório próxima ao vaso sanguíneo, de fibras colágenas e fibroblastos. O padrão de expressão da MMP-2 em células endoteliais e fibroblastos foi moderado. Para MMP-9, intensa expressão foi verificada nas áreas de infiltrado inflamatório, sendo que, para a MMP-8, evidenciou-se intensa expressão nas proximidades dos vasos sanguíneos.

D- Grupo Irreversível/Necrose (GIV)

Na região correspondente à camada odontoblástica, a coloração pela HE mostrou a dentina com algum processo reabsorção superficial, ausência parcial ou quase total da camada de odontoblástica e, para alguns cortes, áreas de necrose pulpar. Para a MMP-2, notou-se leve marcação em confronto com a expressão de MMP-9, que apresentou-se moderada a leve tanto no interior dos túbulos dentinários como na superfície da dentina e odontoblastos. A imunomarcação para MMP-8 foi moderada.

Na região central da polpa coronária, a coloração pela HE evidenciou presença de intenso infiltrado inflamatório, rico em macrófagos, linfócitos e plasmócitos na polpa ao redor de vasos, na maior parte hiperêmicos. A imunomarcação para MMP-2 manteve-se ausente e, para MMP-9, uma intensa a moderada expressão foi notada em fibroblastos e células inflamatórias. Com relação à MMP-8, apresentou expressão moderada em células inflamatórias, presentes tanto no interior dos vasos como fora deles.

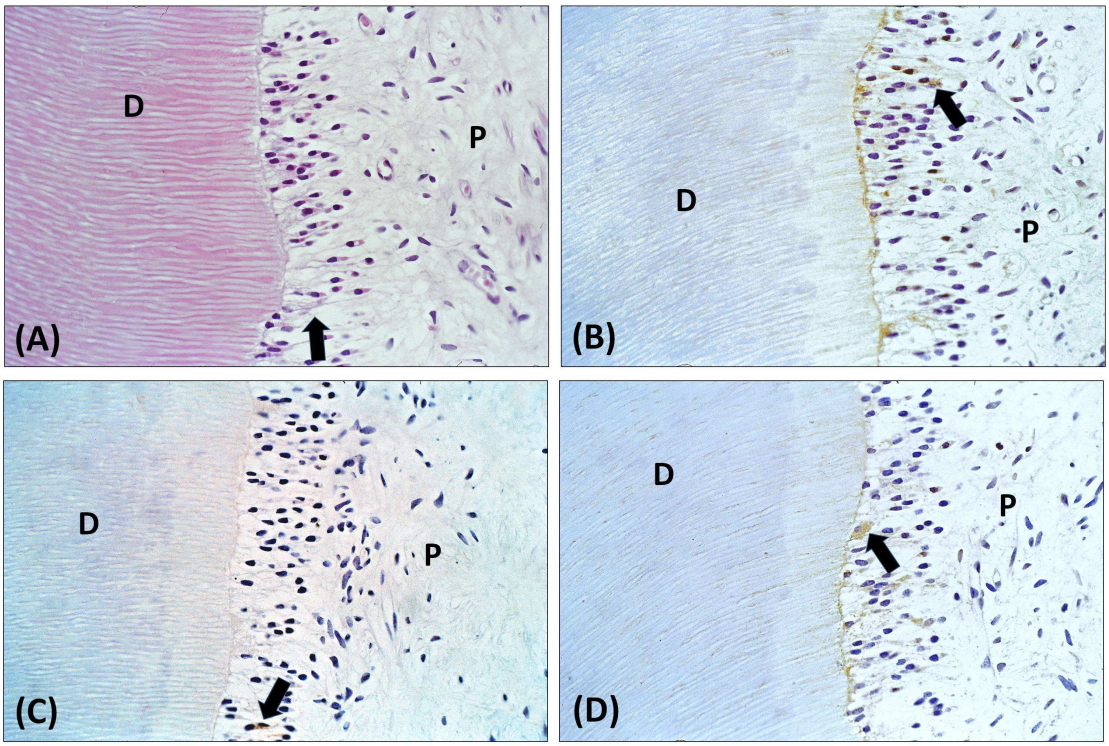


Figura 6 - Grupo Controle – Região da camada odontoblástica : A) coloração pela HE: observar dentina (D) íntegra, os odontoblastos paralelos entre si e dispostos "em paliçada" envolvendo toda a dentina (D) e a polpa (P) formada por conjuntivo frouxo, vascularizado e com delgadas fibras colágenas. (40x10x0,32x foto); B) imunomarcação para MMP-2: expressão moderada apenas em odontoblastos (seta); C) imunomarcação para MMP-9: rara expressão em odontoblasto (seta); e D) imunomarcação para MMP-8: expressão leve em odontoblastos (seta)

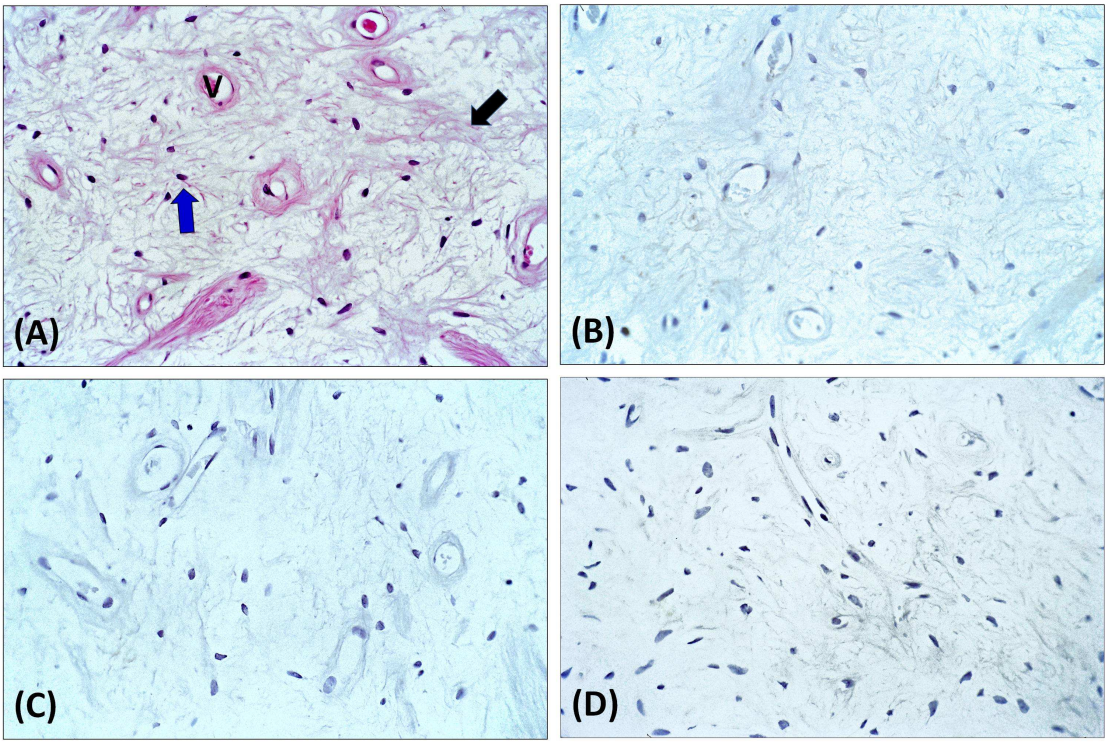


Figura 7 - Grupo Controle – Região da Polpa Coronária: A) coloração pela HE: formada por tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos (V), fibras colágenas (seta azul) e fibroblastos (seta preta); B) imunomarcação para MMP-2: ausente; C) imunomarcação para MMP-9: ausente; e D) imunomarcação para MMP-8: ausente. (40x10x0,32x foto)

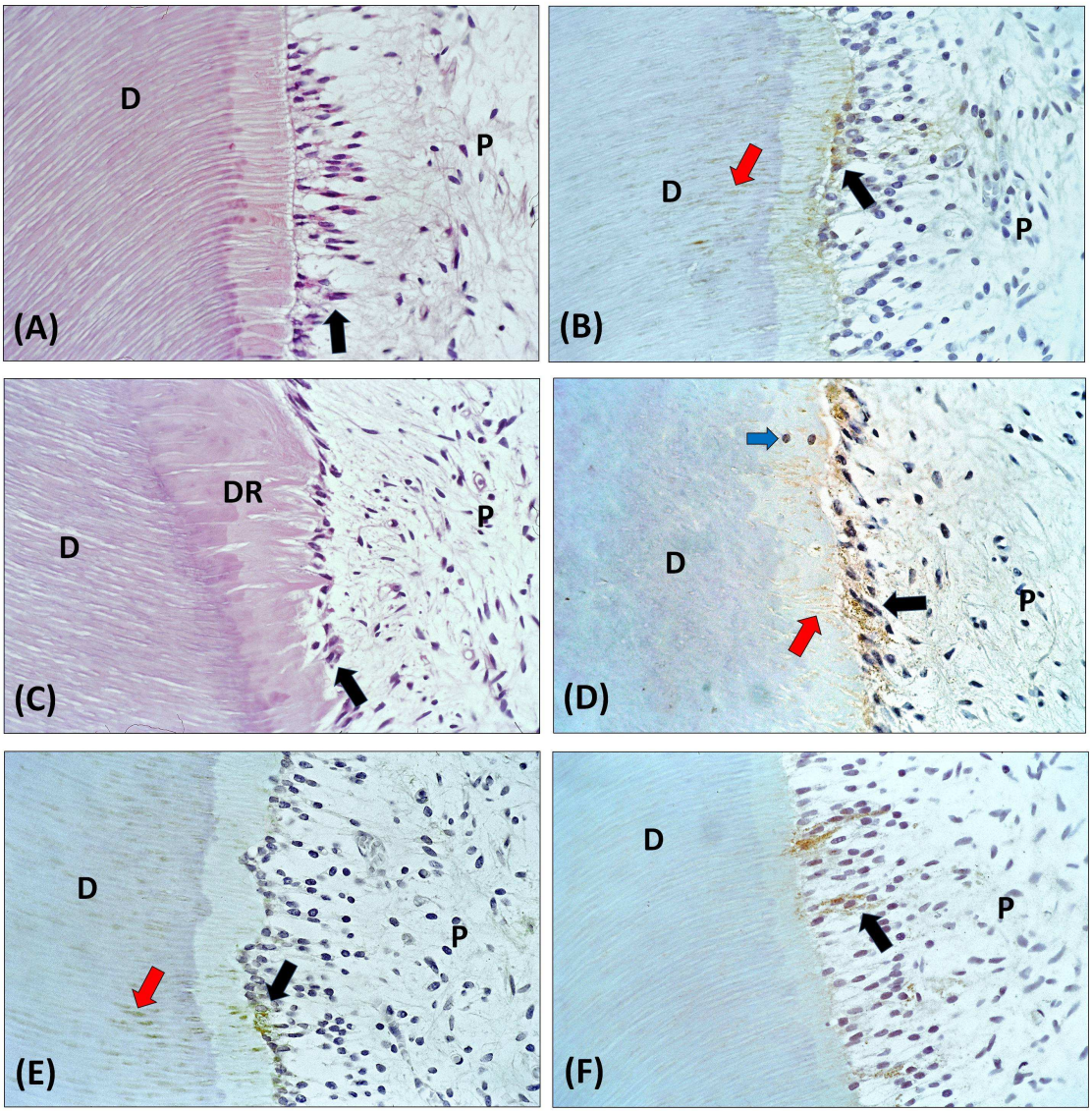


Figura 8 - Grupo Reversível – Região da camada odontoblástica próxima a região cariada. A) coloração pela HE: características similares ao do grupo controle com dentina (D) íntegra, os odontoblastos (seta) paralelalos entre si e dispostos "em paliçada" envolvendo toda a dentina (D) e a polpa (P) formada por conjuntivo frouxo, vascularizado, rico em fibroblastos e com delgadas fibras colágenas.; B) imunomarcação para MMP-2: expressão moderada em odontoblastos (seta), bem como no interior dos túbulos dentinários (seta vermelha) próximos a polpa; C) coloração pela HE: mostrando a dentina reacional (DR), a camada odontoblástica (seta) mais desorganizada em relação ao grupo controle; a polpa (P) formada por conjuntivo frouxo, vascularizado, rico em fibroblastos e com delgadas fibras colágenas**;** D) imunomarcação para MMP-2: expressão intensa em odontoblastos (seta preta) e leve no interior dos túbulos da dentina reacional (DR) (seta vermelha), que exibe núcleos de odontoblastos aprisionados (seta azul); E) imunomarcação para MMP-9: expressão ausente a leve em odontoblastos (seta) e também no interior dos túbulos dentinários (seta vermelha); e F) imunomarcação para MMP-8: expressão leve em odontoblastos (seta). (40x10x0,32x foto)

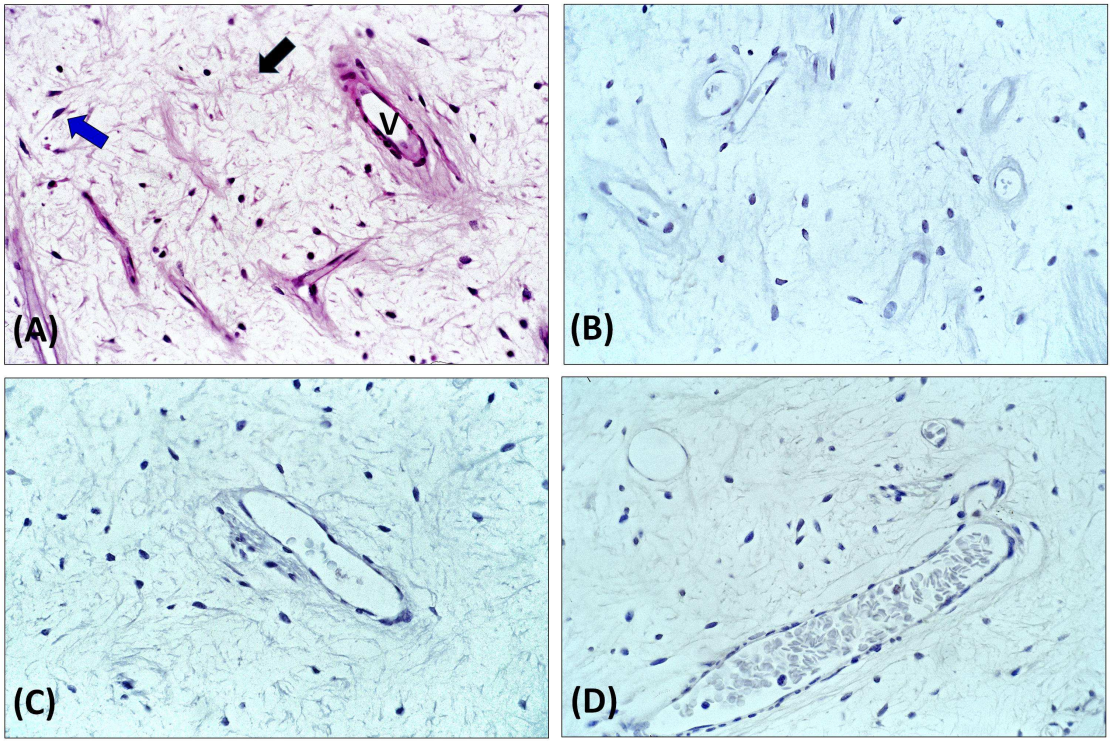


Figura 9 - Grupo Reversível – Região da Polpa Coronária: A) coloração pela HE: formada por tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos (V), fibras colágenas (seta azul) e fibroblastos (seta preta); B) imunomarcação para MMP-2: ausente; C) imunomarcação para MMP-9: ausente; e D) imunomarcação para MMP-8: ausente. (40x10x0,32x foto)

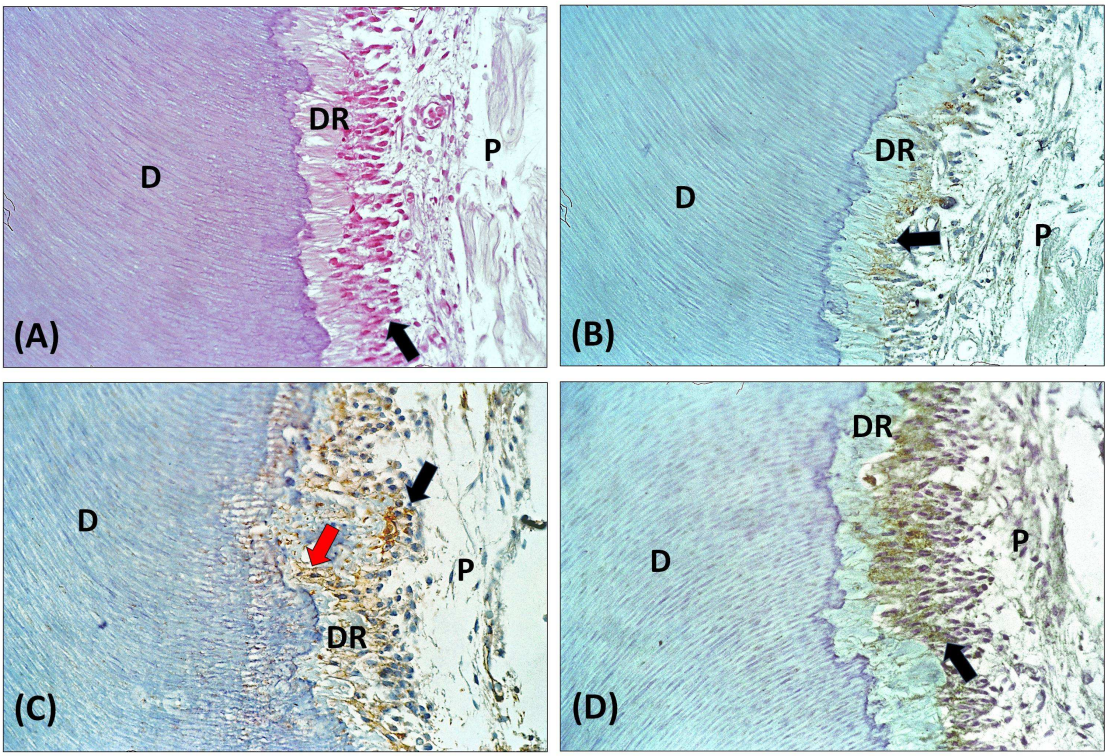


Figura 10 - Grupo Transição – Região da Camada Odontoblástica próxima à região cariada. A) coloração pela HE: mostrando a dentina reacional (DR), camada odontoblástica (seta) desorganizada e a polpa (P) periférica desorganizada; B) imunomarcação para MMP-2: moderada expressão em odontoblastos (seta); C) imunomarcação para MMP-9: intensa expressão em odontoblasto (seta) e também no interior dos túbulos da dentina reacional (DR) (seta vermelha); e D) imunomarcação para MMP-8: intensa expressão em odontoblastos (seta). (40x10x0,32x foto)

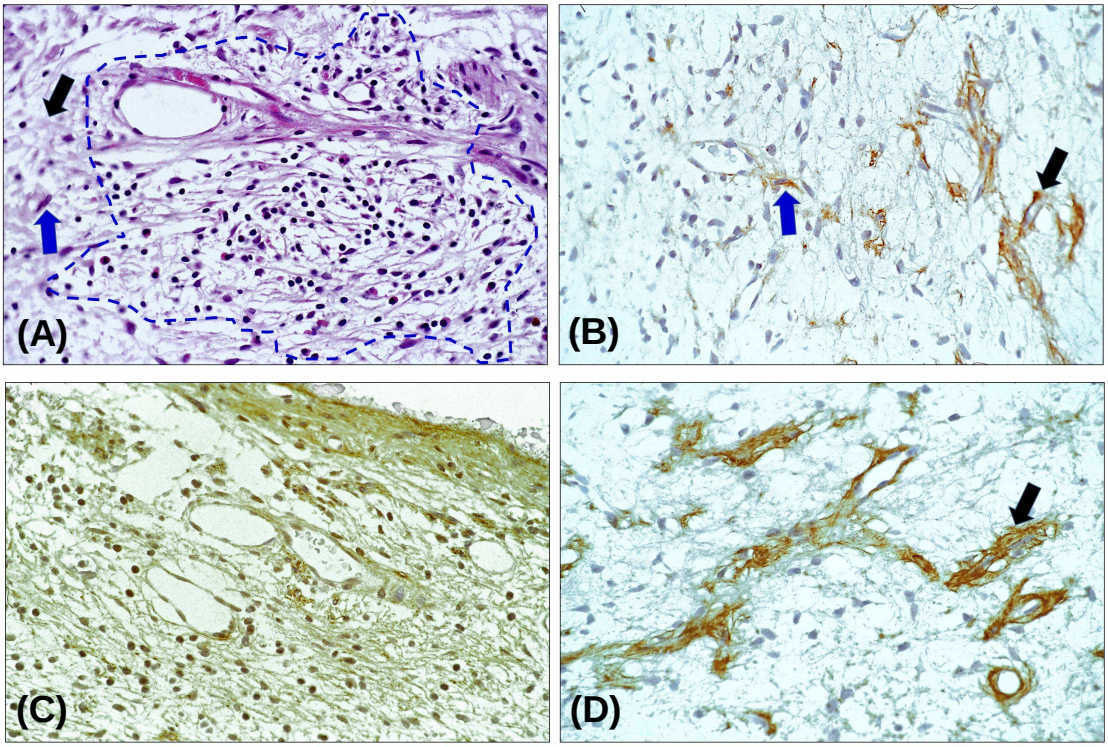


Figura 11 - Grupo Transição – região da polpa coronária: A) coloração pela HE: observar a região de infiltrado inflamatório (área pontilhada) próxima ao vaso sanguíneo (V), as fibras colágenas (seta preta) e os fibroblastos (seta azul); B) imunomarcação para MMP-2: expressão em células endoteliais (seta preta) e fibroblastos (seta azul), onde se observa expressão moderada desta enzima; C) imunomarcação para MMP-9: intensa expressão em áreas de infiltrado inflamatório; e D) imunomarcação para MMP-8: intensa expressão próximas aos vasos sanguíneos (seta preta). (40x10x0,32x foto)

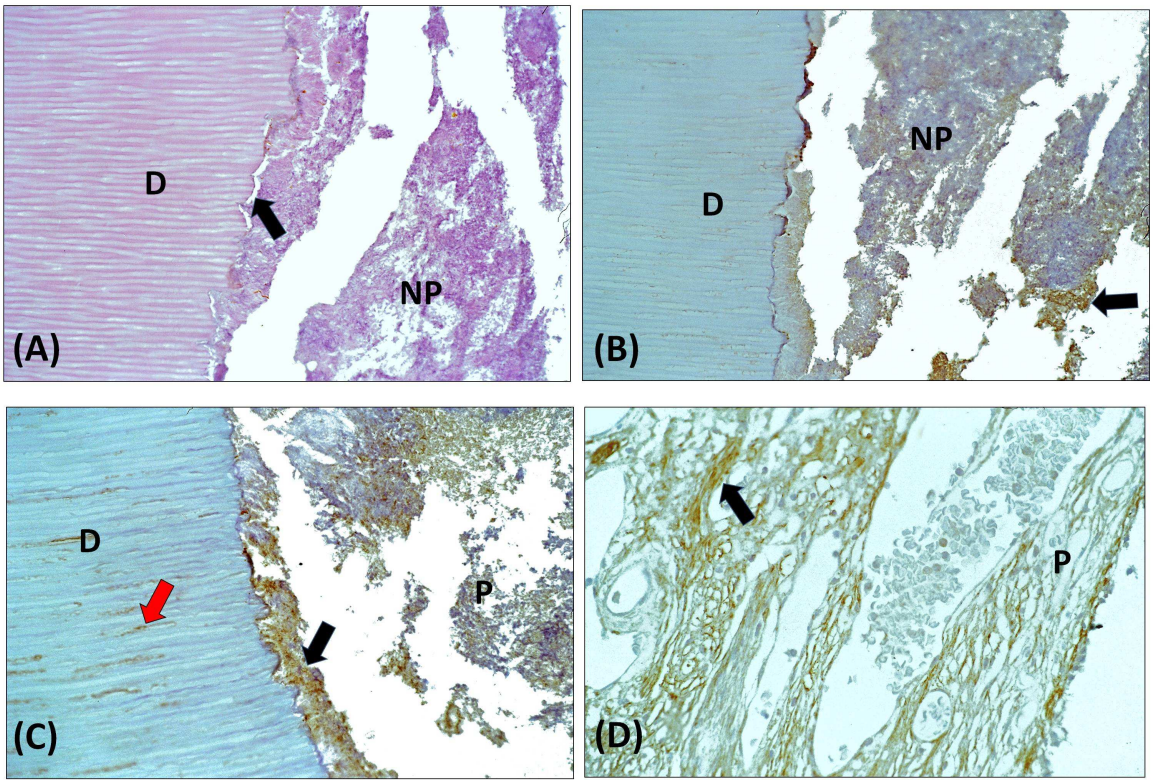


Figura 12 - Grupo Irreversível/Necrose – Região com exposição pulpar. A) coloração pela HE: mostrando a dentina (D) com reabsorção superficial, ausência da camada odontoblástica e a necrose pulpar (NP); B) imunomarcação para MMP-2: leve marcação (seta preta); C) imunomarcação para MMP-9: expressão moderada no interior dos túbulos dentinários (seta vermelha) e na superfície da dentina (seta preta); e D) imunomarcação para MMP-8: moderada apenas na polpa. (40x10x0,32x foto)

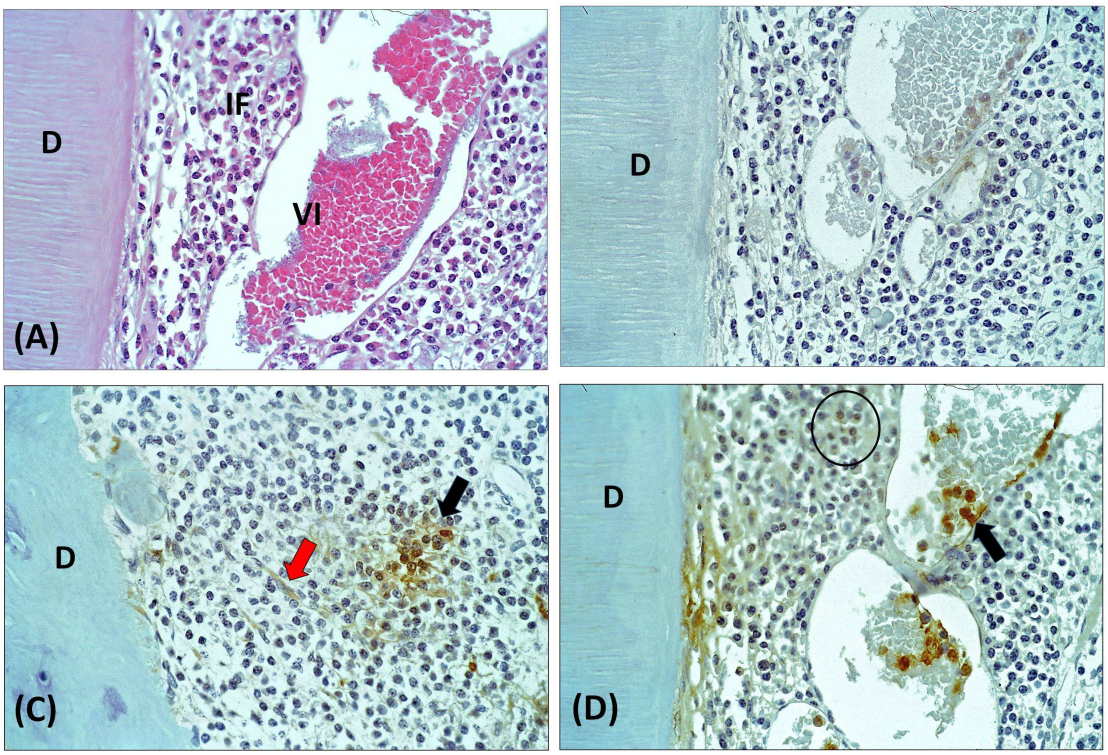


Figura 13 - Grupo Irreversível/Necrose – Região da polpa coronária, próxima à polpa radicular. A) coloração pela HE: mostrando a dentina (D), ausência da camada odontoblástica e o intenso infiltrado inflamatório (IF) rico em macrófagos, linfócitos e plasmócitos na polpa (P) ao redor do vaso híperêmico (VH); B) imunomarcação para MMP-2: ausente; C) imunomarcação para MMP-9: expressão em fibroblastos (seta vermelha) e células inflamatórias (seta preta); e D) imunomarcação para MMP-8: expressão em células inflamatórias, presentes no interior dos vasos (seta preta) e fora deles (círculo) (40x10x0,32x foto)

5.3 ESCORES OBTIDOS PARA CADA IMUNOMARCAÇÃO

Baseando-se na análise dos resultados estatísticos, dispostos na Tabela 3, verifica-se:

a) Com relação à expressão da **MMP-2**, o grupo Controle (GI) apresentou em todos os espécimes analisados expressão moderada na camada de odontoblastos e ausência de expressão na polpa. Os mesmos resultados foram repetidos no grupo Reversível (GII), para todos os espécimes. Para os espécimes representativos do GIII (Transição), a camada odontoblástica apresentou expressão leve a moderada e a polpa, expressão leve para todos os espécimes. No grupo de Irreversível/Necrose (GIV) os resultados mostram expressão leve a moderada de MMP-2 para os espécimes em que houve preservação da camada odontoblástica. Para os espécimes sem a camada odontoblástica, desaparecida devido à destruição tecidual, a expressão de MMP-2 foi considerada ausente. Na polpa, nesse mesmo grupo, a expressão de MMP-2 foi leve a moderada.

b) A marcação por imunohistoquímica da **MMP-9** manteve-se ausente para todos os espécimes analisados nos grupos Controle (GI) tanto na camada odontoblástica como na superfície da polpa. O grupo Reversível (GII) apresentou ausente a rara expressão na camada de odontoblastos e, na região central da polpa coronária, apurou-se ausência de expressão desta enzima, No grupo de Transição (GIII), observou-se expressão leve a moderada na camada odontoblástica, sendo esta mais evidente na polpa, onde pôde-se observar marcação entre moderada e intensa para os espécimes. No grupo Irreversível/Necrose (GIV), alguns espécimes não apresentaram preservação da camada de odontoblastos, considerando-se, para os mesmos, ausência de expressão desta enzima. Já os espécimes onde se manteve a camada odontoblástica, a expressão de MMP-9 foi leve a moderada. Na superfície da polpa, nota-se aumento da expressão de MMP-9, havendo igual porcentagem de espécimes com expressão moderada e intensa para a MMP-9.

c) A marcação para **MMP-8** seguiu o padrão de marcação homogênea observado para as enzimas anteriores em todos os espécimes dos grupos Controle (GI) e Reversível (GII), isto é, todos os espécimes representativos de ambos os grupos receberam o mesmo escore. Na camada odontoblástica, por exemplo, todos os espécimes apresentaram expressão leve para MMP-8. No que diz respeito à polpa, todos os espécimes destes dois grupos apresentaram ausência expressão de tal enzima. No grupo de Transição (GIII), uma maior heterogeneidade foi notada entre os espécimes, cuja marcação mostrou-se de moderada em três dos quatro espécimes representativos para a região da camada de odontoblastos. Na região mais central da polpa, notou-se espécimes com expressão leve, moderada e intensa, representando a diversidade de condições pulpares características deste grupo. A camada de odontoblastos do grupo Irreversível/Necrose (GIV) mostrou expressão moderada desta enzima, já que os escores dados como zero representam, na verdade, ausência da camada odontoblástica em detrimento da presença de grande destruição tecidual verificada. Para o interior da polpa, os espécimes mostraram, para MMP-8, uma marcação que variou de leve a moderada.

Tabela 3 - Apresentação dos escores, distribuídos em grupos, para a MMP-2, MMP-9 e MMP-8

	MMP-2		MMP-9		MMP-8	
	C Odontoblástica	Polpa	C Odontoblástica	Polpa	C Odontoblástica	Polpa
GI – Controle (N=7)	2	0	0	0	1	0
	2	0	0	0	1	0
	2	0	0	0	1	0
	2	0	0	0	1	0
	2	0	0	0	1	0
	2	0	0	0	1	0
	2	0	0	0	1	0
Médias (GI)	**2**	**0**	**0**	**0**	**1**	**0**
GII – Reversível (N=4)	2	0	0	0	1	0
	2	0	0,5	0	1	0
	2	0	0,5	0	1	0
	2	0	0	0	1	0
Médias (GII)	**2**	**0**	**0,25**	**0**	**1**	**0**
GIII – Transição (N=4)	2	1	2	2	2	1
	1	1	1,5	2	2	2
	1,5	1	2	2,5	1	2
	2	1	1	2	2	3
Médias (GIII)	**1,63**	**1**	**1,63**	**2,13**	**1,75**	**2**
GIV - Irreversível / Necrose (N=8)	0	1	0	3	2	2
	0	2	0	3	0	2
	1	1	1	2,5	2	2
	2	2	2	2	2	2
	1	2	1	3	2	2
	1,5	1	1	2	1	1
	0	1	0	3	0	2
	0	1	0	2	0	1
Médias (GIV)	**0,69**	**1,38**	**0,63**	**2,56**	**1,13**	1,75

0= Ausente
1= Leve
2= Moderado
3= Intenso

As comparações intergrupos e intragrupos (KrusKal Wallis, p<0,05) podem ser vistas, respectivamente, nas tabelas 4 e 5:

Tabela 4 - Comparação intergrupos – comparação entre os grupos dos resultados obtidos para MMP-2, MMP-9 e MMP-8 para as diferentes áreas analisadas (Camada Odontoblástica e Polpa), sendo p<0,05 (Kruskall Wallis)

	MMP-2		MMP-9		MMP-8	
	Camada Odontoblástica	Polpa	Camada Odontoblástica	Polpa	Camada Odontoblástica	Polpa
Grupo I	2 [a]	0 [a]	0 [a, c]	0 [a]	1 [a]	0 [a]
Grupo II	2 [a, c]	0 [a]	0,25 [a, d]	0 [a]	1 [a]	0 [a]
Grupo III	1,63 ± 0,48 [a, b, d]	1 [a, c]	1,63 ± 0,48 [d]	2,13 ± 0,25 [a b]	1,75 ± 0,50 [a]	2 ± 0,82 [b]
Grupo IV	0,69 ± 0,80 [b]	1,38 ± 0,52 [b, c]	0,63 ± 0,74 [b, c, d]	2,56 ± 0,50 [b]	1,13 ± 0,99 [a]	1,75 ± 0,46 [b, c]

* Letras diferentes indicam que houve diferença estatística significante entre os grupos comparados

Tabela 5 - Comparação intragrupos - comparação dos resultados obtidos para MMP-2, MMMP-9 e MMP-8 para um mesmo grupo nas diferentes áreas analisadas (Camada Odontoblástica e Polpa), sendo p<0,05 (Kruskall Wallis)

	Camada Odontoblástica			Polpa		
	MMP-2	MMP-9	MMP-8	MMP-2	MMP-9	MMP-8
Grupo I	2 [a]	0 [b]	1 [a, b]	0 [a]	0 [a]	0 [a]
Grupo II	2 [a]	0,25 [b]	1 [a, b]	0 [a]	0 [a]	0 [a]
Grupo III	1,63 ± 0,48 [a]	1,63 ± 0,48 [a]	1,75 ± 0,50 [a]	1 [a]	2,13 ± 0,25 [b, c]	2 ± 0,82 [a, c]
Grupo IV	0,69 ± 0,80 [a]	0,63 ± 0,74 [a]	1,13 ± 0,99 [a]	1,38 ± 0,52 [a]	2,56 ± 0,50 [b, c]	1,75 ± 0,46 [a, c]

* Letras diferentes indicam que houve diferença estatística significante entre os grupos comparados

A análise dos dados apresentados na Tabela 4, evidencia os seguintes resultados:

1- Expressão da **MMP-2:**

Na camada odontoblástica, não houve diferença estatística significante para os grupos Controle (GI), Reversível (GII) e Transição (GIII). O mesmo se observa quando se confronta estatisticamente os grupos Transição (GIII) e Irreversível/Necrose (GIV). Porém, diferença estatística é observada entre os grupos Controle (GI) e Irreversível/Necrose (GIV), sendo GI>GIV (p<0,01). O mesmo foi observado para a comparação entre Reversível (GII) e Irreversível/Necrose (GIV), com GII>GIV, p<0,05.

Para o corpo da polpa, também evidenciam-se diferenças estatísticas apenas entre os grupos Controle (GI) e Irreversível/Necrose (GIV), com GI>GIV, p<0,001 e entre Reversível (GII) e Irreversível/Necrose (GIV), observando-se que a maior expressão foi para GII, sendo p<0,01. As demais comparações intergrupos mostram, portanto, GI=GII=GIII e GIII=GIV**.**

2- Expressão de **MMP-9:**

A análise estatística dos dados obtidos por marcação imunohistoquímica revela, na camada odontoblástica, diferença estatísticamente significante entre os grupos Controle (GI) e Transição (GIII) - GIII>GI (p<0,01) - A comparação entre os demais grupos não revelou diferença estatística significante. Na polpa, algumas diferenças com relação à expressão desta enzima puderam ser notadas. Estatisticamente, diferenças foram relacionadas aos grupos Controle (GI) e Irreversível/Necrose (GIV), com GIV>GI e p<0,001 como também aos grupos Reversível (GII) e Irreversível/Necrose (GIV), com maior expressão de MMP-9 observada para GIV, com p<0,01.

3- Expressão de **MMP-8:**

A comparação entre os diferentes grupos da expressão desta enzima por odontoblastos não revelou diferença estatística entre todos os grupos, sendo, pois, GI=GII=GIII=GIV. No corpo da polpa, observou-se diferença estatística significante entre os seguintes grupos: Controle (GI) e Transição (GIII), com maior expressão para GIII e p<0,05; Controle (GI) e Irreversível/Necrose (GIV), sendo GIV>GII (p<0,01); Reversível GII) e Transição (GIII), com GIII>GII e p<0,05; e também entre os grupos Reversível (GII) e Irreversível/Necrose (GIV), onde GIV>GII (p<0,05). Os resultados da comparação entre GI (Controle) e GII (Reversível) assim como GIII (Transição) e GIV (Irreversível/Necrose), mostram-se estatisticamente semelhantes.

Pela comparação intragrupos, destacada na Tabela 5, procurou-se mostrar a diferença de marcação das MMP-2, MMP-9 e MMP-8 num mesmo grupo, com os seguintes resultados:

1- Controle (GI):

Neste grupo, na região da camada odontoblástica, pôde-se notar diferença estatística apenas entre expressão de MMP-2 e MMP-9 ($p<0,001$), sendo evidente a maior expressão de MMP-2 (Tabela 3). Por outro lado, a polpa apresentou escores iguais, indicativos de ausência de marcação, para todas as enzimas estudadas.

2- Reversível (GII):

A análise da expressão das distintas MMPs avaliadas, neste grupo, repetiu os resultados já relatados para o grupo Controle (GI), para ambas as regiões avaliadas: odontoblastos e região central pulpar.

3- Transição (GIII):

Neste grupo, região dos odontoblastos, a expressão de MMP-2, MMP-9 e MMP-8 não apresentaram diferença estatística significante. Já na polpa central, notou-se MMP-9>MMP-2 ($p<0,05$), mas MMP-2=MMP-8 e MMP-9=MMP-8.

4- Irreversível/Necrose (GIV):

Repetem-se os resultados relatados para o grupo Transição (GIII). Para camada odontoblástica, MMP-2=MMP-9=MMP-8. Para a região central da polpa, nota-se uma maior diferença estatística entre MMP-2 e MMP-9, sendo $p<0,01$. Porém, permanecem os resultados de MMP-2=MMP-9 e MMP-8=MMP-9, já descritos para o grupo anterior.

Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1 METODOLOGIA

6.1.1 Obtenção dos espécimes

Embora se saiba que a amostragem ideal deva seguir uma padronização quanto à idade, raça, sexo, entre outras variáveis, para a execução deste trabalho, tal procedimento foi inviável diante das dificuldades para obtenção de espécimes que atendessem às necessidades de cada grupo. Apesar da grande demanda por extrações dentárias em serviços ambulatoriais ainda hoje, o conhecimento e a aplicação de técnicas conservadoras da vitalidade pulpar e a própria educação dos pacientes têm levado à menor indicação clínica de exodontias. Esses aspectos dificultaram a obtenção de maior número de espécimes por grupo estudado, o que, de fato, reflete um aspecto positivo no contexto da atenção à saúde bucal brasileira. Apesar disso, considerou-se que o número de espécimes acumulados por grupo experimental foi suficiente para atingir os objetivos do presente trabalho.

6.1.2 Considerações sobre a técnica de imunomarcação

A análise IHC, que até alguns anos atrás era considerada um meio auxiliar de diagnóstico, com o advento da Medicina Molecular pode ser utilizada como método de diagnóstico autônomo (O' LEARY, 2001). Por este motivo, a padronização desta técnica torna-se crucial para obtenção de resultados confiáveis.

Os procedimentos para fixação do tecido e obtenção dos cortes histológicos constam de diversas etapas que podem ter consequências no resultado final da imunomarcação. Num primeiro momento é importante garantir a adequada fixação do tecido para permitir o exame morfológico através da preservação tecidual. Para

este trabalho, os dentes recém extraídos foram seccionados ligeiramente abaixo da junção amelo-cementária para facilitar a difusão da formalina neutra e, com isso, garantir a adequada fixação do tecido pulpar. Preferiu-se o emprego da formalina neutra porque o uso de uma solução não tamponada, a despeito de proporcionar adequada preservação tecidual, fixando o tecido através de cadeias cruzadas dos ácidos nucléicos, provoca um efeito secundário prejudicial à marcação. Esse efeito consiste da redução da reação IHC por uma modificação química do epítopo e pelo encadeamento cruzado promovido pelo formol em contato com o tecido, o que prejudica a propagação do anticorpo (ARBER, 2002; GRIZZLE, 2009; O' LEARY, 2201).

Notou-se ainda que própria técnica de IHC, por si só, levou a uma grande perda da amostra. A obtenção de espécimes que continham tecido duro (dentina) e tecido mole (polpa) levou ao descolamento de um número significativo de espécimes, a despeito da utilização de lâminas silanizadas, conforme orienta o protocolo para imunocoloração. Na tentativa de minimizar este problema, além do manejo cauteloso das lâminas durante todo o procedimento de imunomarcação, um período mínimo de 7 dias foi obedecido entre o corte do bloco de parafina e reação IHC propriamente dita.

Vários métodos foram desenvolvidos para acessar a quantidade das formas ativa e inativa (zimogênio) de enzimas proteolíticas provenientes dos tecidos, fluidos biológicos e de purificações (HANNAS, 2007). Para a realização deste estudo, utilizaram-se anticorpos anti-MMP-2, MMP-9 e MMP-8, com especificidade para as formas pro e ativa dessas enzimas. Métodos como a zimografia, uma técnica de eletroforese que fornece informação qualitativa e semi-quantitativa (SNOEK-VAN BEURDEN, VON DEN HOFF, 2005), mostra a atividade enzimática através da identificação do peso molecular. Uma vez que as formas das metaloproteinases ativas e inativas apresentam peso molecular distintos, pode-se verificar se uma determinada banda corresponde à forma ativa ou inativa de uma MMP, diferentemente da IHC, que marca tanto formas ativas como inativas, sem conseguir estabelecer diferenciação entre elas.A IHC, porém, permite a observação a localização da célula responsável pela expressão enzimática. Sendo assim, o ideal é estabelecer a correlação destas duas metodologias, reforçando assim a

credibilidade da detecção da atividade enzimática por zimografia com a imunocoloração (IKEBE et al, 1999).

O presente trabalho optou apenas pela execução dos procedimentos de IHC em razão das dificuldades já mencionadas para a aquisição de espécimes bem como por já existirem na literatura trabalhos que oportunamente evidenciaram, através de distintas metodologias, o envolvimento de diversas MMPs na inflamação pulpar (TSAI et al., 2005; GUSMAN, SANTANA, ZEHNDER, 2002; SHIN et al., 2002)

6.2 RESULTADOS

Para a melhor compreensão dos resultados evidenciados neste estudo, a expressão das MMPs estudadas nas distintas condições da polpa bem como a correlação destes com os resultados clínicos e histológicos obtidos em estudo prévio (HERMOZA-NOVOA, 2005), os resultados serão divididos em itens.

6.2.1 Expressão de MMP-2

Por se tratar de uma enzima dita constitutiva, produzida por células estruturais como fibroblastos, células endoteliais e epiteliais (CORBEL et al., 2002) e amplamente distribuída em dentina coronária e radicular (SANTOS et al., 2009), observou-se que nos grupos em que o processo de inflamação é ausente (GI – Controle), ou muito incipiente (GII – Reversível), a expressão moderada por odontoblastos mas ausência de marcação no tecido pulpar propriamente dito. Especula-se que uma maior expressão poderia ser esperada nesta região se estivesse presente algum processo de reparação tecidual, já que a expressão de MMP-2, já que esta enzima está envolvida na organização da formação de matriz pré mineralizada bem como em sua subsequente mineralização (FANCHON et al., 2004). A Figura 8B, representativa do grupo Reversível (GII) mostra uma situação em que se tem expressão moderada de MMP-2 pontualmente à área de dentina

reacional em resposta á carie, sustentando hipótese de que esta enzima na formação da matriz pré mineralizada da dentina bem como com a subsequente mineralização (BOUSHELL et al., 2008).

Esses resultados coincidem com os evidenciados em trabalho prévio (GUSMAN, SANTANA, ZEHNDER, 2002) que, avaliando os níveis e atividade gelatinolítica das MMP-2 e MMP-9 em polpa humana saudável e inflamada, observaram que a MMP-2 foi encontrada em níveis mais altos em polpa saudável, comparativamente à inflamada. O trabalho de Shin e colaboradores (SHIN et al., 2002) confirma os resultados do presente experimento visto que, ao avaliar os níveis de MMP-1, MMP-2 e MMP-3 em polpa e lesões periapicais, demonstrou que a imunoreatividade de MMP-1 e MMP-3 foi mais forte e mais freqüente que a de MMP-2, enzima esta fracamente expressa em células inflamatórias e fibroblastos de todos seus grupos experimentais.

No grupo de Transição, representado por espécimes contendo áreas de camada odontoblástica desorganizada (Figura 10), de infiltrado inflamatório periférico aos vasos sanguíneos (Figura 11) a expressão de MMP-2 moderada a leve, resultados esses que podem ser consequência da própria formação deste grupo, que contém espécimes que exprimem maior grau de comprometimento inflamatório da polpa como também aqueles que apresentam características histológicas mais próximas da reversibilidade pulpar.

6.2.2 Expressão de MMP-9

Apesar de MMP-2 e MMP-9 serem enzimas que atuam num mesmo substrato, o colágeno tipo IV, sua origem celular é diferente e o entendimento disso pode contribuir para a melhor compreensão dos resultados obtidos neste trabalho.

De acordo com os resultados do presente estudo, observou-se clara correlação da enzima MMP-9 com o estado de degradação do tecido pulpar durante o processo inflamatório. Dados (Tabelas 3 e 4) evidenciam um significativo aumento do padrão de expressão desta enzima justamente nos grupos em que se tem tecido

pulpar mostrando infiltrado inflamatório (Figuras 10C, 11C, 12C e 13C), onde estão em abundância células pró-inflamatórias secretoras de MMP-9.

A ausência de diferença estatística entre os grupos GI/GIV e GII/GIV, para a expressão de MMP-9 pelos odontoblastos, embora num primeiro momento possa parecer duvidoso, justifica-se pela inexistência de uma camada odontoblástica organizada em alguns espécimes (Figuras 12A e 12C), para os quais, por decisão metodológica, foi atribuído escore zero. Igual dúvida pode existir quando se comparam os resultados de GII (Reversível) e GIII (Transição), já que a análise dos dados, expostos na Tabela 3, numericamente, sugere existência de diferenças entre os dois grupos. No entanto, se compreendermos que o grupo Transição é o que apresenta maior disparidade com relação ao estágio histopatológico dos espécimes, segundo evidenciado por Hermoza-Novoa, 2005, fica fácil entender que este grupo pode possuir tanto espécimes com características histológicas quanto ao envolvimento pulpar da fase reversibilidade como de irreversiblidade. A figura que se refere à fase de Transição, retirada do trabalho de Hermoza-Novoa, com o qual o presente estudo foi feito conjuntamente, evidencia bem o fato então relatado (Anexo E).

Já a constatação de que GIII=GIV não causa incertezas, já que trabalhos anteriores (GUSMAN, SANTANA, ZEHNDER, 2002; SHIN et al., 2002; TSAI, 2005), oferecem suporte aos resultados obtidos neste estudo.

Os resultados deste trabalho evidenciaram, portanto, a atuação desta enzima no colapso tecidual da polpa inflamada, reforçando os resultados apresentados em outros trabalhos (CORBEL et al., 2002; COROTTI et al., 2009, GUSMAN SANTANA, SANTOS et al., 2004; SHIN et al., 2002; ZEHNDER, 2002; TSAI et al., 2005), que também confirmam a importante participação da MMP-9 em processos inflamatórios.

Quando se analisam os resultados apresentados por células da camada central da polpa, notam-se algumas diferenças no que tange à expressão da MMP-9 por odontoblastos. Salienta-se, nesse momento, que a camada odontoblástica, por estar na periferia da polpa e justaposta à dentina, representa o primeiro grupo de células a sofrer alterações decorrentes de injúrias externas, especialmente a progressão das lesões cariosas em dentina. Em tais circunstâncias, a camada odontoblástica rapidamente se desorganiza ou se degrada, na dependência da natureza, tempo de ação e agressividade do estímulo.

Quanto à expressão de MMP-9 em células da região central da polpa, observou-se que GI=GII, GI=GIII, GII=GIII e GIII=GIV. A situação GI=GII está bem ilustrada pelas figuras 2C e 4C, que representam, respectivamente, os grupos Controle e Reversível, mostrando ausência de imunomarcação para MMP-9 na polpa coronária. A semelhança estatística de resultados entre GI/GII é facilmente explicada, uma vez que receberam escores iguais para todos os espécimes. De fato, o grau de envolvimento pulpar entre esses dois grupos é, em muitos casos, bastante semelhante. Como se constata dos resultados de Hermoza-Novoa, 2005, (Anexo E) 50% dos casos considerados clinicamente em fase de reversibilidade, isto é, com ligeiro envolvimento pulpar foram, na verdade evidenciadas características de normalidade (igual ao grupo controle) ao exame histopatológico.

Para a semelhança estatística constatada entre GI/GIII e GII/GIII, justifica-se o fato de que esta condição pode coincidir com as próprias características desse grupo experimental (GIII), o qual contém tanto espécimes com inflamação mais severa, que caminha para a irreversibilidade, como outros com processo inflamatório mais leve, que caminha para a reversibilidade. Esta condição de dualidade também é notada quando se comparam os diagnósticos clínicos e histopatológicos. Os resultados apresentados por Hermoza-Novoa, em 2005 cujo material histológico é a base comparativa da presente investigação, mostraram que o percentual de coincidência entre esses dois tipos de diagnóstico se reduz drasticamente nos estágios intermediários de envolvimento pulpar, isto é, no estágio de transição. Nesse estágio, o percentual de coincidência entre a observação clínica e a histológica foi de, apenas, 16%.

A ausência de diferenças estatisticamente relevantes entre os grupos Transição e Irreversível/Necrose pode ser demonstrada pela semelhança do infiltrado inflamatório nos espécimes desses dois grupos (Figuras 6A e 8A), já que, histologicamente em ambos os grupos pode-se visualizar tecido pulpar povoado por células reconhecidamente precursoras de MMP-9. Na presença de intenso infiltrado inflamatório, característicos dos GIII e GIV, estes denotaram expressões acentuadas e estatisticamente semelhantes de MMP-9 (Tabela 3).

Avaliando-se ainda o padrão de expressão de MMP-9 por células da região central da polpa, os dados revelam que GIV>GI ($p<0,001$) e GIV>GII ($p<0,01$). Comparando-se os padrões de expressão dessa enzima, ilustrados nas figuras 6C

(GI), 7C (GII) e 8C (GIV), fica clara a distinta expressão para esta enzima, numericamente evidenciadas na Tabela 3. Sendo esta enzima secretada principalmente por células pró-inflamatórias, torna-se simples a compreensão dos distintos padrões de expressão da MMP-9 apresentados quando se correlaciona GI/GIV e GII/GIV, tendo em vista a presença de intenso infiltrado inflamatório no espécime corado por HE, representativo do grupo Irreversível/Necrose (Figura 13A) e completa ausência de população celular pró-inflamatória nos espécimes representativos de GI e GII, dispostos, respectivamente, nas figuras 7A e 9A.

6.2.3 Expressão de MMP-8

A MMP-8, também denominada colagenase neutrofílica humana ou colagenase de neutrófilos é a colagenase mais efetiva na hidrólise do colágeno tipo I (POLASSARI et al., 2000). Apesar de serem enzimas comprovadamente expressas por células polimorfonucleares (PMN), presentes em abundância em tecidos inflamados (LIN et al, 2008; POLASSARI et al, 2000), estas enzimas são também importantes para o processo de reparação tecidual, que ocorre em condições fisiológicas. Portanto, em situações de normalidade, a natureza estabelece o perfeito equilíbrio entre os compostos moleculares ativos e inativos, regendo tanto os processos formadores como os de degradação e reparo teciduais (HANNAS, 2007).

A síntese de várias MMPs por odontoblastos de dentes humanos totalmente formados como as gelatinases (MMP-2 e -9), a colagenase neutrofílica (MMP-8) já foi elucidada por diversos trabalhos anteriores (POLASSARI et al, 2000; TJADERHANE et al., 2001) e os resultados obtidos neste trabalho de pesquisa evidenciam uma expressão leve a moderada de MMP-8 por odontoblastos para todos os grupos estudados (GI=GII=GIII=GIV), em acordo com dados da literatura científica atual. Como se sabe, os odontoblastos são fundamentais ao *turnover* celular do compelxo dentinopulpar, tanto em condições fisiológicas como em patológicas e, por ser assim, os resultados demonstrados neste trabalho sugerem que a MMP-8, conhecidamente expressa por odontoblastos, tem papel importante na remodelação tecidual do complexo dentinopulpar, ratificando ainda os resultados

obtidos por Dayan e colaboradores, que mostraram a presença da forma latente de colagenases em matriz dentinária humana em condições fisiológicas (DAYAN et al, 1983) e Sulkala e pesquisadores, que encontraram esta enzima em fragmentos de dentina mineralizada (SULKALA et al., 2007).

Porém, a análise do padrão de expressão desta enzima nos distintos grupos avaliados, por células dispostas na região central da polpa, mostra resultados estatisticamente diferentes daqueles vistos na camada odontoblástica. Observou-se, para tanto, que não houve diferença estatística entre os grupos Controle (GI) e Reversível (GII), para os quais foi notada uma expressão homogênea, escore 1 (leve), para todos os espécimes de ambos os grupos. A comparação dos valores obtidos para os grupos Transição (GIII) e Irreversível/Necrose (GIV), nos quais se evidencia a presença de intenso infiltrado inflamatório na região central da polpa (Figuras 11D e 13D), mostra semelhança estatística entre ambos, consolidando as informações da literatura de que a MMP-8 é produzida por células PMN, como enfatizado anteriormente. A literatura esclarece ainda que neutrófilos são essenciais para a depuração de microorganismos patogênicos (LIN et al., 2008) e que toda resposta pulpar às bactérias e seus metabólitos incluem o afluxo e recrutamento de PMN e monócitos/macrófagos (WAHLGREN et al. 2002), o que corrobora esses resultados.

Diferença estatística significante foi encontrada entre os escores dos grupos Controle e Transição (GIII>GI, $p<0,05$), Controle e Irreversível/Necrose (GIV>GI, $p<0,01$), Reversível e Transição (GIII>GII, $p<0,05$) e Reversível e Irreversível/Necrose (GIV>GII, $p<0,05$). A compreensão de tais resultados é claramente compreensível já que esses demonstram que para os grupos onde não se nota infiltrado inflamatório nessa região da polpa, grupos I e II (figuras 2A e 4A), a expressão de MMP-8 é evidentemente ausente (figuras 7D e 9D) e, para os grupos Transição (GIII) e Irreversível/Necrose (GIV), nos quais os cortes corados em HE revelam presença de quadro inflamatório pulpar bastante intenso (Figuras 11A e 13A), as células PMN aí presentes mostram marcação para a MMP-8. Por ser assim, parece ser evidente a participação desta enzima na degradação do tecido pulpar, justificando sua maior expressão nos grupos onde se observa um colapso tecidual mais acentuado e rico em células pró-inflamatórias. Ao contrário, para a camada odontoblástica, onde PMNs, macrófagos não são evidenciados, especula-se que a

homogeneidade de expressão desta enzima seja pela característica dos próprios odontoblastos em serem a primeira linhagem celular a se comprometer com defesa do complexo dentinopulpar quando se instala qualquer condição patológica. Porém, fica clara a diferença de expressão da MMP-8 entre camada odontoblástica e região pulpar com presença de infiltrado inflamatório, confirmando assim a grande produção deste endopeptídeo por neutrófilos, justificando, dessa forma, sua nomenclatura “colagenase neutrofílica”.

6.2.4 Expressão diferencial da MMP-2, MMP-9 e MMP-8 nos diferentes estágios de inflamação da polpa

Através desse estudo, foi possível a observação da expressão diferencial das enzimas estudadas nos diferentes grupos. Constatou-se, por exemplo, que, no grupo Controle (GI), região da camada de odontoblastos, diferença estatística significante foi encontrada apenas entre a expressão das gelatinases (MMP-2>MMP-9, $p<0,001$), conforme mostra a Tabela 5. Talvez a diferença quanto ao à origem dessas enzimas possa auxiliar no entendimento dos resultados aqui mencionados, já que uma expressão moderada de MMP-2 foi descrita e, para a MMP-9, cuja expressão não foi detectada na camada de odontoblastos, sendo que esta última parece ser mais intensamente expressada em condições em que se tem povoação tecidual por células inflamatórias, segundo relata a literatura (GUSMAN, SANTANA, ZEHNDER, 2002).

A expressão sem diferença estatisticamente relevante entre MMP-2 e MMP-8 bem como MMP-9 e MMP-8 pôde ser observada, o que se justifica pela atuação dessas enzimas em condições fisiológicas, atuando constitutivamente (BOURD-BOITTIN et al., 2005; BOUSHELL et al., 2008; MALLA et al., 2008; SATOYOSHI et al., 2001; SULKALA et al., 2007).

Já na superfície central da polpa, ainda no grupo Controle, a ausência de diferença estatística para essas três enzimas, todas com expressão ausente (escore=0), pode ser correlacionada à produção equilibrada destas enzimas em situações fisiológicas. Vários estudos são claros quando relatam que as MMPs têm

papel importante na remodelação tecidual da MEC em condições de normalidade (HANNAS et al., 2007; NAGASE, WOESSNER Jr, 1999; SORSA, TJÄDERHANE, SALO, 2004; VU, WERB, 2009; VISSE, NAGASE, 2003), ratificando, pois os resultados obtidos nessa pesquisa.

O grupo Reversível (GII), cujo padrão de expressão dessas mesmas MMPs se assemelha aos apresentados por GI, está condizente aos resultados encontrados por Hermoza-Novoa, 2005, que, ao analisar o percentual de coincidência entre os resultados clínicos e histopatológicos, observou que, entre os espécimes clinicamente agrupados histologicamente como Reversíveis, mostraram que 50% dos cortes exibiam características de tecido pulpar saudável, com polpa bastante volumosa, odontoblastos dispostos em paralelo e, para os outros 50%, o quadro histológico mostrava redução do volume da polpa coronária devido à presença de grande quantidade de dentina terciária, principalmente no corno pulpar, com odontoblastos recobrindo a sua superfície e a polpa coronária similar ao grupo I sem sinais de processo inflamatório, denotando grande similaridade tecidual de acordo com os resultados histológicos.

Nos espécimes histologicamente agrupados como Transição, modificações teciduais são evidentes quando comparados com espécimes representativos dos grupos Controle e Reversível. A figura 10A, por exemplo, mostra a presença de desorganização tecidual na camada odontoblástica e polpa periférica, sendo que esta mesma desestruturação do tecido pulpar pode ser vista, agora em maior evidência, na figura 7A, que ilustra a situação de irreversibilidade/necrose em corte corado por HE. Para ambos os grupos (Transição e Irreversível/Necrose), não houve diferença estatística entre o padrão de expressão para MMP-2, MMP-9 e MMP-8. Como elucidado anteriormente, a camada odontoblástica é a primeira a sofrer os efeitos nocivos da instalação do processo de cárie na estrutura dental e, por ser assim, a que antes sucumbe com os efeitos causados pelos produtos bacterianos substancias outras como as MMPs, comprovadamente envolvidas no desenvolvimento da cárie. Há evidências de que as MMPs presentes na matriz dentinária (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; SULKALA et al., 2004) ou na saliva (INGMAN et al., 1994a) sejam responsáveis pela degradação da dentina cariada, sendo que a ativação de MMP-2, MMP-8 e MMP-9 desempenha um papel crucial na degradação do colágeno das lesões cariosas (HANNAS, 2007;

TJADERHANE et al., 1998), o que pode contribuir para a compreensão de semelhante padrão de expressão destas enzimas nestes dois grupos (Transição e Irreversível/Necrose), onde se tem processo carioso em situação avançada, com comprometimento evidente da camada de odontoblastos.

Para esses mesmos grupos, agora na região central da polpa coronária, distintos resultados foram obtidos. Constatou-se diferença estatística entre os valores de expressão das gelatinases, sendo agora MMP-9>MMP-2 para ambos os grupos, sendo $p<0,05$ em GIII (Transição) e $p<0,01$ em GIV (Irreversível/Necrose) e valores de escores semelhantes estatisticamente para MMP-2 e MMP-8 bem como MMP-9 e MMP-8.

6.2.5 Correlação entre o diagnóstico histológico e a expressão de MMP-2, MMP-9 e MMP-8

Os resultados de Hermoza-Novoa, 2005, no que diz respeito à coincidência entre os resultados clínicos e histopatológicos da polpa mostram que a maior dificuldade está no diagnóstico clínico da polpa nos estágios de transição e irreversibilidade, onde encontram-se as maiores disparidades entre diagnósticos clínico e histológico (Anexo D). Do mesmo modo, presente trabalho, evidenciou maiores graus de expressão de MMP-2, MMP-9 e MMP-8 nos espécimes agrupados em GIII (Transição), tanto por odontoblastos como por demais células da polpa. Torna-se clara, portanto, a importância dessas enzimas para o reparo e/ou destruição tecidual, já que espécimes representativos deste grupo podem sucumbir a um tratamento conservador da polpa como apresentar resultados positivos ao mesmo, dependendo das interações moleculares, certamente relacionadas ao potencial de reparo tecidual.

Para polpa normal ou reversível, que apresentam elevado grau de coincidência quanto aos diagnósticos clínico e histopatológico (HERMOZA-NOVOA, 2005), nota-se maior padrão de expressão para a MMP-2, enzima constitutiva, mais correlacionada à formação da dentina e processos de reparo tecidual (BOUSHELL et al., 2008; SANTOS et al., 2009). A maior fidelidade aos meios de diagnóstico

clínico para ambos os grupos pode ainda refletir a melhor condição tecidual da polpa, que exibe ainda rara a moderada expressão de enzimas mais relacionadas à inflamação, como são MMP-8 e MMP-9 (WAHLGREN et al., 2002; GUSMAN, SANTANA, ZEHNDER, 2002).

Os eventos moleculares que ocorrem para polpas histologicamente irreversíveis/necrose, que apresentam grande coincidência entre diagnóstico clínico e histológico (Anexo D) confirmam a participação de MMP-8 e MMP-9 em áreas de infiltrado inflamatório, ratificando a informação de que a quantidade de MMP-8 também indica presença de inflamação, por ser esta enzima um modulador da resposta do hospedeiro (SORSA et al., 2004, HANNAS et al., 2007).

Conclusões

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir:

1- O padrão de expressão das MMP-2, MMP-9 e MMP-8 sofre alteração nos diferentes estágios da polpa humana: normal, reversível, transição, irreversível/necrose, contrariando a primeira hipótese nula.

Considerando-se um mesmo grupo experimental, foram encontradas diferenças na expressão de MMP-2, -9 e MMP-8, rejeitando-se, pois a segunda hipótese nula deste estudo.

Os resultados ainda permitem as seguintes conclusões:

1- As MMP-2, MMP-9 e MMP-8 foram expressas de maneira distinta nos na região dos odontoblastos e demais células do corpo pulpar;

2- A MMP-2 foi expressa em maior intensidade na polpa sadia (Controle) e na polpa em estágio de reversibilidade (GII);

3- A maior expressão de MMP-9 ocorreu na presença de inflamação pulpar (GIII e GIV);

4- Em polpas em que se evidencia processo inflamatório intenso, a expressão de MMP-8 foi maior em comparação com polpas com tecido normal.

Referências

REFERÊNCIAS

Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. J Biol Chem. 1995; 270(11):5872-6..

Araújo VC, et al. Aspectos clínicos e histopatológicos de 103 polpas dentais humanas. Rev Paul Endodon. 1981 ; 2(3) :53-6.

Arber DA. Effect of prolonged formalin fixation on the immunohistochemical reactivity of breast markers. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2002 ; 10(2) :183-6.

Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. Am J Respir Cell Mol Biol. 2003;28(1):12-24.

Ausburger R A, Peters D D. In vitro effects of ice, skin refrigerant, and CO2 snow on intrapulpal temperature. J Endodon. 1981; 7(3):110-6.

Bartlett JD, Beniash E, Lee DH, Smith CE. Decreased mineral content in MMP-20 null mouse enamel is prominent during the maturation stage. J Dent Res. 2004;83(12):909-13.

Bartlett DW, Shah P. A critical review of non-carious cervical (wear) lesions and the role of abfraction, erosion, and abrasion. J Dent Res. 2006;85(4):306-12.

Baume LJ. Diagnosis of disease of the pulp. 1970;29(1):102 -16.

Bhaskar S N. Histologia e embriologia oral de Orban. 1989. 10ed. São Paulo, Artes Médicas.

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

Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. Curr Opin Cell Biol. 1995;7(5):728-35.

Björklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. Biochem Biophys Acta. 2005;1755(1):37-69.

Bourd-Boittin K, Fridman R, Fanchon S, Septier D, Goldberg M, Menashi S. Matrix metalloproteinase inhibition impairs the processing, formation and mineralization of dental tissues during mouse molar development. Exp Cell Res. 2005;304(2):493-505.

Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Bagmell R, Yamauchi M. Immunohistochemical localization of matrixmetalloproteinase-2 in human coronal dentin. Arch Oral Boil. 2008;53:109-116.

Bramante C M. Resolução das dores pulpares. In: Todescan F F. Atualização na clínica odontológica. 1996 São Paulo, Artes Médicas.

Byers MR, Närhi MV. Dental injury models: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. Crit Rev Oral Biol Med. 1999; 10(1):4-39.

Caterina JJ, Skobe Z, Shi J, Ding Y, Simmer JP, Birkedal-Hansen H, et al. Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. J Biol Chem. 2002;277(51):49598-604.

Chakrabarti S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. Exp Lung Res. 2005;31(6):599-621.

Chang YC; Yang SF, Hsieh, YS. Regulation of matrix metalloproteinase-2 production by cytikines and pharmacological agents in human pulp cell cultures. 2001; 27(2):679-82.

Corbel M, Belleguic C, Boichot E, Lagente V. Involvement of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in the development of airway inflammation and pulmonary fibrosis. Cell Biol Toxicol. 2002;18:51-61.

Consolaro A. Cárie dentária: histopatologia e correlações clínico-radiográficas. 1996. Bauru, Ed. Consolaro.

Consolaro A. Alterações pulpares – correlações clínico-radiográficas e microscópicas. In: Leonardo MR, Leal, JM. Endodontia – tratamento de canais radiculares. 3rd ed. São Paulo: Ed Médica Panamericana. 1998. p.41-61.

Cooley RL, Colonel L, Robinson SF. Variables associated with electric pulp testing. Oral Surg. 1980;50(1):66-73.

Corotti MV, Zambuzzi WF, Paiva KBS, Menezes R, Pinto LC, Lara VL et al. Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development. Arch Oral Biol. 2009;54:764-771.

Creemers LA, Jansen IDC, Dochert AJP, Reynolds JJ, Beertsen W, Everts V. Gelatinase A (MMP-2) and cysteine proteinases are essential for degradation of collagen in soft connective tissues.

Dayan D, Binderman I, Mechanic GL. A preliminary study of activation of collagenase in carious human dentine matrix. Arch Oral Biol. 1983;28(2):185-87.

De Deus QD. Endodontia. 1992. 5ed. Rio de Janeiro, Medici.

Ejeil AL, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Godeau G, Gogly B. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva. J Periodontol. 2003;74(2):188-95.

Estrela C. Ciência Endodontica. 2004. 1ed. São Paulo, Artes Médicas.

Fanchon et al. Involviment of matrix metalloproteinases in the onset of dentin mineralization. Eur J Oral Sci 2004; 112:171-6.

Garfunkel A, Sela J, Ulmanski M. Dental pulp pathosis: clinicopathologic correlations based on 109 cases. Oral Surg. 1973;35(1):110-7.

Grizzle, W. Special symposium: fixation and tissue processing models. Biotech. Histochem. 2009. Jun 22:1-9. [Epub ahead of print]

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;110(5):353-7.

Habn CL, Liewebr FR. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. J Endod. 2007;33(7):773-81.

Hannas AR. Determinação da expressão de MMP-2 e MMP-9 na saliva de pacientes portadores de lesões cervicais não cariosas e da influência das MMPs sobre lesões radiculares artificiais através de EDX [tese]. Bauru(SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru; 2007.

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

Hargreaves KM, Goodis HE. Seltzer and Bender´s Dental Pulp. 1. Chicago, Quintessence Publishing, 2002. 500 p.

Herbert W E. A correlation of the clinical signs and symptoms and histological condition of the pulps of 52 teeth. Brit Dent J. 1946;78(6):161-74.

Hermoza-Novoa, MM. Análise comparativa da sintomatologia clínica do dente e a histopatologia do tecido pulpar [dissertação]. Bauru(SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru; 2005.

Huang GTJ, Potent AP, Kim JW, Chugal N, Zhang X. Increased interleukin-8 expression in inflammed human dental pulps. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1999;88(2):214-20.

Hyman JJ, Cohen ME. The predictive value of endodontic diagnostic tests. Oral Surg. 1984;58(3):343-6.

Jackson RJ, Lim DV, Dao ML. Identification and analysis of a collagenolytic activity in *Streptococcus mutans*. Curr Microbiol. 1997 34(1):49-54.

Johnson JL, George SJ, Newby AC, Jackson CL. Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102(43):15575-80.

Kamal AMM, Okiji T, Kawashima N, Suda H. Defense responses of dentin/pulp complex to experimentally induced caries in rat molars: an immunohistochemical study on kinetics of pulpal la antigen-expressing cells and macrophages. J Endod. 1997;23(2):115-20.

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

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

Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. J Biol Chem. 1993;268(14):10425-32.

Kreis T, Vale R. Matrix Metalloproteinases. In: Press OU, editor. Sternlicht MD, Werb Z Guidebook to the extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins. 2nd ed. Geneva: Sambrook & Tooze Publication; 1999. p. 519-42.

Ikebe T, et al. Gelatinolitic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. Clin Exp Metastasis, 1999;17(4):315-323.

Lee W, Aitken S, J. S, McCulloch CAG. Evidence of a direct relationship collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis. . J Periodont Res. 1995;30(1):23-33.

Lee WC, Eakle WS. Possible role of tensile stress in the etiology of cervical erosive lesions of teeth. J Prosthet Dent. 1984;52(3):374-80.

Lin M, Jackson P, Tester AM, Diaconu E, Overall CM, Blalock JE, et al. Matrix Metalloproteinases-8 facilitates neutrophil migration through the corneal stroma matrix by

collagen degradation and production of the chemotatic peptide Pro-Gly-Pro. Am J Pathol. 2008;173(1):144-153.

Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. Crit Rev Oral Biol Med. 1993;4(5):679-728.

Lundy T, Stanley HR. Correlation of pulpal histopathology and clinical symptoms in human teeth subjected to experimental irritation. Oral Surg. 1969;27(2):187-201.

Magloire H, Romeas A, Melin M, Couble, M-L, Bleicher F, Fargers J-C. Molecular regulation of odontoblast activity under dentin injury. Adv Dent Res. 2001; 15: Aug, 46-50.

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;73(8):1397-406.

Malla N, Sjoli S, Winberg JO, Handler-Olsen E, Uhlin-Hansen L. Biological and pathobiological functions of gelatinase dimers and complexes. Connect Tissue Res. 2008;49:180-84.

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

Moody AB, Browne RM, Robinson PP. A comparison of monopolar and bipolar electrical stimuli and thermal stimuli in determining the vitality of human teeth. Arch Oral Biol. 1989;34(9):701-15.

Moraes SH, Al E. Teste elétrico pulpar. Odontólogo Moderno. 1990;17(8):12-5.

Mumford JM, Björn H. Problems in electric pulp-testing and dental algesimetry. Int Dent J. 1962 ;12(2):161-79.

Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovasc Res. 2006 69(3):562-73.

Nagase H, Woessner JFJ. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 1999;274(31):21491-4.

Nyberg P, Ylipalosaari M, Sorsa T, Salo T. Trypsins and their role in carcinoma growth. Exp Cell Res. 2006;312(8):1219-28.

O'Leary TJ. Standardization in immunohistochemistry. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2001;9(1):3-8

Owen CA, Campbell EJ. Extracellular proteolysis: new paradigms for an old paradox. J Lab Clin Med. 1999;134(4):341-51.

Polassari W, Wahlgren J, Larmas M, Ränkä H, Sorsa T, Salo T, et al. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF-β1. J Dent Res. 2000;79(1):77-84.

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

Pereira JC, Segala AD. Sensibilidad pós-restauratión adhesiva: causas y tratamiento. In: Henostrosa GH et al, 2003, Adhesión em Odontologia Restauradora. Curitiba: Ed. Maio, p. 397-440

Pereira JC, et al. Tratamentos conservadores da vitalidade pulpar: princípios biológicos e clínicos. Biodonto. 2004;2(1):1-105.

Polette M, Nawrocki-Raby B, Gilles C, Clavel C, Birembaut P. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. Crit Rev Oncol Hematol. 2004;49:179-86.

Rauschenberger CR, Bailey JC, Cootauco CJ. Detection of human IL-2 in normal and inflamed dental pulps. J Endod. 1997;23(6):366-70.

Rickoff B, et al. Effects of thermal vitality tests on human dental pulp. J Endodon. 1988;14(10):482-5.

Santos J, Carrilho M, Tervahartiala T, Sorsa T, Breschi L, Mazzoni A, et al. Determination of matrix metalloproteinases in human radicular dentin. JOE. 2009;35(5):686-89.

Satoyoshi M, Kawata A, Koizumi T, Inoue K, Itohara S, Teranaka T, et al. Matrix metalloproteinase-2 in dentin matrix mineralization. J Endod. 2001;27(7):462-6.

Seltzer S, Bender IB. A polpa dental**.** 1979. 2ed, Rio de Janeiro, Editorial Labor Brasil.

Seltzer S, Bender IB, Zionts M. The dynamics of pulp inflammation: correlations between diagnostic data and actual histologic findings in the pulp. Oral Surg. 1963;16(7):846-71.

Seltzer S, Bender IB, Zionts M. The dynamics of pulp inflammation: correlations between diagnostic data and actual histologic findings in the pulp - continued. Oral Surg. 1963;16(8):969-77.

Shin SJ, Lee J, Baek SH, Lim SS. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. J Endod. 2002;28(4):313-15.

Snoek-Van Beurden PA, von Den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. . Biotechniques. 2005;38(1):73-83.

Sorsa T, Ding YL, Ingman T, Salo T, Westerlund U, Haapasalo M, et al. Cellular source, activation and inhibition of dental plaque collagenase. J Clin Periodontol. 1995;22(9):709-17.

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

Sorsa T, Golub LM. Is the excessive inhibition of matrix metalloproteinases (MMPs) by potent synthetic MMP inhibitors (MMPIs) desirable in periodontitis and other inflammatory diseases? That is: 'Leaky' MMPIs vs excessively efficient drugs. Oral diseases. 2005;11(6):408-9.

Souza AP, Line SRP. The biology of matrix metalloproteinases. J Appl Oral Sci. 2002 ;10(1) :1-6.

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

Stocker W, Grams F, Baumann U, Reinemer P, Gomis-Ruth F, McKay D, et al. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. Protein Sci. 1995 4(5):823-40.

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

Sulkala M, Paakkonen V, Larmas M, Salo T, Tjaderhane L. Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13, collagenase-3) is highly expressed in human tooth pulp. Connect Tissue Res. 2004;45(4-5):231-7.

Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjaderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. Arch Oral Biol. 2007;52(2):121-7.

Suri L, Damoulis PD, Trang L, Gagari E. Expression of MMP-13 (collagenase-3) in long term cultures of human dental pulp cells. Arch Oral Biol. 2008, 53:791-9.

Tervahartiala T, Pirila E, Ceponis A, Maisi P, Salo T, Tuter G, et al. The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2, -8, -13, and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. J Dent Res. 2000;79(12):1969-77.

Ten Cate AR. Histologia Bucal - desenvolvimento, estrutura e função. 2001. 5ed, Rio de Janeiro, Guanabara.

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

Tjaderhane L, Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Salo T. Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). Adv Dent Res. 2001;15:55-8.

Trowbridge, HO. Pathogenesis of pulpits resulting from dental caries. J Endod. 1981; 7(): 52-60:

Tsai, Chung-Hung; Chen, Yi-Juai; Huang, Fu-Mei; Su, Ying-Fang; Chang, Yu-Chao. The upregulation of matrix metalloproteinase-9 in inflamed human dental pulps. JOE. 2005; 31(12):860-2.

Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. J Dent. 2000;28(2):77-92.

van Houte J, Lopman J, Kent R. The final pH of bacteria comprising the predominant flora on sound and carious human root and enamel surfaces. J Dent Res. 1996;75(4):1008-14.

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

Vartio T, Vaheri A. A gelatin-binding 70,000-dalton glycoprotein synthesized distinctly from fibronectin by normal and malignant adherent cells. J Biol Chem. 1981 256(24):13085-90.

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

Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. Genes Dev. 2000;14(17):2123-33.

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

Anexos

ANEXO A

Universidade de São Paulo

- Faculdade de Odontologia de Bauru -
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679
Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários
e-mail : dep-demd@fob.usp.br –Fone: (0XX14) 235-8266

Bauru, _____.

CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE

Senhor (a) paciente ou seu representante legal

A Faculdade de Odontologia de Bauru – USP desenvolve pesquisas científicas utilizando dentes extraídos. Por isso, quando o plano (proposta) de tratamento para o seu problema de dentes (sempre com acompanhamento de professores da FOB - USP) mostrar a necessidade de extração (arrancar) um ou mais dentes, solicitamos que o (a) senhor (a) faça a doação do(s) seu(s) dente(s) ou dos dentes do paciente que é representante legal.

Esta doação não é obrigatória, e o nome do doador não será divulgado. Caso não queira fazer a doação, o paciente não será excluído (retirado) do tratamento para o qual foi triado, anteriormente.

A doação não dará ao doador qualquer prioridade de tratamentos futuros, na Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.

Obrigado por sua atenção.

"Caso o paciente apresente dúvidas ou reclamações em relação a sua participação na pesquisa, pode entrar em contato com Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, da FOB-USP, pelo endereço Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75

(sala no prédio da Biblioteca, FOB-USP) ou pelo telefone (14)3235-8356".

ANEXO B

Universidade de São Paulo

- Faculdade de Odontologia de Bauru -
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679
Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários
e-mail : dep-demd@fob.usp.br –Fone: (0XX14) 235-8266

TERMO DE DOAÇÃO

Eu, _____, portador da cédula de identidade de número_____, autorizo a doação do (s) elemento (s) dentário (s)_____, à Faculdade de Odontologia de Bauru, FOB-USP, para a sua utilização em pesquisa científica.

Declaro-me ciente de que a doação **não é obrigatória** e de que não me dará qualquer prioridade para a realização de tratamentos futuros, na Faculdade de Odontologia de Bauru, FOB-USP.

Sem mais, firmo o presente.

Bauru, _____ de _____de .

_____

Assinatura do Paciente ou Responsável legal

ANEXO C

Universidade de São Paulo

- Faculdade de Odontologia de Bauru -
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679
Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários
e-mail : dep-demd@fob.usp.br –Fone: (0XX14) 235-8266

I. DADOS DO PACIENTE:

- Nome:
- Endereço:
- Telefone:
- Data de nascimento: / / - Sexo:
- Idade:

II. ELEMENTO DENTÁRIO SUBMETIDO AO EXAME:

- Dente:
- Data da extração: / / - Hora:

A- CONDIÇÃO CLÍNICA DO DENTE

(1) Restaurado ⇩ ( ) Amálgama ( ) Resina Composta ( ) CIV ( ) Prótese ( )IRM	(2) Aberto	(3) Cariado	(4) Fraturado ⇩ ( ) Coroa ( ) Raiz

B- CONDIÇÃO RADIOGRÁFICA

(1) Normal	(2) Alargamento do espaço periodontal	(3) Lesão Periodontal ⇩ ( ) Cisto ( ) Granuloma ( ) Abscesso Agudo ( ) Abscesso Crônico	(4) Reabsorção Dentária ⇩ ( ) Interna ( ) Externa

C. CONDIÇÃO ANAMNÉTICA DO DENTE

☐ DOR PRESENTE	
( ) Espontânea (1) Intermitente Com períodos de acalmia ( ) Longos ( ) Curtos (2) Contínua (3) Reflexa (4) Cessa com analgésico (5) Não cessa com analgésico	( ) Provocada (1) Pelo frio ( ) Com declínio rápido ( ) Com declínio lento ( ) Acalmia (2) Pelo calor
☐ DOR AUSENTE	
( ) Sem antecedente	( ) Com antecedente (1) Provocada (2)Espontânea (3) Com edema facial

D. TESTES DE VITALIDADE PULPAR

TESTES TÉRMICO E ELÉTRICO		
( ) DOR AO FRIO Diclorodifluormetano (1) Provocada ( ) Declínio Rápido ( ) Declínio Lento (2) Exacerbada (3) Aliviada (4) Ausente	( ) DOR AO CALOR Guta-percha (1) Provocada ( ) Declínio Rápido ( ) Declínio Lento (2) Exacerbada (3) Aliviada (4) Ausente	( ) TESTE ELÉTRICO ( ) Análogo ( ) Dente avaliado

TESTE DE ANESTESIA

☐ Dor Aliviada

☐ Dor Persistente

SENSIBILIDADE À PERCUSSÃO

- ☐ Sensibilidade à percussão horizontal
- ☐ Sensibilidade à percussão vertical

MOBILIDADE

- ☐ Lateralidade maior que 0.5 mm
- ☐ Intrusiva

DIAGNÓSTICO PRESUMIDO

- ☐ Normal ou Reversível
- ☐ Transição
- ☐ Irreversível
- ☐ Necrose

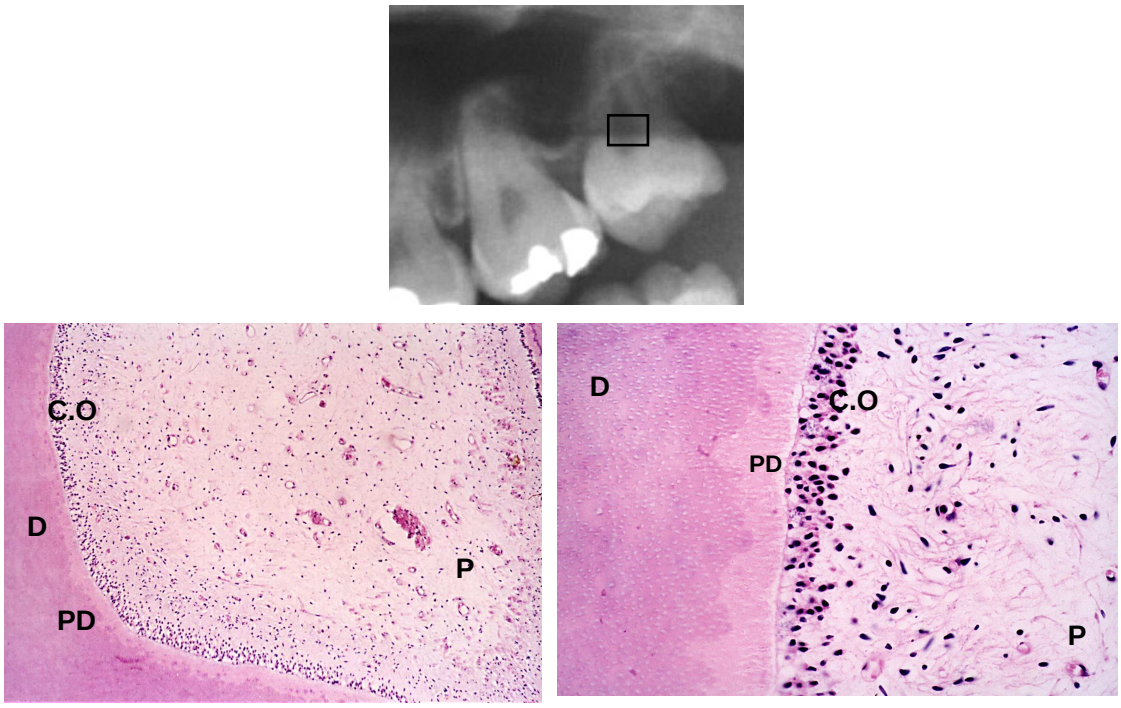
Bauru, _____ de _____ de .

ANEXO D

Percentual de coincidência entre resultados clínicos e histopatológicos (HERMOZA-NOVOA, 2005).

	Histopatológico				
Clínico	Normal	Reversível	Transição	Irreversível	Necrose
Polpa Normal	12 (100%)				
Reversível	4 (50%)	4 (50%)			
Transição		1 (16,66%)	1 (16,66%)	4 (66,66%)	
Irreversível			1 (7,6%)	9 (69,23%)	3 (23%)
Necrose				2 (25%)	6 (75%)

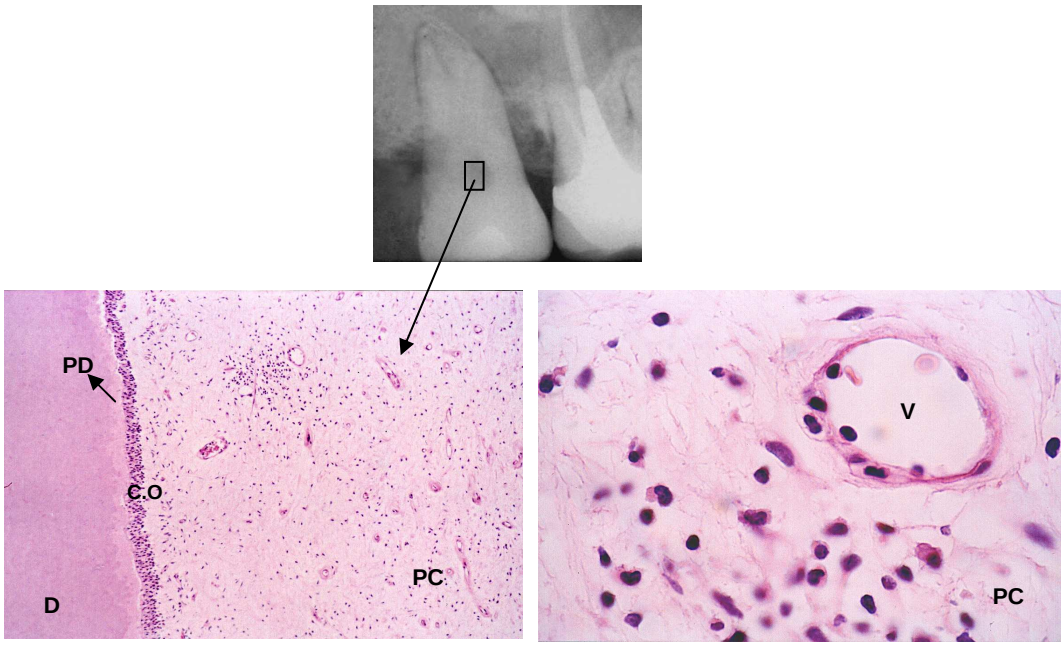
ANEXO E



Grupo Controle: Radiografia e coloração em HE da região coronária da polpa (HERMOZA-NOVOA. 2005).

Legenda:

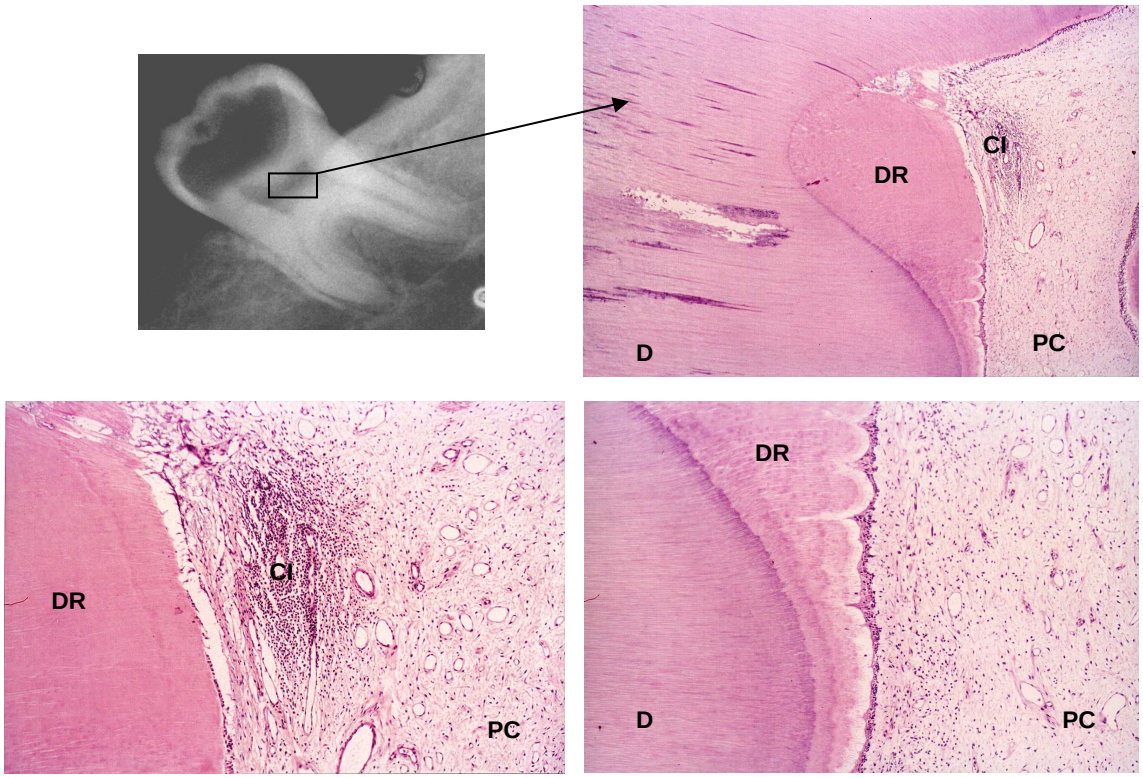
D – Dentina
PD – Pré-dentina
C.O – Camada Odontoblástica
P – Polpa



Grupo Reversível: Radiografia e coloração em HE da região coronária da polpa (HERMOZA-NOVOA. 2005)

Legenda:

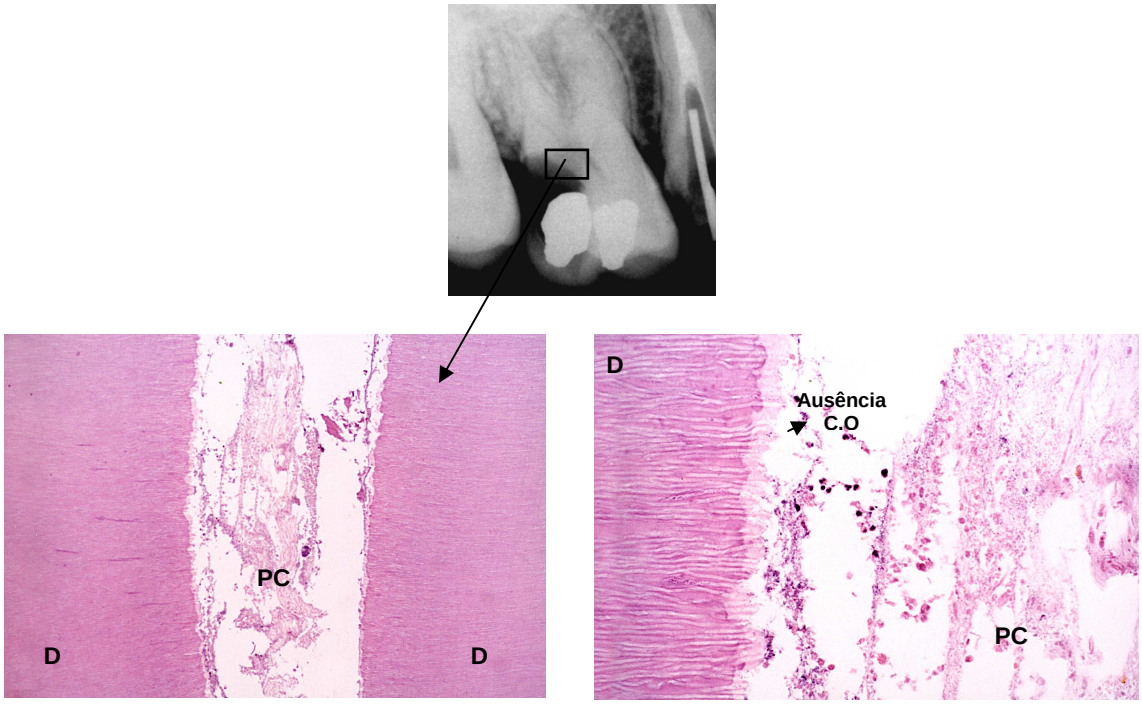
D – Dentina
PD – Pré-dentina
C.O – Camada Odontoblástica
PC – Polpa Coronária
V – Vaso Sanguíneo



GrupoTransição: Radiografia e coloração em HE da região coronária da polpa (HERMOZA-NOVOA. 2005).

Legenda:

D – Dentina
DR – Dentina Reacional
CI – Células Inflamatórias
PC – Polpa Coronária



Grupo Irreversível: Radiografia e coloração em HE da região coronária da polpa (HERMOZA-NOVOA. 2005).

Legenda:

D – Dentina
PC – Polpa Coronária
Notar ausência da Camada Odontoblástica (C.O)