UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

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

Angélica Reis Hannas

BAURU
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

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

Angélica Reis Hannas

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

Área de concentração: Dentística Restauradora
Orientador: Prof. Dr. José Carlos Pereira
Co-orientador: Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

BAURU
2007

Hannas, Angélica Reis

H191d

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/ Hannas, Angélica Reis - Bauru, 2007. 162 p.; il.; 30cm.

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: 31/07/2007

Estudo I
Comitê de Ética da FOB – USP
Protocolo nº: 28/2004
Data: 31 de março de 2004

Estudo II
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
Parecer nº588/2006, registro no CONEP
número 12878: 28/2004
Data: 31 de maio de 2006

Dedicatória

Aos meus queridos pais, Michel & Iêda

Dedico este trabalho àqueles que sempre estiveram ao meu lado, durante todos os momentos da minha vida. Agradeço pela formação que me proporcionaram, vocês são o meu maior exemplo de moral e caráter. Mesmo que distantes, sempre me apoiaram com muito amor e carinho. Agradeço por fazer parte da sua família. Essa conquista não seria possível se não fossem vocês,

Muito Obrigada!

À minha querida família...

Aos meus irmãos Túlio, Thales e Michel Jr. e suas esposas Cláudia, Anandy e Ana Paula.

Às minhas sobrinhas lindas Mariana, Carolina e Bettina.

Aos queridos tios e primos.

Meu Agradecimento Especial

Ao Prof. Dr. José Carlos Pereira

Obrigada por me conceder o privilégio de ser sua aluna. O Sr. sempre será para mim o maior exemplo de erudição, sabedoria e dedicação à ciência.

*"Para adquirir conhecimento, é preciso estudar; mas
para adquirir sabedoria, é preciso observar."*

Marilyn vos Savan

À D. Heloísa, pelo carinho, consideração e acolhimento; em sua presença, senti como se estivesse junto à minha família. Agradeço, ainda, pela exímia correção deste trabalho.

Agradecimento

A DEUS

“Se pedirdes, DEUS vos dará. Se buscardes, DEUS vos fará encontrar. Se baterdes, DEUS vos abrirá a porta. Pois tudo o que pedes, recebes de DEUS. O que buscas, encontras em DEUS, e a quem bate, DEUS lhe abrirá as portas.”

Agradecimentos

Institucionais

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

Aos professores do Departamento de Dentística Restauradora da FOBUSP prof. Dr. José Mondelli, Maria Fidela de Lima Navarro, Maria Teresa Atta, Rafael Francisco Lia Mondelli, Eduardo Batista Franco, Ákira Ishikirama, Carlos Eduardo Francischone.

Às amigas da Pós-Graduação Giane, Margareth e Letícia por todo o apoio, carinho e simpatia.

Aos funcionários do Departamento de Dentística Rita, Ângela, Maria, Mauro, Karen, Zuleica, Nelson, Sr. Dito.

Aos professores do Departamento de Bioquímica, Profa Dra. Marília Buzalaf e ao Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira.

Aos amigos do Departamento de Biologia Oral Thelma, Ovídio e Flávia.

À Profa. Dr. Ana Paula de Souza Pardo pela contribuição científica e pela disponibilização do laboratório de biologia molecular da USC e aos bioquímicos Wilson e Rodrigo, pela contribuição e pelas orientações sobre o protocolo de pesquisa.

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

Às secretárias da Diretoria da FOBUSP Valéria e Eloísa.

À Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa do diretor prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro, do vice-diretor prof. Dr. José Carlos Pereira e da coordenadora da Pós-Graduação profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de Doutorado em Odontologia.

Agradecimentos

Aos amigos

Vocês contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho...

Às amigas Fabiana, Juliana e Valéria.

Aos amigos Etiene, Augusto, Cássia, Carla, Marta e Zanda.

**Aos amigos Ana Paula, Fernanda, Júlio, Linda, Safira e
Marcela.**

**Aos amigos e queridos companheiros de pesquisa
Leonardo, Giovana, Cecília e Marcela.**

**Aos colegas de turma do Doutorado Leonardo, Ana
Raquel, Sérgio Kiyoshi, Margareth, Anurahda, Renato,
Diego, Teresinha, Eduardo, Fabiano, Luis e Flávia.**

**Aos colegas de Pós-Graduação, Adilson, Aninha
Francischone, Carla, Renata, Flora e Ticiane.**

*“Quem tem um amigo, mesmo
que um só, não importa onde se encontre, jamais
sofrerá de solidão; poderá morrer de saudades, mas
não estará só.”*

Amyr Klink

Agradecimentos

Doutorado Sanduíche

Ao Prof. Dr. Leo Tjäderhane, meu co-orientador no Doutorado Sanduíche, pela imensurável contribuição a esse trabalho e pelo apoio durante o período em que estive na Finlândia.

Ao Prof. Dr. Timo Sorsa e Tuula Salo pelo privilégio de contribuir com seu extenso conhecimento científico.

À Taina Tervahartiala, pelos profundos ensinamentos das técnicas de biologia molecular e sua admirável disciplina. A considero também como uma grande amiga.

Ao Prof. Dr. Jukka Meurman, pela sabedoria e caloroso acolhimento.

Aos funcionários do Biomedicum, Institute of Dentistry - Kirsti Kari, Jukka, Ritva e Pïrio, que também contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos PhD Students do Biomedicum, Institute of Dentistry - Heidi, Eva, Ulvi, Prati, Pïrio pela amizade e cordialidade, tornaram mais agradáveis os momentos de trabalho.

À Marianna Kemel, do Departamento de Química da Universidade de Helsinki.

À Universidade de Helsinki, na pessoa do Diretor Prof. Dr. Seppo Meri.

À CAPES pela concessão bolsa de estudos no exterior, para a realização do Doutorado Sanduíche.

Resumo

RESUMO

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

As metaloproteinases da matriz (MMPs) foram identificadas na saliva, na placa dental, na dentina e no cimento. Este trabalho teve como objetivos: Estudo I (I) - avaliar a expressão de MMP-2 e MMP-9 presentes na saliva total e parotidiana e no fluido gengival crevicular (FGC) de pacientes portadores e não portadores de lesões cervicais não cariosas (LCNC); Estudo II (II) - investigar se a presença de MMP-8 e -9/TIMPs poderia influenciar a remineralização de lesões artificialmente criadas na superfície radicular, com ou sem desgaste por abrasão. Os métodos utilizados foram: (I) Coleta de amostras de saliva e do FGC de 32 pacientes, com (n=16) e sem LCNC (n=16). A atividade gelatinolítica das MMPs foi avaliada através de análise zimográfica e *Western Blot*. (II): Espécimes de dentina humana radicular foram obtidos. O grupo controle G1(10) não sofreu nenhum tratamento. Os demais segmentos radiculares foram desmineralizados G2(60). O Grupo A não foi submetido à escovação e o Grupo B foi submetido à abrasão por escovação em uma máquina de escovação simulada. G2(10) foi apenas desmineralizado, G3(10) desmineralizado e remineralizado, e os Grupos G4(10), G5(10), G6(10), G7(10) foram desmineralizados e remineralizados em presença de tampão neutro, TIMP, MMP-8 e -9, MMP-8,-9 e TIMP, respectivamente. Para a análise elemental, as concentrações de Ca^{+2} , P, Mg^{+2} assim como a relação molar Ca/P e Mg/Ca foram determinadas através de uma sonda eletrônica para microanálise (EPMA). A análise qualitativa por retrodispersão (BSE) foi realizada para demonstrar a distribuição global da densidade mineral. Os resultados (I) mostraram que a principal gelatinase presente, tanto na saliva total quanto no FGC, é a proMMP-9. Na saliva secretada pela glândula parótida, não foram detectadas bandas indicando a presença de gelatinases. Os resultados do estudo (II) indicaram que os espécimes escovados apresentaram maior conteúdo de Ca^{+2} a 20 μm e maior conteúdo de Mg^{+2} a 30 e 50 μm . Em presença de TIMPs, ocorreu uma redução do conteúdo de Ca^{+2} a 20 μm . Para os espécimes não escovados, em todas as profundidades, as amostras incubadas com MMPs apresentaram maiores valores de Ca^{+2} . Portanto, pode-se concluir que (I) a comparação entre pacientes com e sem LCNC mostrou não haver diferença estatisticamente significativa quanto à atividade gelatinolítica; (II) quando não inibidas pelos TIMPs, as MMPs degradaram o colágeno completamente desmineralizado na superfície radicular, permitindo melhor recalcificação na superfície subjacente. Esse fenômeno foi também facilitado pela abrasão por escovação.

Palavras-chave: Lesões cervicais não cariosas, metaloproteinases da matriz, gelatinases, TIMPs, saliva, fluido gengival crevicular, lesão cariiosa radicular, remineralização, EDX.

Abstract

ABSTRACT

Gelatinase expression in saliva of patients with noncarious cervical lesions and EDX assessment of the influence of matrix metalloproteinases on artificial root lesions

Matrix metalloproteinases (MMPs) have been identified in saliva, plaque, gingival crevicular fluid (GCF), dentin and cementum. Study (I) aimed at evaluating the presence and quantity of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in total and parotid saliva and in GCF (GCF) of subjects with and without NCCL. Study (II) aimed at investigating whether the presence of matrix metalloproteinase (MMP)-8 and -9/TIMPs would influence the remineralization of artificial root lesions with and without mechanical wear. (I) Total stimulated saliva, parotid saliva, and GCF from patients with (n=16) and without NCCL (n=16) were collected and assessed for gelatin zymography and for western immunoblot analysis. (II) Human root segments from Group A (n=35) were not brushed and from Group B (n=35) were subjected to machine-controlled brushing, simulating mechanical wear. Specimens from Group 1 (control, n=10) were left untreated. Group 2 (n=10), was just demineralized; Group 3 (n=10) was demineralized and remineralized. The other samples G4 (n=10), G5 (n=10), G6 (n=10), G7 (n=10) were subjected to remineralization with HEPES buffer, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 (TIMP-2), activated MMP-8 and MMP-9 and activated MMP-8, MMP-9 and TIMP-2, respectively. Ca^{+2} , P, Mg^{+2} concentrations as well as Ca/P and Mg/Ca molar ratios were determined through an *Electron Probe Microanalyser* (EPMA). (I) Densitometric analysis revealed that the main gelatinase was proMMP-9. No statistically significant difference was observed for MMP-2 and MMP-9 levels, separately. In parotid saliva, gelatinolytic activity was very low or absent. Western immunoblots revealed that, while little immunoreactivity was detected for MMP-2, there was positive immunoreaction for MMP-9, both in total saliva and in GCF. Gelatinases do not seem to originate from parotid gland. (II) The results indicated that the brushed specimens presented higher Ca^{+2} levels at 20 μm and higher Mg^{+2} content at 30 and 50 μm . Ca^{+2} content at 20 μm decreased in the presence of TIMPs. For the non-brushed specimens, in all depths, samples incubated with MMPs showed highest Ca^{+2} values. It can be concluded that (I) the main gelatinase present in the oral cavity is MMP-9. No significant differences were found in total gelatinolytic activity among NCCL+ and NCCL- patients. (II) When not inhibited by TIMPs, MMPs degraded the completely demineralized collagen in the root surface, allowing for better recalcification in the deeper areas. This phenomenon was also facilitated by the brushing procedure.

Keywords: Noncarious cervical lesions, Matrix Metalloproteinases, Gelatinases, Saliva, Gingival crevicular fluid, root carious lesion, remineralization, EDX.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 2.1 – Estrutura das gelatinases	53
Figura 2.2 – Classificação das MMPs	53
Figura 2.3 – Efeito da variação do pH bucal e a ativação de MMPs	61
Figura 4.1.1A – Coletor de saliva	73
Figura 4.1.1B – Coletor de saliva acoplado à sonda traqueal e à pêra	73
Figura 4.1.2A – Adaptação do coletor de saliva à bochecha	73
Figura 4.1.2B – Coleta da saliva	73
Figura 4.1.3 – Descrição do marcador de peso molecular	76
Figura 4.1.4 – Ilustração do protocolo de <i>western blotting</i>	82
Figura 4.2.1 – Fluxograma do protocolo de estudo	85
Figura 4.2.2 – Ilustração esquemática da preparação do espécime	86
Figura 4.2.3 – Preparo dos espécimes e escovação simulada	89
Figura 5.1.1.1 – Zimografia da Saliva Total (A) e FGC (B)	96
Figura 5. 1.1.2 – Zimografia da saliva da Parótida	96
Figura 5.1.2.1 – <i>Western Blot</i> para MMP-9 da saliva total	99
Figura 5.1.2.2 – <i>Western Blot</i> para MMP-9 do fluido do sulco gengival	99
Figura 5.1.2.3 – <i>Western Blot</i> para MMP-2 do fluido do sulco gengival	100
Figura 5.1.2.4 – <i>Western Blot</i> para MMP-2 da saliva total	100
Figura 5.2.1.1 – Conteúdo de Ca^{+2} e Mg^{+2} nas diferentes profundidades	101
Figura 5.2.2.1 – Efeito das MMPs e TIMPs sobre o conteúdo de Ca^{+2} e Mg^{+2}	102
Figura 5.2.2.2 – Conteúdo de Ca^{+2} após incubação com MMPs/TIMPs	103
Figura 5.2.5.1 – Fotomicrografia em BSE do espécime não escovado/escovado	105
Figura 5.2.5.2 – Fotomicrografia em BSE de um espécime do grupo 6A	106
Figura 5.2.5.3 – Grupo 1 (controle)	107

Figura 5.2.5.4 – Grupo 2 (desmineralizado)	108
Figura 5.2.5.5 – Grupo 3(desmineralizado e remineralizado)	109
Figura 5.2.5.6 – Grupo 4 (desmineralizado, tampão neutro e remineralizado)	110
Figura 5.2.5.7 – Grupo 5 (desmineralizado, remineralizado incubado com TIMP-2)	111
Figura 5.2.5.8 – Grupo 6 (desmineralizado, remineralizado incubado com MMP-8,-9)	112
Figura 5.2.5.9 – Grupo 7 (desmineralizado, remineralizado com MMP-9,-8 e TIMP-2)	113
Figura 6.2.1 – Ilustração esquemática do efeito da escovação sobre o conteúdo de Ca^{+2}	122

QUADROS

Quadro 4.1.1 – Descrição dos constituintes do gel de poliacrilamida	76
Quadro 4.1.2 – Descrição dos compostos e soluções utilizadas para a quantificação protéica e zimografia	79
Quadro 4.1.3 – Descrição dos constituintes do gel de poliacrilamida	80
Quadro 4.1.4 – Descrição do material e soluções utilizadas para o <i>western-blotting</i>	83
Quadro 4.2.1 – Substâncias químicas e reagentes utilizados no Estudo II	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1.1.1 – Zimografia da Saliva Total	95
Tabela 5.1.1.2 – Zimografia do fluido gengival crevicular	97
Tabela 5.1.2.1– <i>Western Blotting</i> da saliva total	98
Tabela A.1 – Conteúdo de Ca^{2+} a 20 μm , 30 μm e 50 μm	151
Tabela A.2 – Conteúdo de P a 20 μm , 30 μm e 50 μm	151
Tabela A.3 – Conteúdo de Mg^{2+} a 20 μm , 30 μm e 50 μm	152
Tabela A.4. – Relação molar Ca/P	152
Tabela A.5 – Relação molar Mg/Ca em 20 μm , 30 μm e 50 μm	153

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APS	<i>Ammonium per sulfate</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BSE	<i>Back-scattering images</i>
β-TCP	$[(Ca, Mg)_3(PO_4)_2]$ ou Beta tricálcio-fosfato substituída por magnésio
CMT	Tetraciclina modificada quimicamente
ECM	Matriz extra celular
EPMA	<i>Electron Probe Microanalyser</i>
FESEM	<i>Field Emission Scanning Electron Microscope</i>
FGC	Fluido gengival crevicular
kDa	Kilo Dalton
LCNC	Lesão cervical não cariosa
MMP	Metaloproteinase da matriz
MWM	<i>Molecular weight marker</i> (marcador de peso molecular)
ODu/mm²	% Densidade de volume adjacente
PMN	Leucócito polimorfonuclear
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis</i>
TBST	TBS (10mM Tris-HCl, pH 7,5, 22 mM NaCl) + 0,05% Triton X-100
TEMED	N,N,NV,NV-tetramethylenediamine
TGF	Fator transformador de crescimento
TIMP	<i>Inibidor tissular das metaloproteinases</i>
WB	<i>Western Blotting</i>

Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	39
2	REVISÃO DE LITERATURA	45
2.1	Lesões cervicais não cariosas	45
2.1.1	Fatores etiológicos	45
2.1.2	Composição química da dentina	49
2.1.3	Lesões em dentina	50
2.1.4	Papel da saliva nas LCNC	51
2.2	Metaloproteinases da Matriz	52
2.2.1	Estrutura das MMPs	52
2.2.2	Classificação das MMPs	53
2.2.3	Função das MMPs na cavidade oral	54
2.2.4	Gelatinases	55
2.2.5	Colagenases	56
2.2.6	MMPs no fluido gengival	57
2.2.7	MMPs na saliva	59
2.2.8	MMPs X LCNC	60
2.2.9	Efeito de enzimas e das MMPs sobre a dentina	62
3	PROPOSIÇÃO	67
3.1	Estudo I	71
3.2	Estudo II	71
4	MATERIAL E MÉTODOS	71
4.1	Estudo I	71
4.1.1	Seleção dos pacientes	71
4.1.2	Obtenção das amostras	72
4.1.3	Extração Protéica	74
4.1.4	Quantificação Protéica	74
4.1.5	Análise Zimográfica	75
4.1.5.1	Preparo do Gel de Separação e do Gel de Largada	75
4.1.5.2	Padrão de peso molecular	76
4.1.5.3	Controles positivos	76
4.1.5.4	Inserção das amostras	77
4.1.5.5	Corrida e incubação do gel	77
4.1.5.6	Coloração e descoloração do Gel	78
4.1.5.7	Análise Densitométrica	78
4.1.6	<i>Western Blotting</i>	80
4.1.6.1	Descrição do Método	80
4.1.6.2	Análise dos dados	83

4.2	Estudo II	84
4.2.1	Seleção dos Espécimes	84
4.2.2	Grupos Experimentais	84
4.2.3	Preparo dos Espécimes	86
4.2.4	Criação das lesões radiculares	86
4.2.5	Técnica de Escovação	88
4.2.6	Controle do nível de desmineralização/desgaste	90
4.2.7	Remineralização	90
4.2.8	Rotina de exposição aos tratamentos adicionais	90
4.2.9	Exposição da lesão	90
4.2.10	Análise dos espécimes	91
4.2.10.1	Análise Elemental	91
4.2.10.2	Imagens por retrodispersão (BSE)	92
4.2.10.3	Análise dos Dados	92
5	RESULTADOS	95
5.1	Estudo I	95
5.1.1	Zimografia	95
5.1.2	<i>Western Blotting</i>	98
5.2	Estudo II	101
5.2.1	Efeito da escovação, desmineralização e remineralização	101
5.2.2	Efeito das MMPs e TIMPs	102
5.2.3	Conteúdo Mineral	104
5.2.4	Imagens em BSE	105
6	DISCUSSÃO	117
6.1	Estudo I	117
6.2	Estudo II	121
6.2.1	Efeito da Escovação	121
6.2.2	Conteúdo Mineral	123
6.2.3	MMP	124
7	CONCLUSÕES	129
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
	APÊNDICES	151
	ANEXOS	157

1

1

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A observação clínica das lesões cervicais não cariosas (LCNC) mostra que a relação de causa e efeito entre os fenômenos de atrição, abrasão, corrosão (erosão) e abfração, assim como o aparecimento das lesões, é obscurecida pela enorme complexidade dos eventos que ocorrem na cavidade bucal. Assim, definir a etiologia de uma lesão em particular torna-se mero exercício de suposições, podendo levar a falhas recorrentes no tratamento e na prevenção de tais lesões. De fato, é algo complicado considerar que atrição, abrasão, corrosão (erosão) e abfração possam agir de forma tão particular e localizada. Essa dificuldade de estabelecimento de uma causa e a diversidade de manifestações clínicas têm levado à consideração de que a etiologia das LCNC é de origem multifatorial, possivelmente com uma causa principal, mas dependente de fatores outros, ou co-fatores, difíceis de serem determinados clinicamente.

Tal situação, aliada ao fato da significativa prevalência das LCNC (cerca de 20% dos indivíduos apresentam uma ou mais lesões cervicais) (NUNN, 1996) tem estimulado a busca de outros parâmetros para melhor compreender o processo de desenvolvimento e progressão dessas lesões. O avanço dos estudos da biologia molecular está abrindo um horizonte novo para a interpretação de diferentes fenômenos biológicos e patológicos que acometem 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 próprio desenvolvimento de lesões cariosas em dentina. 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 sequência 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 collagenolítica (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 collagenases 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 da matriz extracelular (**MMPs**) estão presentes na saliva (INGMAN T, 1994a), na placa dental (SORSA et al., 1995), no esmalte (CATERINA et al., 2002) e na dentina (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 matriz extracelular, 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 quatro inibidores tissulares endógenos - **TIMPs** (KREIS, VALE, 1999).

A ativação de certas MMPs, tais como a MMP-2, MMP-8 e a MMP-9, está relacionada à degradação do colágeno em lesões de cárie. Esse mesmo fenômeno poderia também estar associado ao aparecimento das LCNC. Qualquer processo não carioso que, inicialmente, dissolva o esmalte e exponha a dentina, poderia dar início ao aparecimento de lesões na região da junção cimento/esmalte. As fibrilas colágenas da matriz orgânica dentinária são primeiramente expostas e, em seguida, degradadas pelas MMPs (KAWASAKI, FEATHERSTONE, 1997, DUNG, 1999).

No dente, uma vez iniciado, o processo de cavitação é irreversível, embora possa ser paralisado ou retardado através dos procedimentos restauradores terapêuticos. Em situações sistêmicas particulares, pode ocorrer o desequilíbrio entre o conteúdo salivar de MMPs e seus inibidores, levando ao aparecimento de lesões bucais de diferentes naturezas, inclusive, em hipótese, as LCNC. Por exemplo, na Síndrome de Sjögren, os níveis de gelatinase e collagenase da saliva aumentam em decorrência da inflamação crônica auto-imune que afeta as glândulas salivares, reduzindo o fluxo salivar e aumentando a incidência de cárie (KONTTINEN et al., 1994, 1998; WU, 1996). Pacientes pós tratamento com irradiação também apresentaram níveis aumentados de MMPs (VUOTILA et al., 2002). Teoricamente, qualquer outra situação orgânica, clínica ou subclínica, que altere a relação entre as MMPs e seus inibidores, poderia provocar, também, o aparecimento de LCNC. Coincidentemente, as LCNC ocorrem com maior frequência em regiões próximas do sulco gengival, mormente na face vestibular dos dentes, e na região de molares e pré-molares,

principalmente os superiores (PEREIRA, 1995), junto ao duto de Stensen que excreta o conteúdo salivar das parótidas.

O conhecimento exposto anteriormente abriu uma nova perspectiva para o estudo da degradação das estruturas mineralizadas dos dentes. Com base nesse raciocínio, o presente estudo foi dividido em dois protocolos individuais com o intuito de melhor compreender a relação de entidades moleculares específicas com as lesões dentárias. No Estudo I, procurou-se desenvolver um protocolo para o estudo das MMPs em pacientes portadores de LCNC. Na metodologia proposta neste trabalho, foi realizada a quantificação da atividade das MMPs nos fluidos orais. Se detectada uma relação da prevalência de LCNC com a variação de MMPs ativas na cavidade bucal, estar-se-ia completando uma etapa importante no entendimento dos fenômenos que regem o desenvolvimento dessas lesões e, quiçá, de seu tratamento. Um avanço no entendimento do processo de desenvolvimento dessas lesões possibilitaria o estabelecimento de uma nova forma de prevenção do aparecimento das LCNC.

A degradação do colágeno exposto na dentina cariada ou em processos erosivos pode ser causada pelo efeito combinado das MMPs. A constatação de que a presença de MMP-8 na dentina coronal, submetida à desmineralização e remineralização, alterou o processo de remineralização desse tecido indica uma possível interferência das MMPs na progressão de lesões artificiais em dentina (NORDBO et al., 2003). Assim, planejou-se o Estudo II para avaliar a influência das MMPs sobre lesões artificiais na dentina radicular, associadas ou não ao desgaste dentário.

Os avanços em biologia molecular têm proporcionado informação mais aprofundada sobre as proteínas presentes na cavidade oral e na matriz dentinária. No entanto, o efeito de tais proteínas sobre a região cervical dos dentes e sobre as lesões artificiais radiculares permanece ainda um enigma e necessita de maior elucidação.

2

2 Revisão

de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Lesões Cervicais Não Cariosas

A perda de estrutura dentária sem a presença de cárie é um processo fisiológico normal e ocorre durante toda a vida (FLINT, SCULLY, 1988). No entanto, se o grau de desgaste for prejudicial ao dente ou motivo de preocupação por parte do paciente, então esse desgaste deve ser considerado patológico (SMITH, KNIGHT, 1984). As LCNC são definidas como a perda de tecido dental na junção cimento-esmalte (MAIR, 1992).

As LCNC tornaram-se alvo de muita atenção, uma vez que acometem uma grande parte da população (MAHONEY, KILPATRICK, 2003). Os estudos que investigaram a prevalência do desgaste dentário cervical indicam que os dentes da maxila são os mais afetados (LEVITCH et al., 1994). Quase exclusivamente, tem sido reportada a prevalência de LCCN na face vestibular e, muito raramente, na lingual dos dentes (KHAN et al., 1999). Em geral, os dentes mais afetados são os pré-molares e molares, especialmente os primeiros pré-molares superiores (AW et al., 2002), sendo os incisivos os menos acometidos por tais lesões (BORCIC et al., 2004). A prevalência das LCNC aumenta com o aumento da idade (AW et al., 2002; BORCIC et al., 2004).

A propensão à formação da LCNC resulta das propriedades morfológicas, estruturais e microecológicas específicas da região cervical do dente. A camada de esmalte é mais fina e a direção dos prismas é perpendicular na região da junção cimento-esmalte. Além disso, a dureza do esmalte nessa área é inferior e a adesão entre esmalte e dentina mais fraca, uma vez que essa junção é suave, sem cristas (GOEL et al., 1991). O esmalte é irregularmente estruturado, isto é, a região cervical é aprismática, resistente por ser menos solúvel ao ácido. Isso explica porque a ocorrência de LCNC é mais freqüente que as lesões cariosas nessa região (GASPERSIC, 1995).

2.1.1 Fatores etiológicos das LCNC

Raramente o desgaste cervical é originado por uma única causa, apesar de geralmente haver uma etiologia predominante. Os termos atrição, abrasão, corrosão e abfração refletem os fatores etiológicos específicos que estão associados à perda de tecido da estrutura dentária na região cervical (ECCLES, 1982; GRIPPO, 1991; GRIPPO et al., 2004; LEE, EAKLE, 1984; PINDBORG, 1970).

Atrição

A perda da estrutura de esmalte, dentina ou da restauração devido à fricção dente-a-dente origina a forma de desgaste denominada “atrição” (PINDBORG, 1970). A atrição oclusal e incisal pode ocorrer durante a deglutição e mastigação, no entanto, o desgaste torna-se severo durante o bruxismo (XHONGA, 1977), como pode ser evidenciado pelo desgaste avançado e geralmente rápido dos dentes acometidos por esta condição. Há também o atrito proximal (que ocorre nos pontos de contato), que pode causar a diminuição do arco dentário.

Erosão Dentária (Corrosão)

A perda de tecido duro da estrutura dentária devido a processos químicos na ausência de placa bacteriana foi inicialmente denominada “erosão” (MISTRY, GRENDY, 1993). Esse termo errôneo tem sido amplamente utilizado em odontologia. Porém, de acordo com Grippo (2004), a degradação das estruturas dentárias causada pela ação química ou eletroquímica de ácidos de origem não bacteriana deve ser definida como “corrosão” e não “erosão”. Porém, uma vez que o uso do termo “erosão” já está consagrado na literatura, ele será considerado como um sinônimo de corrosão. Existem fontes tanto endógenas quanto exógenas de erosão. A origem intrínseca pode estar relacionada com refluxo gastro-esofágico, bulimia ou anorexia (GUDMUNDSSON et al., 1995). Já a erosão extrínseca é causada pela freqüente ingestão de substâncias ácidas, que podem ser oriundas da dieta, como sucos cítricos e refrigerantes (JENSDOTTIR et al., 2006) ou do ambiente (desgaste ocupacional). A erosão tem sido considerada um dos fatores etiológicos mais importantes no desenvolvimento das LCNC. A ação de ácido em áreas de concentração de tensões resultou tanto em corrosão de tensão estática quanto em corrosão de tensão cíclica (fadiga). Portanto, ambas deveriam ser também consideradas como fator etiológico das LCNC (GRIPPO et al., 2004).

Assim como as demais LCNC, as lesões de erosão estão relacionadas a múltiplos fatores. Os fatores químicos incluem o pK_a da substância ingerida, propriedades de adesão e quelante, além do conteúdo de Ca^{+2} , PO_4^{-3} e F^- . Os fatores comportamentais estão relacionados aos hábitos de dieta e ingestão de líquidos, estilo de vida e consumo excessivo de substâncias ácidas. Há também que se considerar os fatores biológicos, tais como fluxo salivar, capacidade tampão e composição da saliva, formação da película adquirida e anatomia dos dentes e dos tecidos moles (LUSSI et al., 2004).

Abrasão

A abrasão, por outro lado, é definida como desgaste patológico das estruturas dentárias pela ação de forças mecânicas (LEVITCH et al., 1994), decorrentes do atrito

localizado e constante entre o dente e diferentes instrumentos e materiais, que não o do próprio dente antagonista. A causa mais comum é a escovação dental, que pode estar relacionada com a técnica, método, frequência, desenho das cerdas e dentífrícios abrasivos (LITONJUA et al., 2000). Pode resultar de hábitos de higiene bucal, como a técnica de escovação incorreta. Alguns estudos sugerem que o dentífrício apresenta maior relevância sobre a abrasão que a própria escova (LITONJUA et al., 2004). Mesmo que a pasta de dente realmente cause desgaste do dente, a quantidade estimada é de alguns micrômetros, muito inferior ao desgaste fisiológico observado clinicamente (SAXTON, COWELL, 1981).

Combinação de abrasão e erosão

O processo erosivo pode ser dividido em dois estágios. No princípio, ocorre amolecimento da superfície, em função da desmineralização parcial da superfície. Nesse estágio do processo, o reparo (remineralização) é possível, uma vez que o tecido mantém sua estrutura. Num estágio mais avançado, o mineral da superfície externa é perdido e o reparo dessa estrutura não é mais viável, porém a remineralização da subsuperfície é ainda possível (LUSSI et al., 2004).

A perda de substância é aumentada por um processo abrasivo. A maioria dos estudos laboratoriais e *in situ* reforçam a hipótese de que uma combinação entre erosão e abrasão aumenta o desgaste (AMAECHI et al., 2003; ATTIN et al., 2004; AZZOPARDI et al., 2001; BARTLETT, SHAH, 2006; JAEGGI, LUSSI, 1999).

Quando a dentina hígida foi submetida à escovação simulada, não houve alteração no desgaste da sua estrutura. No entanto, a escovação da dentina desmineralizada resultou em grande perda de estrutura dentinária quando comparada com o controle (ATTIN T, 2000), indicando que a resistência à abrasão diminuiu drasticamente após a erosão. Em contraste, achados prévios revelaram não haver diferença, quanto ao desgaste e à rugosidade na abrasão sob escovação, entre espécimes de dentina radicular desmineralizados e hígidos (DE MENEZES et al., 2004). Outro trabalho mostrou que a abrasão devido à escovação não influenciou o conteúdo mineral dos espécimes após desmineralização, mesmo que a dentina seja susceptível à erosão por desmineralização quando o pH do ambiente encontra-se abaixo do pH 6,7 (pH crítico) (VANUSPONG et al., 2002). Investigações *in situ* (ATTIN et al., 2004; JAEGGI, LUSSI, 1999) indicaram que se a estrutura do dente não estiver exposta à abrasão mecânica, enquanto amolecida, a remineralização pode reverter o amolecimento após período prolongado de exposição à saliva. Após o desafio ácido, uma demora de pelo menos uma hora antes da escovação pode aumentar a resistência da superfície do dente à abrasão (ATTIN et al., 2000; JAEGGI, LUSSI, 1999). Alguns estudos sugerem que a pasta de dente possui efeito mais relevante

que a escova de dentes (LITONJUA et al., 2004). Mesmo que o dentífrício cause desgaste, a quantidade foi estimada em poucos micrômetros, muito inferior ao desgaste observado clinicamente (SAXTON, COWELL, 1981).

Enfim, um estudo caso-controle (BADER et al., 1996) demonstrou que o desgaste cervical é um processo multifatorial, tanto no seu aparecimento quanto na sua progressão. A investigação da progressão de lesões cervicais mostrou que tanto o consumo de ácidos na dieta quanto a frequência de escovação estão relacionados com um aumento de desgaste cervical (LUSSI, SCHAFFNER, 2000). Com base na literatura, há evidência suficiente, tanto de estudos clínicos quanto laboratoriais, indicando que erosão e abrasão estão correlacionados ao desgaste cervical. Por outro lado, há poucos indícios de que uma lesão cervical seja causada somente por um fator etiológico isolado, tal como erosão ou abrasão separadamente (BARTLETT, SHAH, 2006).

Abfração

Levantou-se a hipótese de que as tensões de tração desenvolvidas nos dentes pelos esforços da mastigação poderiam ser um possível fator etiológico das LCNC (LEE, EAKLE, 1984). Esse fenômeno foi denominado por Grippo (GRIPPO, 1991) como **abfração**. Do latim, **abfration** (*abrangere* = para fora; *fractum* = ruptura) descreve lesões não cariosas resultantes de uma fratura na microestrutura do esmalte, em decorrência da flexão do dente. Essas lesões são tipicamente em forma de cunha, com ângulos internos e externos afiados. A abfração relaciona as lesões cervicais com os efeitos da oclusão, os quais se manifestam à distância das regiões de contato interdentário (REES, 2002; REES, JACOBSEN, 1998). Quando os dentes recebem cargas no sentido horizontal, o efeito das tensões se concentra na região cervical, causando flexão (LEE, EAKLE, 1984). Essa inclinação resultará em fadiga e fratura da região mais sujeita à flexão, a região cervical, seja esmalte, dentina ou cimento. Isso fará com que os cristais de hidroxiapatita do esmalte se rompam, gerando microfraturas na estrutura dentária, permitindo a penetração de moléculas como as de água em sua matriz, tornando o tecido mais susceptível a processos de desgaste físico ou físico-químicos (LEVITCH et al., 1994).

Há evidências que indicam a associação entre tensão oclusal e lesão cervical, mas a maioria vem de análise de elementos finitos e de estudos laboratoriais (DE LAS CASAS et al., 2003; REES et al., 2003). Porém, a comprovação direta que confirme clinicamente essa associação é limitada (MAYHEW et al., 1998; PEGORARO et al., 2005; PIOTROWSKI et al., 2001). Pelos resultados obtidos com os estudos através do método dos elementos finitos, a face lingual dos dentes deveria ser tão susceptível à lesão cervical quanto a face vestibular (REES, 2002), o que não é observado clinicamente, pois a presença de lesões na face lingual é rara (RADENTZ et al., 1976). No entanto, um estudo *in vivo* (MAYHEW et al., 1998)

mostrou haver forte associação entre facetas de desgaste e LCNC. Em outra investigação, porém, os dentes afetados por LCNC não apresentavam nem facetas de desgaste oclusal nem contatos oclusais diferentes dos dentes controles, não acometidos por lesões cervicais (PIOTROWSKI et al., 2001). Apesar de a presença ou contribuição de tensão oclusal não terem sido medidas diretamente, a possibilidade da ocorrência de abfração não foi descartada pelos autores (PIOTROWSKI et al., 2001).

Litonjua (2004b) postulou que a aplicação de carga oclusal não necessariamente desempenha um papel significativo na progressão das lesões cervicais ou lesões de abfração. No entanto, Staninec e colaboradores (2005), em um estudo laboratorial, analisaram finas secções de esmalte e dentina, as quais foram obtidas da região cervical de dentes extraídos sem lesão. Os autores observaram um aumento da perda de tecido mineralizado após a aplicação de tensão oclusal e imersão em ácido. Isso demonstrou que tanto a tensão oclusal quanto a redução do pH aceleraram a perda de material na superfície dentinária. Em um estudo clínico, Pegoraro et al. (2005) mostraram que, apesar de não haver correlação entre hábitos parafuncionais e LCNC, ocorreu correlação positiva entre LCNC e a presença de facetas de desgaste. Esses achados apontam o papel das forças oclusais como fator etiológico das LCNC.

Enfim, enquanto a maioria das evidências que associam lesões cervicais à tensão oclusal é indireta, não se pode subestimar o grande número de dados que indicam essa correlação. Após extensa investigação da literatura, a falta de comprovação apontando um único fator causal reforça a hipótese de que as lesões cervicais não cariosas possuem etiologia multifatorial. Deve-se, portanto, considerar mais de um fator etiológico quando se for proceder à prevenção e ao tratamento das LCNC.

2.1.2 Composição química da dentina

A dentina contém 20% em peso de componente orgânico, sendo composto basicamente por colágeno tipo I (90%) e proteínas não colagênicas. A água está presente em 10% em peso e os demais 70% em peso correspondem ao componente inorgânico. A maior parte da porção mineral da dentina é composta por hidroxiapatita. Os íons Ca^{2+} (35,1% em peso) e P ou PO_4^{3-} (16,9% em peso) são seus maiores constituintes. A razão molar de Ca/P da dentina humana é de 1,62. São também encontrados na dentina íons contaminantes, como CO_3 , Mg^{2+} e Na^+ (LEGEROS, 1991).

De acordo com LeGeros et al. (1996), quando a concentração de Mg/Ca é maior que 0,03, no interior dos túbulos dentinários, há formação de tricálcio-fosfato substituído por magnésio $(\text{Ca, Mg})_3(\text{PO}_4)_2$ ou β -TCMP (β -TCP com substituição pelo Mg^{2+}), às expensas da apatita. A incorporação do magnésio causa a formação de uma apatita com pobre cristalinidade, comparada com as apatitas livres de Mg^{2+} (LEGEROS et al., 1996).

A concentração média de magnésio na dentina é de 0,8% em peso (CHENG et al., 1988). Mesmo em concentração tão baixa, esse elemento, juntamente com o carbonato (CO_3), desempenha importante papel na estrutura mineralizada do esmalte e da dentina. O Mg^{2+} foi implicado como sendo o primeiro mineral a ser perdido com o aparecimento de uma lesão cariiosa. Assim, um baixo conteúdo de Mg^{2+} no manto da dentina poderia ser o primeiro indício de desmineralização. Por outro lado, um alto conteúdo de Mg^{2+} sob a lesão cariiosa reflete a precipitação de Mg^{2+} para a formação de *whitlockite*, ou β -TCP ou $[(\text{Ca}, \text{Mg})_3(\text{PO}_4)_2]$ (DACULSI et al., 1987).

Quando sujeita a um processo carioso ou erosivo, a dentina sofre alterações em sua estrutura química, como diminuição na densidade mineral, redução da razão Ca/P e da concentração de Mg^{2+} , decréscimo na concentração de CO_3 e aumento na concentração de F^- (LEGEROS, 1991).

O colágeno é a estrutura suporte principal da dentina, que mantém juntos os cristais de apatita, alguns dos quais estão precipitados dentro da fina estrutura da hélice do colágeno. Com essa estrutura, há uma sinergia entre matriz e apatita e, por essa razão, a fase mineral só pode ser parcialmente digerida pela ação de enzimas durante o ataque ácido. A hélice da molécula de colágeno é protegida pelos cristais de apatita (FEJERSKOV, 1997).

2.1.3 Lesões de erosão em Dentina

Quando exposta a uma solução subsaturada em relação à hidroxiapatita e à fluorapatita, ocorre erosão da superfície dentinária. Quando sujeita à desmineralização, a primeira região a ser afetada pela erosão é a dentina peritubular. Se o desafio ácido persistir por um intervalo de tempo mais prolongado, a desmineralização irá progredir, atingindo a dentina intertubular, que adquire um aspecto poroso e irregular. Os túbulos dentinários tornam-se alargados, o que explica a ocorrência de sensibilidade em função da presença de lesões cervicais em dentina (MEURMAN et al., 1991). São também encontradas lesões de erosão na dentina radicular. A superfície radicular está sujeita a substanciais alterações químicas quando é gradualmente exposta ao ambiente oral, como resultado da recessão periodontal. O cemento radicular, recentemente exposto à cavidade oral, é altamente susceptível à perda mineral resultante do metabolismo da placa bacteriana (NYVAD et al., 1997). Enquanto que uma lesão radicular pode ocorrer em um ambiente que exibe pH em torno de 6,0, a ocorrência de uma lesão em esmalte requer um pH mais baixo, por volta de 4,9 (KATZ et al., 1987). A perda mineral ocorre profundamente a uma zona superficial relativamente bem mineralizada. O alto conteúdo de mineral na superfície pode refletir um redeposição seletivo de minerais na região (FEATHERSTONE, 1994).

2.1.4 Papel da saliva nas LCNC

A saliva apresenta diversos mecanismos protetores contra a erosão dentária, tais como diluição e eliminação de um agente erosivo na boca, neutralização e tamponamento de ácidos, diminuição da dissolução dos tecidos mineralizados, através da manutenção de um estado supersaturado próximo à superfície dentária, devido à presença de íons Ca^{2+} e PO_4^{-3} em sua composição (MEURMAN, VESTERINEN, 2000; LUSSI, SHAFFNER, 2000; HALL et al, 1999). A saliva também ocasiona a formação de uma película adquirida sobre a superfície dentária, através da adsorção de proteínas e glicoproteínas, as quais têm a habilidade de proteger a superfície do dente contra desmineralização pelos ácidos da dieta ou de outras fontes (LENDENMANN et al., 2000). Essa película protege a superfície dentária contra a erosão (MEURMAN, VESTERINEN, 2000).

A partir do momento em que o agente erosivo é neutralizado, a deposição de íons Ca^{2+} e PO_4^{-3} pode levar à remineralização do tecido amolecido (LUSSI et al., 2004). O processo de remineralização é importante para a manutenção do reparo natural da superfície dos tecidos duros que compõem o dente, mantendo o equilíbrio entre a perda e o ganho de mineral (FEJERSKOV, 1997).

As mucinas presentes na saliva humana contribuem em grande extensão para o seu efeito protetor contra os desafios ácidos sobre a superfície dentária (NIEUW AMERONGEN et al., 1987; OFFNER GD, 2000). As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular, secretadas pelas glândulas salivares. Dentre suas inúmeras funções, as mucinas são responsáveis pela proteção da mucosa mastigatória contra o ressecamento, lubrificação e ação antimicrobiana. Por pertencerem à película adquirida, as mucinas podem exercer efeito protetor contra a desmineralização causada pelos ácidos. A proteção da película induzida pela secreção da saliva total e da glândula parótida é menor que aquela proporcionada pela secreção das glândulas submandibular e sublingual (NIEUW AMERONGEN et al., 1987). Uma vez que a atividade das glândulas salivares determina a extensão da estimulação salivar, o grau de remineralização depende da localização do dente no arco e pode ser responsável pela diferente susceptibilidade à erosão observada em locais distintos na boca (AMAECHI, HIGHAM, 2001).

O fluxo salivar, assim como a capacidade tampão da saliva, determinam a capacidade da saliva em neutralizar o potencial erosivo de substâncias ácidas provenientes da dieta (JÄRVINENM et al., 1991). A película adquirida mostrou-se como uma camada eficaz na proteção da superfície dental contra a erosão causada por substâncias provenientes da dieta, como sucos cítricos e bebidas carbonatadas (MEURMAN, VESTERINEN, 2000; NEKRASHEVYCH, STOSSER, 2003). O armazenamento do esmalte e da dentina na saliva, tanto *in vitro* quanto *in situ*, protegeu a estrutura do dente com maior

eficácia contra a perda mineral causada pela erosão quando comparado com o armazenamento em água destilada (HALL et al., 1999). O efeito protetor das proteínas salivares aumenta com o aumento do potencial erosivo após os primeiros minutos de exposição a bebidas (JENSDOTTIR et al., 2006). O potencial corrosivo das bebidas carbonatadas após os primeiros minutos de exposição do dente é determinado pelo pH da bebida. O poder de erosão dos refrigerantes é 10 vezes maior que dos sucos cítricos. No entanto, as proteínas da saliva reduzem esse potencial corrosivo em até 50%. Nesse intervalo de tempo, as proteínas cessam a ação erosiva das bebidas carbonatadas de baixo pH, ao passo que para os sucos naturais, foi observado efeito limitado para os sucos de laranja de maior pH e, conseqüentemente, menor potencial erosivo (JENSDOTTIR et al., 2006).

2.2 Metaloproteinases da Matriz (MMPs)

Até hoje, 24 MMPs diferentes foram clonadas, das quais 23 são encontradas em humanos (NAGASE, WOESSNER, 1999; VISSE R, 2003).

Em pacientes saudáveis as MMPs, juntamente com outras proteinases extracelulares, estão envolvidas em diversos eventos fisiológicos, tais como remodelamento tecidual, coagulação e quebra do fibrinogênio, apoptose, reparação tecidual, remodelamento ósseo, reações de defesa imunológica do hospedeiro, regulação de respostas inflamatórias, reprodução, fertilização e desenvolvimento. Em eventos patológicos, as MMPs estão associadas a diversas condições inflamatórias envolvendo injúria tecidual, tais como em doenças no pulmão, pele e nos olhos, assim como doenças do sistema esquelético e câncer (NYBERG et al., 2006; OWEN, CAMPBELL, 1999; STERNLICHT, WERB, 2001).

2.2.1 Estrutura das MMPs

A estrutura das MMPs apresenta grande homologia seqüencial. Difere em termos de especificidade do substrato e controle transcripcional. Todas as MMPs derivam de um protótipo de três a cinco domínios. Pró-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 (Fig.2.1) apresentam o domínio da fibronectina (requerido para a ligação e quebra do colágeno) e as MMPs tipo membrana possuem o domínio transmembrana (KREIS, VALE, 1999; VISSE, NAGASE, 2003).

Figura 2.1 – Estrutura das gelatinases

2.2.2 Classificação das MMPs

Apesar de se saber que as MMPs degradam múltiplos substratos, elas podem ser divididas em seis subgrupos, de acordo com sua especificidade. As collagenases intersticiais (MMP-1, MMP-8, MMP-13) são capazes de clivar o colágeno intersticial tipo I, II, III e outras moléculas presentes ou não na matriz extracelular. As estromelisinases (MMP-3 e MMP-10) digerem componentes da matriz extracelular, sendo que a MMP-3 é capaz de ativar várias pro-MMPs. As gelatinases ou collagenases tipo IV (MMP-2 e MMP-9) são capazes de degradar o colágeno desnaturado. As matrilisinas (MMP-7, MMP-26) degradam componentes da matriz extracelular. A MMP-7 processa a superfície celular de moléculas. As metaloproteinases tipo membrana (MT-MMP) são seis (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24, MMP-17, MMP-25). Com exceção da 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) (KREIS, VALE, 1999; VISSE, NAGASE, 2003). A estrutura das MMPs apresenta certas características específicas de acordo com sua classificação (Fig. 2.2).

Fonte – Hannas et al, 2007

Figura 2.2 – Classificação das MMPs. 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 (NAGASE et al., 2006 ; WU, 1996).

2.2.3 Função das MMPs na cavidade oral

Sistemicamente, as MMPs são importantes em eventos celulares como migração celular, invasão, proliferação e apoptose (VU, WERB, 2000). Elas são responsáveis pela regulação de processos como a morfogênese, angiogênese, cicatrização e degradação da matriz extracelular. As metaloproteinases não só remodelam a matriz extra celular (ECM), mas também influenciam diversas reações celulares. Elas (I) degradam as células da ECM 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).

Entre as **MMPs** encontradas na cavidade bucal, as principais são a **MMP-8**, a **MMP-2**, a **MMP-9** e a **MMP-20**. As MMPs exercem papel fundamental no remodelamento e desenvolvimento dos tecidos da cavidade oral. A presença da forma ativa de gelatinase A na dentina humana mineralizada implica essa enzima no processo de mineralização dentinário (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000). 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; VISSE, 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).

Apesar de a doença periodontal ser iniciada pela microflora subgengival, os mediadores da degradação do tecido conjuntivo, durante essa doença inflamatória, são gerados pela resposta do hospedeiro a esses microorganismos (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; LEE et al., 1995). A degradação do tecido gengival durante a doença periodontal ativa ocorre, no mínimo parcialmente, em decorrência das MMPs (BIRKEDAL-HANSEN, 1993). A doença periodontal está relacionada à quantidade aumentada de MMP-2 e MMP-9 (EJEIL et al., 2003; MAKELA et al., 1994). A MMP-8 também é um potencial desencadeador da doença periodontal (KINANE et al., 2003; LEE et al., 1995).

O tratamento da doença periodontal com farmacoinibidores das MMPs, como a doxiciclina em dose reduzida, mostrou-se um efetivo coadjuvante da raspagem e alisamento radicular (CIANCIO, 2002; GOLUB et al., 1995; REDDY et al., 2003). A tetraciclina modificada quimicamente (CMT) é isenta de ação antimicrobiana, mas apresenta potente

atividade anticolagenolítica. Esse medicamento inibe, por mecanismos não antimicrobianos, a atividade das MMPs responsáveis pela degradação do tecido conjuntivo, incluindo perda óssea durante a doença periodontal e outras doenças (GOLUB et al., 1997; GOLUB et al., 1995). Foi comprovada a eficácia das drogas inibidoras das MMPs na redução das colagenases da degradação do tecido conjuntivo em humanos (GOLUB et al., 1997). A clorexidina, amplamente utilizada no tratamento de doenças periodontais, nada mais é do que um efetivo inibidor das metaloproteinases (GENDRON et al., 1999).

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 et al., 2002). Outro estudo demonstrou a abundância de MMP-8 no tecido pulpar inflamado (WAHLGREN et al., 2002).

2.2.4 Gelatinases

As gelatinases de 72 kDa (MMP-2) e 92 kDa (MMP-9) foram inicialmente descritas como proteínas que degradam gelatina ou o colágeno desnaturado por colagenases intersticiais (VARTIO, VAHERI, 1981). Mas elas também degradam várias proteínas da matriz extracelular, como o colágeno tipo IV e V, a elastina, a fibronectina e a vitronectina (VISSE, NAGASE, 2003), por isso são também denominadas colagenases tipo IV.

As gelatinases possuem em sua estrutura três domínios de fibronectina, responsáveis pela sua ligação à gelatina, laminina, elastina e aos colágenos tipo IV e VII (NAGASE et al., 2006; VISSE, NAGASE, 2003). Há uma coordenação entre a cisteína presente no pró-domínio e o zinco presente no domínio catalítico (Fig. 2.2). 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).

Apesar de essas duas enzimas apresentarem estrutura e especificidade ao substrato similares, sua origem celular é diferente. A MMP-2 (Gelatinase A) foi inicialmente purificada de tumor de rato com metástase (SALO et al., 1983). Ela é secretada por células endoteliais, fibroblastos, macrófagos ou células malignas (CHAKRABARTI, PATEL, 2005). Degrada principalmente a elastina. Ela é secretada na forma latente de 72 kDa e, quando clivada, adquire a forma de 59-62 kDa (SALO et al., 1983). 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; MAKELA 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 quantidade de gelatinases aumenta durante a doença periodontal, enquanto que o tratamento periodontal convencional eficaz ocasiona uma redução na quantidade de tais enzimas (MAKELA et al., 1994). Elevados níveis de MMP-2 foram encontrados no tecido gengival afetado por periodontite crônica (MAKELA et al., 1994; PIRILA et al., 2001).

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 $\frac{1}{4}$ e $\frac{3}{4}$ 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). A MMP-2 possui atividade similar à da MMP-1 ou collagenase, 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 collagenolítica 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). A MMP-9 tem sido apontada como a principal gelatinase presente no tecido gengival com doença periodontal crônica, na placa dental, na saliva e no FGC (GOLUB et al., 1995; INGMAN et al., 1994b; MAKELA et al., 1994; SORSA et al., 1994). Na periodontite, a maior fonte de MMP-9 são os neutrófilos e, em menor extensão, os monócitos e macrófagos (PIRILA et al., 2001; WESTERLUND et al., 1996).

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).

2.2.5 Colagenases

As colagenases compartilham a habilidade 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 $\frac{3}{4}$ e $\frac{1}{4}$ (BIRKEDAL-HANSEN, 1993). Compreendem a MMP-1, -8 e -13. As collagenases são sintetizadas pelas células do tecido conjuntivo, fibroblastos, queratinócitos, osteoblastos e macrófagos (VISSE, NAGASE, 2003).

Aquela de maior interesse neste estudo é a MMP-8 ou collagenase neutrofílica. Seu substrato preferencial é o colágeno, tipos I e II (STERNLICHT & WERB, 2001). Ela é produzida especialmente por leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos). Ela é armazenada em grânulos intracelulares da medula óssea e é liberada em resposta a estímulos extracelulares. No entanto, 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). 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.

A MMP-8 desempenha importante papel na destruição do tecido periodontal, sendo a principal collagenase na gengivite e na periodontite crônica (TERVAHATIALA et al, 2000, SORSA et al., 2004). Elevados índices de MMP-8 são liberados do FGC durante tais doenças (SORSA et al., 1988, LEE et al., 1995, GOLUB et al., 1995; INGMAN et al., 1996). Além de ser uma ferramenta para a monitoração da doença periodontal (MÄNTYLÄ et al., 2006), a quantidade de MMP-8 também indica presença de inflamação, por ser esta enzima 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).

2.2.6 MMPs no fluido gengival crevicular

A presença de proteínas no FGC, enzimas principalmente, foi inicialmente investigada por Sueda, Bang e Cimasoni (1969). A descoberta de que a collagenase (MMP-8) e a elastase, presentes no Fluido Gengival Crevicular (FGC), são provenientes primariamente de células humanas, notadamente neutrófilos, e de que a sua atividade está correlacionada com a inflamação gengival e a bolsa periodontal, abriu uma nova frente para o estudo da doença periodontal.

O FGC é uma mistura complexa de substâncias derivadas do plasma, leucócitos, células estruturais do periodonto e de bactérias orais (UITTO, 2003). A análise das MMPs no FGC ou na saliva reflete o grau de degradação patológica de colágeno no periodonto e pode ter significativo valor no diagnóstico da doença periodontal (GANGBAR et al., 1990; GOLUB et al., 1997; LEE et al., 1995). Essas substâncias possuem um enorme potencial de serem utilizadas como monitoradores da doença periodontal e da cura após o tratamento (GOLUB et al., 1995). O FGC desempenha um papel importante na manutenção da

estrutura do epitélio juncional e na defesa antimicrobiana do periodonto. O tratamento periodontal eficaz foi associado a uma redução da atividade das collagenases no FGC (GOLUB et al., 1997; LEE et al., 1995; MÄNTYLÄ et al., 2006; ROMANELLI et al., 1999; SORSA et al., 1995).

Dentre as enzimas proteolíticas, MMP-8 e MMP-9 são consideradas como as maiores responsáveis pela degradação do colágeno no tecido inflamado durante a gengivite e a periodontite (LEE et al., 1995). Os leucócitos, especialmente neutrófilos, são peças-chave na batalha contra as bactérias na região do sulco gengival e representam a maior fonte secretora de MMP-8 e MMP-9 (GOLUB et al., 1995; INGMAN et al., 1996; LEE et al., 1995; SORSA et al., 1988). Sob condições normais, há um balanço entre a quantidade de enzimas proteolíticas ativas e seus inibidores, mantendo sua atividade sob controle. Nos locais altamente inflamados, porém, os tecidos são infiltrados por neutrófilos e outras células produtoras de proteinases que possibilitam a formação de um ambiente para a efetiva defesa contra microorganismos (UITTO, 2003). Assim, as proteinases derivadas dos neutrófilos (MMP-8 e-9) podem exercer tanto atividade antiinflamatória com características protetoras (OWEN et al., 2004; SORSA et al., 2004) quanto pró-inflamatórias (GANGBAR et al., 1990; GOLUB et al., 1997; LEE et al., 1995).

Além de MMP-8 e MMP-9, outras MMPs são encontradas no FGC, como a MMP-2 e a MMP-13. Os fibroblastos gengivais parecem ser uma fonte ativa para a produção de MMP-2 em resposta aos periodontopatógenos (DAHAN et al., 2001). A presença de MMP-2 foi identificada em pacientes com doença periodontal sendo proveniente do epitélio gengival sulcular (TERVAHARTIALA et al., 2000) e dos fibroblastos (MANCINI et al., 1999). A atividade da MMP-13 pode estar envolvida no rápido *turn over* da matriz durante o reparo de injúrias gengivais que promovem a cicatrização sem a formação de cicatrizes (UITTO, 2003).

A MMP-8 e a MMP-9 são, respectivamente, as principais collagenases e gelatinases encontradas no FGC de pacientes com periodontite do adulto, ao passo que a MMP-1 é a collagenase predominante na periodontite juvenil (INGMAN et al., 1996). Uma vez que a doença periodontal do adulto está associada a reduzidos índices de TIMPs no FGC (INGMAN et al., 1996), há a possibilidade da utilização de inibidores das MMPs, tais como a doxíciclina como coadjuvantes no tratamento da doença periodontal (GOLUB et al., 1995).

A dor de origem pulpar induz reações inflamatórias neurogênicas na gengiva e a expressão de neuropeptídeos no FGC (AWAWDEH et al., 2002). A MMP-8, secretada por neutrófilos, macrófagos, monócitos e fibroblastos é a protease com maior poder de destruição presente no periodonto inflamado e no FGC (KIILI et al., 2002; MANTYLA et al., 2003; SORSA et al., 2004). Uma vez que a estimulação de nervos sensoriais ocasiona a ativação de células imunológicas, tais como neutrófilos, monócitos, macrófagos e

fibroblastos, foi demonstrado que a dor pulpar ocasiona a elevação local da liberação de MMP-8 através do FGC (AVELLAN et al., 2005).

2.2.7 MMPs na saliva

A saliva total é uma mistura de fluidos orais, contém secreções das glândulas salivares menores e maiores, assim como do FGC, secreções bronquiais, células do plasma e sangüíneas provenientes de feridas na cavidade oral, microorganismos, células da descamação do epitélio oral e debrís alimentares (KAUFMAN, LAMSTER, 2000). As enzimas presentes na saliva podem ser produzidas pelas células das glândulas salivares, microorganismos orais, leucócitos polimorfonucleares (PMN), células epiteliais e também podem ser provenientes do FGC (CHAUNCEY, 1961).

Uitto et al. (1990) coletaram saliva de pacientes saudáveis e com doença periodontal. As amostras foram analisadas quanto à atividade de collagenase. A collagenase vertebral foi detectada na saliva total de todos os pacientes, mas não na saliva das glândulas parótida, sublingual e submandibular. A atividade collagenolítica foi maior em pacientes com doença periodontal que nos controles. Segundo os autores, enquanto a collagenase bacteriana poderia estar presente em pequena quantidade, a maioria das collagenases na saliva é derivada dos PMNs que atingem a cavidade oral através do sulco gengival. Sorsa et al. (1992) corroboraram esse achado e reportaram que as collagenases intersticiais, isoladas de extratos do tecido gengival inflamado, do FGC e da saliva são provenientes dos PMNs e não dos fibroblastos.

Gangbar et al. (1990) avaliaram os níveis de collagenase e gelatinase em pacientes com doença periodontal do adulto e periodontite juvenil. Eles observaram que os níveis de collagenase ativa foram significativamente maiores nos pacientes com doença periodontal quando comparados com os controles. Além disso, constataram que o tratamento periodontal ocasionou a redução de collagenases e gelatinases ativas, sem, porém, haver correlação entre os índices clínicos e atividade enzimática.

Os níveis de gelatinases salivares em relação à doença periodontal foram também avaliados por Mäkelä et al. (1994). Observaram que a concentração de MMP-9 (92 kDa gelatinase) foi significativamente maior na saliva total de pacientes com periodontite, quando comparada com os controles, e que o tratamento periodontal também reduziu o nível de tais enzimas.

As gelatinases desempenham importante papel no remodelamento tecidual das glândulas salivares, degradando produtos de colágeno desnaturado do estroma, inicialmente degradados pelas collagenases intersticiais presentes na membrana basal do

epitélio glandular (SALO et al., 1983). A MMP-9, juntamente com seus reguladores endógenos (TIMP-1, tripsina-2 e NGAL) está intimamente relacionada com a patogênese da Síndrome de Sjögren. A saliva de pacientes com essa síndrome apresentou nível aumentado de MMP-9, comparado com os controles, e a enzima encontrava-se na forma ativa, indicando o seu papel no remodelamento e/ou destruição da membrana basal presente na estrutura das glândulas salivares (KONTTINEN et al., 1998). Além de ter sido detectado um aumento na quantidade de MMP-9 em pacientes com Síndrome de Sjögren, a relação MMP-9/TIMP-1 também encontrou-se aumentada, indicando que essa relação pode ser a principal responsável pela destruição das glândulas salivares de pacientes portadores de tal síndrome (ASATSUMA et al., 2004).

Outro fator que altera as MMPs salivares é o tabagismo. Na saliva, a quantidade total de MMP-9 foi significativamente menor em pacientes fumantes comparados com os controles, porém não houve diferença entre a quantidade de MMP-9 ativa e nem de MMP-8 (RAITIO et al., 2005).

2.2.8 MMPs X LCNC

Há evidências crescentes indicando que as MMPs, presentes na saliva ou na matriz dentinária, são responsáveis pela degradação da matriz dentinária em lesões cariosas (DAYAN et al., 1983; MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; PASHLEY et al., 2004; SULKALA et al., 2002). A ativação da MMP-2, MMP-8 e MMP-9 foi associada à degradação do colágeno em lesões de cárie. De acordo com Tjäderhane et al (1998), as pró-MMP-2, MMP-8 e MMP-9 latentes são ativadas em pH ácido, seguido de neutralização. A alternância de períodos entre a desmineralização da dentina em pH abaixo de 5,5 e períodos de neutralização por agentes salivares tamponadores proporciona a seqüência na qual as fibrilas colágenas da matriz orgânica dentinária são primeiramente expostas e, em seguida, degradadas pelas **MMPs**. É, portanto, necessária a degradação do colágeno para que ocorra a cavitação (Fig. 2.3).

O mesmo princípio pode ser aplicado ao aparecimento das LCNC. Qualquer processo não ligado à cárie que, inicialmente, dissolva o esmalte e exponha a dentina, pode dar início ao aparecimento de lesões na região da junção cimento/esmalte.

Figura. 2.3 – Efeito da variação do pH bucal e a ativação de **MMPs** no processo de cavitação dentária. IA = ingestão de açúcar; Des. = desmineralização; D. Col. = degradação do colágeno. Esquema adaptado de TJÄDERHANE *et al*, 1998.

A forma dessas lesões seria determinada por agentes mecânicos coadjuvantes do processo de degradação dentária. Acredita-se que a maioria das MMPs da saliva total sejam originárias do sulco gengival, ao redor dos dentes (INGMAN *et al.*, 1994b; SORSA *et al.*, 1992; UITTO *et al.*, 1990; WESTERLUND *et al.*, 1996). Entretanto, achados recentes sugerem que, pelo menos as gelatinases – MMP-2 e MMP-9 - são, também, secretadas pela parótida (BENJAVONGKULCHAI, 1997; MAKELA *et al.*, 1994). A MMP-9, a mais importante das MMPs da saliva total, tem ação de telopeptidase enzimática, isto é, remove os peptídeos terminais (telomas) das fibrilas colágenas antes da degradação da matriz óssea e, possivelmente, dentinária.

Uma vez iniciado o processo de desmineralização, ocorre um aumento da concentração de Ca^{2+} local. No tecido ósseo, o Ca^{2+} contribui para a lise do colágeno, ao mesmo tempo em que aumenta a atividade despolimerizadora do colágeno tipo I, naturalmente ácido-resistente, e da ação telopeptidase da MMP-9 (EECKHOUT, DELAISSE, 1988; WALTERS, EYRE, 1983). Além disso, há evidências da existência de collagenase na matriz dentinária desmineralizada (DAYAN *et al.*, 1983), já que os fibroblastos, responsáveis pela síntese de colágeno, também secretam collagenase e seu inibidor (WELGUS ET AL., 1979), particularmente o hidroxipiridínio ou piridinolina (WALTERS, EYRE, 1983; EECKHOUT, DELAISSE, 1988).

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. Assim, subentende-se a ocorrência de um efeito inibidor das MMPs pelas *collagen-collagenase inhibitor complex* – CCIC, como visto em

lesões cariosas *in vivo* (WELGUS et al., 1979), também designados *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases* – **TIMPs** (KREIS, VALE, 1999; TJADERHANE et al., 1998).

A atividade inibitória dos TIMPs sobre as collagenases intersticiais foi inicialmente demonstrada por Geiger e Harper, (1981). A análise através de SDS-PAGE e *imunoblotting* da superfície radicular de dentes humanos mostrou a presença de TIMP-1 no cimento e na dentina da raiz humana. Na superfície do cimento, foi detectada maior concentração de TIMP-1, que decrescia em direção à junção cimento-dentina e aumentava novamente em direção à pré-dentina. Apesar de até então não se ter comprovação do papel dos TIMPs sobre a raiz, a sua concentração na dentina foi significativamente superior à do cimento, indicando que o maior efeito inibitório dos TIMPs é sobre a dentina (ISHIGURO et al., 1994).

A etiologia das lesões cervicais não cariosas pode ainda estar relacionada com a liberação de MMP-8 no FGC em função da sintomatologia dolorosa da lesão. Sabe-se que a dor de origem pulpar causa a estimulação de imunorreceptores, os quais são responsáveis pela liberação de MMP-8 no FGC (AVELLAN et al., 2005). Algumas lesões cervicais apresentam sensibilidade dolorosa. Há ainda a possibilidade de que a dor decorrente da presença de lesões cervicais não cariosas possa causar também a liberação de MMPs no FGC. Essa correlação ainda não foi comprovada cientificamente, mas abre mais um campo a ser investigado.

2.2.9 Efeito de enzimas e das MMPs sobre a dentina

A perda de estrutura na região cervical pode ser causada por bactérias (lesão cariosa) ou por diferentes mecanismos de desgaste (atrito, abrasão, corrosão e abfração). Ambas as situações parecem ter uma etiologia multifatorial (BARTLETT, SHAH, 2006; VAN HOUTE, 1994). Um fator adicional que tem sido associado a essas lesões é a degradação enzimática.

A destruição da superfície radicular não é causada somente por dissolução da fase mineral na fase de desmineralização, mas também pelo ataque colagenolítico da matriz orgânica durante períodos de aumento do pH (KAWASAKI, FEATHERSTONE, 1997). A adição de enzimas proteolíticas a um sistema ácido *in vitro* sob condições controladas de pH resultou na interação entre acidez e atividade enzimática, produzindo uma lesão erosiva, de aspecto carioso, nas superfícies radiculares. Essa interação indica que as enzimas podem contribuir para a iniciação e/ou progressão da cárie radicular (CLARKSON et al., 1986). A presença de cerca de 35% em volume de colágeno no tecido radicular sugere que, em adição a um ambiente ácido para dissolver os componentes inorgânicos, um mecanismo colagenolítico deveria existir para causar a quebra e remoção da matriz orgânica e levar à cavitação da superfície radicular (KATZ et al., 1987). As fibras colágenas devem estar

suficientemente desmineralizadas para que ocorra proteólise (KLONT, TEN CATE, 1991). Inicialmente, ocorre desmineralização parcial dos cristais minerais e, em seguida, a quebra enzimática acontece (KAWASAKI, FEATHERSTONE, 1997).

Tendo-se demonstrado que as bactérias cariogênicas não possuem atividade collagenolítica ou gelatinolítica (KATZ et al., 1987; TJADERHANE et al., 1998), foi postulado que as bactérias somente não são capazes de produzir lesões de cárie em dentina (KATZ et al., 1987). A degradação do colágeno exposto presente na cárie dental ou em processos erosivos pode ser causada pela atividade combinada de proteases, mais especificamente das metaloproteinases da matriz (MMPs) (NORDBO et al., 2003).

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) seriam responsáveis pela degradação da dentina cariada. A ativação de MMP-2, MMP-8 e MMP-9 desempenha um papel crucial na degradação do colágeno das lesões cariosas (TJADERHANE et al., 1998). O baixo pH (4.5) durante a desmineralização e os períodos de pH neutro devido aos tampões salivares promovem a seqüência necessária para que as fibrilas colágenas sejam primeiro expostas e então degradadas pelas MMPs ativadas durante as alterações de pH (TJADERHANE et al., 1998). Essas condições mimetizam aquelas presentes durante a progressão da cárie e nos processos erosivos (NORDBO et al., 2003).

O colágeno, por si só, não interfere na remineralização das lesões em dentina (FEATHERSTONE, 1994; KLONT, TEN CATE, 1991), mas constitui um suporte necessário para a manutenção da arquitetura dentinária. A observação de que é possível a remineralização e paralisação de lesões radiculares em dentina desencadeou um grande avanço na prevenção da cárie (NYVAD, FEJERSKOV, 1986). A remineralização decresce a susceptibilidade da matriz orgânica à degradação proteolítica e pode, assim, ser importante no processo do controle e paralisação de lesões cariosas em dentina (KLONT, TEN CATE, 1991).

A adição de MMP-8 ativa a uma solução remineralizadora levou a reduzida remineralização na superfície da dentina coronária (NORDBO et al., 2003). Situação similar poderia ocorrer na superfície radicular. Lesões cervicais cariosas (LCC) poderiam estar associadas à presença e atividade das MMPs.

As MMP-8 e MMP-9 são as enzimas principais na degradação do colágeno no Fluido Gengival Crevicular (FGC) e na saliva (AVELLAN et al., 2005; INGMAN et al., 1996; LEE et al., 1995; MAKELA et al., 1994). Estudos anteriores mostraram que as bactérias da placa estimulam a liberação de MMP-8 e ativam a enzima latente (UITTO et al., 1990). Uma vez que as lesões cervicais e radiculares estão localizadas em áreas onde há maior tendência de haver deposição de placa e próximas a regiões onde há liberação de fluido gengival, há

que se verificar a relação entre as MMPs (MMP-8, MMP-2 e MMP-9) e as lesões cervicais, em dentina. Se as MMPs exercerem influência sobre as lesões cervicais, em dentina, talvez seja possível estabelecer uma nova abordagem preventiva para as lesões cervicais radiculares, associadas ou não ao desgaste, através da intervenção sobre a atividade de tais enzimas. Existem inúmeros inibidores das MMPs conhecidos que poderiam ser prescritos para pacientes susceptíveis a tais lesões, como a clorexidina, por exemplo (GENDRON et al., 1999).

3

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Baseando-se na hipótese de que o aparecimento das LCNC e Lesões de erosão radiculares poderia estar relacionado com a presença e atividade das MMPs, este estudo teve como objetivo correlacionar a presença de MMPs/TIMPs com a prevalência de LCNC *in vivo* e estudar o efeito dessas enzimas no desenvolvimento de lesões em dentina radicular *in vitro*.

Objetivos específicos:

3.1 Estudo I

Determinação da expressão de MMP-2 e MMP-9 na saliva de pacientes portadores de lesões cervicais não cariosas

Este estudo teve como objetivo comparar a expressão de MMP-2 e de MMP-9, presentes na saliva total, no fluido gengival crevicular e na saliva coletada da glândula parótida em pacientes portadores e não portadores de LCNC.

Foi testada a hipótese nula de que não há diferença na concentração total de **gelatinases** MMP-2 e MMP-9 e na atividade gelatinolítica entre pacientes portadores e não portadores de LCNC.

3.2 Estudo II

Análise da influência das MMP-8 e MMP-9 no conteúdo mineral de lesões radiculares artificiais, empregando o EDX

Este estudo teve como objetivo investigar se as MMP-8, -9 e os TIMPs têm influência na remineralização de lesões artificialmente criadas na superfície radicular. Nesse caso, a hipóteses nulas a serem testadas foram estas:

3.2.1 – A atividade das MMP-8 e MMP-9 e de seu TIMP não influencia a remineralização de lesões artificiais na dentina radicular;

3.2.2 – O desgaste pela escovação não altera o conteúdo mineral de lesões artificiais na dentina radicular, quando submetidas à presença da MMP-8 e MMP-9 e de seu TIMP;

3.2.3 – A atividade dessas enzimas não altera qualitativamente a constituição do substrato dentinário.

4

4 Material

e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Estudo I

4.1.1 Seleção dos pacientes

Foram investigados 32 pacientes, dos quais 16 eram portadores de LCNC e 16 não apresentavam LCNC, sendo considerados como grupo controle. 14 pacientes eram do sexo feminino e 18 do sexo masculino, de faixa etária entre 19 e 15 anos.

Pacientes com LCNC

Foram selecionados 16 pacientes portadores de LCNC, atendendo aos seguintes critérios de inclusão:

- a – faixa etária entre os 18 e 35 anos de idade;
- b – ausência de doenças sistêmicas;
- c – não estar sob prescrição medicamentosa;
- d – condição dentária e periodontal satisfatória;
- e – dentição completa ou com perda não significativa de dentes;
- f – presença de LCNC, independentemente do padrão da lesão, em pelo menos dois segmentos dos arcos dentários;
- g – boa higiene oral;
- h – sem dependência de drogas;
- i – não estar fazendo bochecho com clorexidina.

Pacientes sem LCNC

Outros 16 pacientes, atendendo aos mesmos critérios de inclusão, exceto por não serem portadores de LCNC foram selecionados e utilizados como controle.

Todos os pacientes responderam a um questionário genérico que será utilizado como base de informações sobre os diferentes aspectos relacionados com o desenvolvimento de LCNC. A seleção e a inclusão dos pacientes no protocolo de pesquisa atenderam às orientações do Comitê de Ética em Pesquisa da FOB, incluindo **Carta de Informação ao Paciente e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**. Esse projeto foi aprovado pelo referido comitê na reunião de 31 de março de 2004, processo número 28/2004.

4.1.2 Obtenção das amostras

As amostras de saliva foram coletadas com o paciente em jejum, ou há pelo menos 2 horas sem a ingestão de alimentos. Imediatamente após a coleta, as amostras de saliva eram armazenadas em nitrogênio líquido (Taylor-Wharton Cryogenics, Theodore, Al, USA), à temperatura de -20°C e em seguida transportadas para um *freezer* a -80°C (HFU- 486 plus – V14, Haraeus Instruments, Hanau, Germany).

▪ Obtenção da Saliva Total

Para a coleta de saliva total, foi seguido o mesmo protocolo-padrão para a determinação da presença de collagenases salivares proposto por Uitto *et al.* (1990). As amostras foram coletadas em períodos padronizados, das 10 às 14 horas. A saliva produzida no primeiro minuto foi descartada. Em seguida as amostras de saliva total foram coletadas em volume mínimo de 3ml, obtidas sem estimulação. As amostras, depositadas em tubos de microcentrifuga Eppendorf (*Protein LoBind Tube* 2,0ml – Cat n^o 2243110-2. Eppendorf AG, Hamburg – Germany) e identificadas conforme sua natureza e origem, foram armazenadas a -80°C até o momento dos testes.

▪ Obtenção da Saliva Parotidiana

Sob estimulação com ácido cítrico, foram coletadas amostras de saliva diretamente da abertura do duto de Stensen, do lado direito da boca, utilizando-se coletores de saliva estéreis (Fig. 4.1.1A) acoplados à sonda uretral número 6 (Sonda Uretral 06 – Tubo de PVC atóxico – Siliconizado. –Lot n^o 3002P0021. Embramed IND.COM LTDA, São Paulo, Brasil). Uma pêra de borracha conectada à sonda (Fig. 4.1.1B), quando pressionada, produz um vácuo no coletor. No momento em que este coletor era adaptado à parte interna da bochecha do paciente, na saída do ducto de Stensen (Fig. 4.1.2A), a pressão sobre a pêra era liberada, para que o coletor se fixasse à bochecha sob pressão negativa. Aguardava-se, então, a saída da saliva através da sonda. Quantidades mínimas de saliva (2ml) eram suficientes para a realização dos ensaios. As amostras de saliva foram coletadas em tubos de microcentrifuga *Eppendorfs* (Fig. 4.1.2B), devidamente identificados e lacrados imediatamente após a sua obtenção e armazenadas sob refrigeração nas condições já descritas.

Figura 4.1.1A – Coletor de saliva.

4.1.1B – Coletor de saliva acoplado à sonda traqueal e à pêra.

Figura 4.1.2A – Adaptação do coletor de saliva à bochecha.

4.1.2B – Coleta da saliva.

▪ Obtenção do fluido gengival crevicular

O fluido gengival crevicular (FGC) foi obtido de acordo com o protocolo proposto por Sorsa et al. (1988): Previamente à coleta do FGC, os pacientes foram analisados quanto à saúde periodontal, sendo apenas incluídos no estudo aqueles considerados clinicamente saudáveis quanto às condições periodontais. No momento da coleta, as faces vestibular e proximais dos pré-molares foram limpas com taça de borracha, pedra-pomes e água para se eliminar a presença de placa supragengival. Em seguida, os dentes foram secos com jato de ar e isolados com rolos de algodão. Assim, foram obtidas amostras de 4 sítios da região de inserção das faces mesial e vestibular de dois pré-molares superiores e dois inferiores. Para tanto, tiras de papel (*Periopaper Gingival Fluid Collection Strips* – PROFLOW Inc. Amityville, New York, USA. Lot nº 6180) foram gentilmente inseridas, na região de inserção das faces mesial e vestibular, aproximadamente 1mm dentro do sulco gengival, sem causar sangramento. O tempo de coleta da amostra foi de 30 segundos. Para cada paciente, obteve-se um *pool* do FGC, através do armazenamento das tiras de papel obtidas dos quatro sítios, as quais foram armazenadas em tubos de microcentrifuga Eppendorf contendo 300µl de tampão 50mM Tris 0,2M de NaCl 10mM CaCl₂ pH 7,4 (INGMAN et al., 1994a) e congeladas a -80°C.

4.1.3 Extração Protéica

Depois de descongeladas, as amostras foram centrifugadas (Jouan Centrifugeur, Paris, Fr) a 13400rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi separado e armazenado em novos tubos de microcentrífuga, descartando-se o precipitado. O sobrenadante foi então levado ao banho-maria (CSE Lab-Line Instruments, Illinois, USA, serial n^o0969, cat n^o13000) a 50°C por 30 minutos. Depois de decorridos os primeiros 5 minutos, as amostras foram levemente agitadas. Após 30 minutos, as amostras foram novamente congeladas até que fossem submetidas à análise quantitativa.

4.1.4 Quantificação Protéica

Para a utilização da mesma massa protéica, foi feita a quantificação de proteínas em todas as amostras estudadas. Assim, o volume utilizado nos ensaios variou, porém a massa permaneceu constante. O Método de Lowry (1951) envolve a adição do reagente de Folin (Quadro 4.1.6) à proteína que se quer quantificar. Em um espectrofotômetro, a absorbância a 660nm de uma proteína de massa conhecida – *Bovine Serum Albumin* (BSA) (Quadro 4.1.6) – foi lida e comparada à absorbância da proteína contida na amostra adicionada ao corante (LOWRY et al., 1951). Foram utilizadas triplicatas.

Método de Lowry:

200µl de solução protéica foram misturados a 2000µl de reagente C. Após 10 minutos, 200µl de reagente de Folin foram acrescentados. Depois de 30 minutos, a absorbância a 660nm foi medida em um espectrofotômetro. A massa protéica foi calculada, com base na absorbância da proteína de concentração conhecida, utilizando-se os seguintes cálculos:

BSA 0,1% (1mg/ml)

Padrão 50: 50 µl amostra (0,050ml)

Volume final da solução: 20 µl (0,2ml)

A partir da fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1 \text{ mg/ml} \times 0,050\text{ml} = C_2 \times 0,2\text{ml}$$

$$C_2 = 0,25\text{mg/ml}$$

Assim, calculou-se a massa da proteína presente na amostra:

Absorbância do Padrão ----- 0,25mg/ml

Absorbância da amostra ----- x

4.1.5 Análise Zimográfica

Vários métodos foram desenvolvidos para acessar a quantidade das formas ativa e latente de enzimas proteolíticas provenientes dos tecidos, fluidos biológicos e de purificações. Um dos métodos mais comuns é a zimografia (KLEINER, STETLER-STEVENSON, 1994), que é uma técnica de eletroforese na qual um substrato protéico, geralmente a gelatina, é co-polimerizado com acrilamida (LAEMMLI, 1970) durante a confecção do gel de separação. As enzimas são separadas sob condições não redutoras, renaturadas com SDS (geralmente Triton X-100) e então incubadas em tampão adequado. As formas inativas das metaloproteinases (zimogênios) são ativadas sob o processo de desnaturação e renaturação. Baseia-se na associação entre digestão do substrato e verificação da massa molecular das proteases (MAKELA et al., 1994). O gel é corado com Coomassie Blue e a presença da enzima é indicada pela ausência de coloração nas áreas (bandas) nas quais o substrato foi degradado. A zimografia fornece informação qualitativa e semiquantitativa (SNOEK-VAN BEURDEN, VON DEN HOFF, 2005). Ela 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.

Etapas da Zimografia:

4.1.5.1. Preparo do Gel de Separação e do Gel de Largada

Primeiramente, o gel de separação (Quadro 4.1.1) foi colocado entre as placas de vidro com o auxílio de uma pipeta e aguardou-se o período de 30 minutos para sua polimerização, em temperatura ambiente. O gel de poliacrilamida contém gelatina (Quadro 4.1.2) como substrato.

Em seguida, o gel de largada (Quadro 4.1.1) foi polimerizado, juntamente com o pente, para a delimitação dos poços de inserção das amostras. O gel foi protegido com gaze embebida em água, para impedir a inibição de sua polimerização pelo oxigênio.

Reagente/Solução	Gel de Separação a 11%	Gel de Largada a 4%
Água deionizada (dH ₂ O)	1325µL	1485µL
30% Acrilamida + 0,8% Bisacrilamida	1825µL	335µL
Tampão do Gel de Separação (Tris Cl) pH 8,8	1250µL	----
Tampão do Gel de Largada (Tris Cl) pH 6,8	-----	625µL
Gelatina	500µL	-----
10 % SDS	50µL	25µL
TEMED	5µL	2,5µL
Persulfato de amônio 10%	50µL	25µL

Quadro 4.1.1 – Descrição dos constituintes do gel de poliacrilamida

4.1.5.2 Padrão de peso molecular

O padrão de peso molecular (*Pre stained SDS-PAGE Standards – Low Range*, Cat n^o 161-0305, Control 300002319. BIO-RAD Laboratories Inc, CA) foi inserido no primeiro poço, calibrado com os pesos moleculares descritos na Fig 4.1.3 que se segue.

BIO-RAD Prestained SDS-PAGE Standards Low Range Catalog 161-0305, Control 300002319	
Protein	Calibrated MW (daltons)
Phosphorylase B	106,904
Bovine serum albumin	93,636
Ovalbumin	52,264
Carbonic anhydrase	37,226
Soybean trypsin inhibitor	28,244
Lysozyme	18,833

CL1610305 REV A
Bio-Rad Laboratories • 2000 Alfred Nobel Drive • Hercules, CA 94547

Figura 4.1.3 – Descrição do marcador de peso molecular.

4.1.5.3 Controles positivos

Os controles positivos foram utilizados para confirmar as bandas correspondentes à MMP-2 e MMP-9. Foram inseridos em poços separados 2µl das enzimas MMP-2 e MMP-9 recombinantes.

4.1.5.4. Inserção das amostras

As devidas concentrações das amostras de saliva foram acrescidas aos volumes de tampão não redutor 4X concentrado, de tal forma que a mesma concentração protéica [1,7] foi mantida para todas as amostras. As amostras foram misturadas ao tampão não redutor e incubadas por duas horas à temperatura de 26°C até o momento de sua inserção. Após o período de incubação, as amostras foram então delicadamente injetadas nos poços, com o auxílio de uma micropipeta. Quantidades protéicas equivalentes foram misturadas a tampão de amostra não redutor na proporção 2:1 e incubadas à temperatura ambiente por 2 horas a 22 °C (KONTTINEN et al., 1998). O tampão de amostra não redutor era composto por 118mM Tris, 64mM H₃PO₄ pH 6,8, 20% glicerol, 0,04% azul de bromofenol e 6% SDS (Quadro 4.1.2).

4.1.5.5 Corrida e incubação do gel

O tampão de corrida foi colocado nas partes superior e inferior do tanque, a câmara de vidro foi colocada dentro da cuba e coberta com tampão. O eletrodo positivo (vermelho) foi ligado à parte inferior da cuba, enquanto o eletrodo negativo (preto) foi acoplado à sua porção superior. As amostras foram submetidas à eletroforese em condições não redutoras (LAEMMLI, 1970). A corrida foi realizada a 4°C em um sistema de separação protéica por eletroforese (Mini-PROTEAN 3 System, Bio-Rad Laboratories, Inc, CA). A voltagem foi fixada em 110volts e então iniciada a corrida, que demorou aproximadamente 1 hora e 45 minutos.

- Após a eletroforese, o gel foi incubado por meia hora, sob suave agitação, a 22°C, o gel foi retirado das placas e transferido para um reservatório contendo 100ml de tampão I (50mM Tris HCl, 2,5% Tween 80, 0,02%(w/v) NaN₃, pH 7,5 a 22°C) (Quadro 4.1.2), e foi incubado, sob suave agitação por 30 minutos.
- Em seguida, a solução foi substituída pelo tampão II (50mM Tris HCl, 2,5% Tween 80, 0,02%(w/v) NaN₃, 1µM ZnCl₂, 5mM CaCl₂) (Quadro 4.1.2) e novamente agitada por mais trinta minutos.
- Por último, o gel foi incubado *overnight* (18 horas) no tampão (50mM Tris HCl, 5 mM CaCl₂, 1µM ZnCl₂, 0,02%(w/v) NaN₃), (Quadro 4.1.2) - pH 7,5 a 37°C para se determinar a atividade das MMPs.

4.1.5.6 Coloração e Descoloração do gel

- Após o período de incubação, o tampão foi substituído por 100ml de solução contendo 0,5% de *Coomassie Blue* (Quadro 4.1.2), 30% de metanol, 10% de ácido acético por um período de 1 hora.
- O corante foi substituído por 100ml de solução descorante (composta de: 10% de metanol, 5% de ácido acético) (Quadro 4.1.2) e o gel foi, em seguida, armazenado em água deionizada.
- Após a incubação no descorante, as proteínas com atividade gelatinolítica foram visualizadas como bandas negativas.

4.1.5.7 Análise Densitométrica

A quantificação é feita através da análise da quantidade de digestão enzimática por meio de um escâner. Os géis são escaneados e então é realizada a densitometria. O escâner registra a densidade para cada *pixel* em uma escala. A densidade da banda é calculada subtraindo-se o *background* ou plano de fundo. Esse método permite que a variável do *background* não interfira na análise das bandas. Os valores são obtidos em percentual da densidade de volume adjacente (ODu/mm^2) (KLEINER, STETLER-STEVENSON, 1994).

O gel foi analisado em um densitômetro (modelo GS-700, Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA), através do programa Quantity (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) (Sorsa, 1994) para a quantificação das bandas.

A verificação da atividade enzimática foi feita como bandas negativas de massa molecular correspondentes às enzimas com atividade gelatinolítica. Através desse processo, puderam-se observar bandas de atividade proteolítica, as quais corresponderam às formas de MMP-2 e MMP-9. De acordo com o peso molecular identificado, pôde-se identificar a atividade gelatinolítica. A MMP-2 é secretada na forma latente de 72 kDa e, quando clivada, adquire a forma de 59-62 kDa (SALO et al., 1983). Por outro lado, 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.

Composto/ Solução	Constituintes	Especificações	Fabricante
Reagente de Folin	<i>Folin Phenol Reagent</i>	F9252 – 100ML	Sigma Aldrich
BSA	<i>Albumin from bovine serum</i>	A2153-10G CAS: 9048-46-8	Sigma Aldrich
Coomassie Blue	<i>Brilliant Blue G250</i> $B_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$	B0770 – 25G CAS:6104-58-1	Sigma Aldrich
Glicerol	<i>Glycerol</i> $HOCH_2CH(OH)CH_2OH$	G5516-100ML	Sigma Aldrich
Azul de bromofenol	<i>Bromphenol Blue</i> $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$	B8026-25G CAS: 115-39-9	Sigma Aldrich
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>	75819 – 100G	USB
Gelatina	$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$ <i>Gelatin Type A</i>	Lot 117736 A8150	Cleaveland, OH, USA Sigma Aldrich
Tris-HCl	<i>Trizma Hydrochloride</i>	T5941-100G CAS: 1185-53-1	Sigma Aldrich
Cloreto de cácio	$CaCl_2$		Sigma Aldrich
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine</i>	T9281-25ML	Sigma Aldrich
APS	<i>Ammonium Persulfate</i>	A3678 – 25G	Sigma Aldrich
Solução Acrilamida/ Bisacrilamida	<i>Acrylamide/Bis-acrylamide, 30% solution</i>	A3699- 100ML	Sigma Aldrich
Azido de Sódio	NaN_3	K20853288 – 100G	Merck - Darmstadt, Germany
Cloreto de Zinco	$ZnCl_2$	229997-10G CAS:7646-85-7	Sigma Aldrich
Tween 80	<i>Polyethylene glycol sorbitan monooleate</i>	P1754-500ML CAS:9005-65-6	Sigma Aldrich
Triton X-100	<i>4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol</i>	X100-100ML CAS:9002-93-1	Sigma Aldrich
Metanol	<i>Methanol</i>	M3641 – 4L	Sigma Aldrich
Ácido Acético	<i>Acetic Acid</i>	A6238 -1L	Sigma Aldrich

Quadro 4.1.2 – Descrição dos compostos e soluções utilizadas para a quantificação protéica e zimografia

4.1.6 Western-blotting

Para se detectar a presença, a densidade e atividade das enzimas MMP-2 e MMP-9 na saliva, a técnica *Western-Blotting* (WB) foi utilizada. Uma vez separadas através de um gel de SDS- poliacrilamida, as proteínas podem ser transferidas por meio de eletroforese a uma membrana de nitrocelulose para a análise de imunodeteção. O bloqueio das proteínas é um método analítico que envolve a imobilização das proteínas em uma membrana antes da detecção através de anticorpos.

4.1.6.1 Descrição do método

Inicialmente, confeccionaram-se os géis de poliacrilamida de separação e de largada. Os compostos utilizados na confecção do gel, assim como o volume empregado, são descritos no Quadro 4.1.3.

Reagente/Solução	Gel de Separação a 11%	Gel de Largada a 4%
Água deionizada (dH ₂ O)	1825µL	1485µL
30% Acrilamida + 0,8% Bisacrilamida	1825µL	335µL
Tampão do Gel de Separação		
(Tris Cl) pH 8,8	1250µL	----
Tampão do Gel de Largada		625µL
(Tris Cl) pH 6,8	-----	
10 % SDS	50µL	25µL
TEMED	5µL	2,5µL
Persulfato de amônio 10%	50µL	25µL

Quadro 4.1.3 – Descrição dos constituintes do gel de poliacrilamida

Em seguida, o tampão de amostra 4X foi adicionado às amostras na proporção de 3:1 (amostra/tampão) em um tubo de microcentrifuga. Após agitação, os tubos foram lacrados e aquecidos a 95⁰-100⁰ C por 5 min.

Após o aquecimento, foram centrifugados por 10 segundos em uma microcentrifuga a 13400rpm. As amostras foram então inseridas nos poços presentes nos géis e separadas via eletroforese em um gel de sódio dodecil sulfato-poliacrimida (SDS-PAGE) 11% (Fig. 4.1.4 A). A eletroforese foi corrida a 150v por aproximadamente 45 minutos (Mini-PROTEAN 3 System, Bio-Rad Laboratories, Inc, CA). Os géis foram removidos das placas de vidro e inseridos em tampão bloqueador por 15 minutos, sob suave agitação (Fig.4.1.4 B). As soluções e materiais utilizados estão descritos no Quadro 4.1.4, detalhadamente.

Procedeu-se, então, à transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose de poro tamanho 0,45µm, em um aparato de transferência semi-seco. Esse método é indicado por possibilitar uma rápida e total transferência das proteínas. O protocolo de transferência foi realizado de acordo com os seguintes passos (Fig. 4.1.4 C-D):

- Cortou-se uma membrana de nitrocelulose e 6 folhas de papel absorvente ligeiramente maiores que o gel de separação, sendo o gel de largada desprezado;
- Sobre o ânodo do aparelho de transferência semi-seco (Semi-Dry transfer System, Bio-Rad), foram colocadas 3 folhas de papel embebidas em tampão bloqueador e, sobreposta a estas, a membrana de nitro celulose, igualmente embebida em tampão de transferência;
- Sobre a membrana colocou-se o gel e, por fim, três folhas de papel absorvente embebidas em tampão;
- O sistema montado foi cuidadosamente pressionado de modo a retirar bolhas de ar que eventualmente diminuiriam o contacto entre o gel de acrilamida e a membrana; o uso de membranas com poro 0,45µm evita a perda de proteínas de baixo peso molecular para as folhas de papel;
- Colocou-se o cátodo; a transferência das proteínas iniciou-se quando aplicada uma corrente constante ao sistema montado. A corrente aplicada foi de 40mA por gel, sendo, aplicada por 60 minutos.

Decorrido esse tempo, as proteínas foram transferidas dos géis para a membrana de nitrocelulose. As membranas foram então inseridas em solução a 5% de leite desnatado (Valio Helsinki, Finland), misturado a 50ml (por gel) de TBST para o bloqueio das proteínas inespecíficas (Fig. 4.1.4 E).

Em seguida, foram realizadas 4 lavagens de 15 minutos com TBST, sob suave agitação. Procedeu-se à incubação *overnight* com os anticorpos primários - monoclonal anti-MMP2 humano e policlonal anti-MMP9 humano (diluição inicial de 1:100), sob suave agitação à temperatura ambiente. No dia seguinte, foram realizadas as 4 lavagens de 15 minutos e as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários policlonal de coelho, anti IgG para MMP-9 e monoclonal anti IgG de rato (1:1000), conjugados à peroxidase (ECL) por uma hora e reveladas com quimiluminescência, seguindo as normas do fabricante (Amershan Pharmacia Biotech Inc., NJ, USA) (Fig. 4.1.4 F). Após mais 4 lavagens de 15 minutos em tampão TBST, as membranas estavam prontas para o processo de detecção. Utilizando-se o sistema de detecção ECL (Amershan Pharmacia Biotech Inc., NJ, USA), as membranas foram reveladas com filme especial (Kodak). Volumes iguais de reagentes ECL (3,20ml de cada reagente) foram misturados e aplicados sobre as

membranas. Após 1 minuto, as membranas foram protegidas por plástico e inseridas em uma câmara de revelação radiográfica. O filme foi colocado sobre as membranas e revelado após decorrido certo tempo (Fig 4.1.4G).

Figura 4.1.4 – Ilustração do protocolo de *western-blotting*: A - Inicialmente, realizou-se a eletroforese. O gel de largada foi descartado. B - O gel de separação foi imerso em tampão bloqueador por 15 minutos. C₁ - O gel foi inserido em um sanduiche composto por folhas de papel absorvente, a membrana de nitrocelulose, o gel e mais folhas de papel absorvente. C - Esse conjunto umedecido em tampão de transferência foi inserido em um aparelho de transferência semi-seco. D - Após a transferência das proteínas para a membrana, essa foi imersa em leite desnatado a 5% para bloqueio das ligações inespecíficas. E - Foi realizada a incubação *overnight* com o anticorpo primário. No dia seguinte, foi realizada a ligação ao anticorpo secundário biotilado. E₁ - O anticorpo primário se liga à MMP presente na membrana; em seguida, o anticorpo secundário com quimioluminescência une-se ao anticorpo primário. F - Enfim, procedeu-se à revelação das membranas utilizando-se o sistema ECL. G - Filme de WB revelado.

Material/ Solução	Constituintes	Especificações	Fabricante
Tampão	10mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,05%		Sigma Aldrich
Bloqueador	Triton X-100, 22mM NaCl, 3% gelatina		
Membrana de Nitrocelulose	BA85 PROTRAN Nitrocellulose Membrane, pore size 0,45µm,.	lot # EM 0779-1	Schleicher & Schuell, WHATMAN Inc., USA.
TBST	10mM Tris-HCl, pH 7,5; 22mM NaCl, 0,05% Triton X-100		Sigma Aldrich
Anticorpo primário Anti MMP-9	MMP-9 Polyclonal antibody	cat n ^o 444236, lot B38819	Calbiochem, Darmstadt, Germany
Anticorpo primário Anti MMP-2	MMP-2 Monoclonal antibody	cat n ^o IM51L, lot D10258-3	Oncogene
Anticorpo secundário Anti MMP-9	MMP-9: ECL Anti-rabbit IgG NA 934, peroxidase-linked (from dunkey)	lot 333492	ECL, Amershan Biosciences GE Healthcare, UK
Anticorpo secundário Anti MMP-2	MMP-2: ECL Anti-mouse IgG NA 931v, horseradish peroxidase linked	lot 324780	ECL, Amershan Biosciences GE Healthcare, UK

Quadro 4.1.4 – Descrição do material e soluções utilizadas para o *western-blotting*

4.1.6.2 Análise dos dados:

Densitometria: A intensidade da atividade gelatinolítica das bandas foi avaliada por meio de um densitômetro (Bio-Rad modelo GS-700), utilizando-se o programa Quantity (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) (Sorsa, 1994). Os resultados foram expressos em % da Densidade de volume adjacente (ODu/mm²) para zimografia e *western-blotting*.

Análise Estatística: as diferenças entre pacientes com e sem lesão cervical não cariosa foram investigadas através do teste t de Student (dados paramétricos) e Mann-Whitney (dados não paramétricos), utilizando-se o programa Sigma Stat 3.1 (Jandel Scientific Software, San Rafael, USA). O nível de significância considerado foi de 5% (p<0,05).

4.1 – Estudo II

4.2.1 Seleção dos Espécimes

Esse protocolo foi submetido à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. O projeto foi aprovado pela referida comissão no dia 31 de maio de 2006, parecer número 588/2006, registro no CONEP número 12878.

Foram obtidos 40 terceiros molares inferiores livres de cárie, sob o consentimento livre e esclarecido dos pacientes. Os dentes, extraídos por motivos não relacionados com o interesse deste estudo, foram armazenados a 4°C, em solução contendo 0.9% NaCl e 0,02% azido de sódio (PASHLEY et al., 2004).

4.2.2 Grupos Experimentais

Os segmentos radiculares foram aleatoriamente alocados aos diferentes grupos de estudo. Para o delineamento do experimento, os espécimes foram divididos em dois grupos principais: Grupo A, com 35 espécimes sem escovação e o Grupo B, também com 35 espécimes, submetido à escovação para se verificar o efeito do desgaste mecânico sobre a “lesão” artificial radicular. O protocolo dos tratamentos aplicados aos grupos está descrito no esquema que se segue (Fig 4.2.1).

O grupo controle (10 espécimes) foi deixado sem tratamento e armazenado a 4°C a 100% de umidade. O Grupo 1A (5 segmentos) não foi submetido ao desgaste por abrasão e o Grupo 1B (5 segmentos) foi escovado para se verificar o efeito do desgaste mecânico sobre a superfície radicular sem desmineralização. O protocolo dos tratamentos aplicados aos grupos está ilustrado no esquema que se segue (Fig. 4.2.1).

Figura 4.2.1 – Fluxograma do protocolo de estudo. Os espécimes foram divididos em grupos e subgrupos conforme os tratamentos a que foram submetidos. Do grupo controle (10), o Grupo A1 (5) não foi desmineralizado e foi deixado sem tratamento, o Grupo B1 (5) também foi deixado sem tratamento; mas foi submetido à escovação simulada. Os demais espécimes do Grupo A foram desmineralizados por 14 dias e do Grupo B desmineralizados por 14 dias e submetidos à escovação simulada. Como controle do nível de desmineralização, os espécimes dos grupos A2 (5) e B2 (5) foram somente desmineralizados por 14 dias. Os espécimes dos Grupos A3 (5) e B3 (5) foram desmineralizados e remineralizados. O Grupo A4 (5) e B4 (5) foram desmineralizados por 14 dias, imersos em tampão neutro por 2 dias e remineralizados por 7 dias. Os Grupos A5 (5) e B5 (5) foram desmineralizados por 14 dias e imersos em solução de remineralização contendo TIMP por 7 dias. Os Grupos A6 (5) e B6 (5) foram desmineralizados por 14 dias e imersos em solução de remineralização contendo MMP-8 e -9 por 7 dias. Os Grupos A7 (5) e B7 (5) foram desmineralizado por 14 dias, e imersos em solução de remineralização MMP-8, -9 e TIMP por 7 dias.

4.2.3 Preparo dos Espécimes

Utilizando-se um disco diamantado (Buehler Ltd, Evanston IL), os dentes foram seccionados horizontalmente na junção cimento-esmalte desprezando-se a porção coronária. Em seguida, as raízes foram separadas verticalmente em dois espécimes independentes (Fig.4.2.2; Fig. 4.2.3 A-C).

Figura 4.2.2 – Ilustração esquemática da preparação dos espécimes. Inicialmente, o dente foi cortado horizontalmente na junção cimento-esmalte e dividido em duas partes. A porção radicular foi, então, seccionada verticalmente, proporcionando dois segmentos radiculares.

4.2.4 Criação das “lesões” de erosão radiculares

Grupo A

Toda a superfície exposta da raiz foi recoberta com esmalte para unhas, (Risqué, São Paulo, Brasil) exceto 2mm X 5mm na região cervical. Conforme apresentado no fluxograma (Fig. 4.2.1), os espécimes do Grupo 2 (60 segmentos) foram submetidos a dois protocolos diferentes. O Grupo A (30 segmentos) foi imerso em solução desmineralizante por 14 dias para simular uma “lesão” de erosão radicular. Todas as soluções utilizadas nesse estudo estão descritas no Quadro 4.2.1.

Solução	Constituintes
Tampão neutro	0.1M tampão HEPES a pH.7.0
Tampão HEPES	(N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
Solução de Desmineralização	Ácido acético, 0.05moles/l; CaPO_4 , 2.2mmoles/l; pH 4.3. Thimol a 0.03% será adicionado à solução de estoque para prevenir crescimento bacteriano.
Solução de Remineralização	Tampão HEPES, 20mmoles/l; cálcio 1.5mmoles/l como CaCl_2 ; fosfato 0.9mmoles/l como K_2HPO_4 ; flúor 10ppm como NaF; pH 7.0.
Metaloproteinases da Matriz MMP-8	Proenzyme, Human Neutrophil (Cat. No. 444229): Calbiochem. Para se obter 0.55 μg da enzima na concentração [105 $\mu\text{g/ml}$], 5.23 μl foram utilizados após ativação com 0.5 μl de APMA por 1 hora a 37 °C.
Metaloproteinases da Matriz MMP-9	Proenzyme, Human (Cat. No. PF038): Calbiochem Para se obter 0.55 μg da enzima na concentração [0,96 $\mu\text{g/ml}$], 0.57 μl foram utilizados após ativação com 0.05 μl de APMA por 1 hora a 37 °C.
Inibidor Tissular metaloproteinase da matriz TIMP-2	Human Rheumatoid Synovial Fibroblast (Cat. No. 61208): Calbiochem. Para 0.30 μg de enzima na concentração [40 $\mu\text{g/ml}$], 7.5 μl de TIMP-2 foram utilizados.

Quadro 4.2.1 – Substâncias químicas e reagentes utilizados no Estudo II.

4.2.5 Técnica de Escovação

Grupo B

Preparo dos Espécimes

Os segmentos de raiz (Fig. 4.2.3 D) foram embebidos em resina (TPH; Dentsply, Petropolis, RJ, Brasil) em um molde de aço inoxidável de 15mm de comprimento x 5mm de largura x 3 mm de espessura (Fig. 4.2.3 E). Os espécimes (Fig. 4.2.3 I) foram polidos com discos de lixa de papel de Al_2O_3 granulação 600 e 1000, imersos em água deionizada e limpos em ultra-som por 10 minutos para remoção de resíduos. Toda a superfície exposta da raiz foi recoberta com esmalte para unhas, (Risqué, São Paulo, Brasil) exceto 2mm X 5mm na região cervical (Fig.4.2.3-J). O Grupo B (30 segmentos): foi desmineralizado por 14 dias (Fig. 4.2.3. K) e escovado em seguida (Fig. 4.2.3 M), para ocasionar o desgaste dentinário, simulando uma “lesão” de abrasão e erosão.

Escovação

Exceto para o Grupo 1B (controle), após a desmineralização dos espécimes, foi realizada a escovação simulada (Fig. 4.2.3 M). As cabeças das escovas macias (Oral B Advantage Ártica, #35) foram adaptadas na máquina de desgaste por escovação. A amplitude do movimento foi de 3,8cm com 200gramas de peso. Os espécimes foram submetidos a 100.000 ciclos, correspondendo a 4,2 anos de escovação (MONDELLI et al., 2005; WANG et al., 2004). Após 50.000 ciclos, as cabeças das escovas foram trocadas.

Foi utilizado um dentifrício isento de flúor, constituído pelos seguintes componentes: celulose microcristalina, carboximetil celulose sódica, sorbitol, lauril sulfato de sódio, metilparabeno, propilparabeno, carbonato de cálcio, sílica gel, glicerina, sacarina e corante amarelo. (CI 19140, CI 42090 – Farmácia Específica – Bauru, SP, Brasil). A pasta empregada na escovação foi preparada com 50 gramas de dentifrício e 100 gramas de água deionizada, sendo renovada a cada 10.000 ciclos. O pH da pasta foi verificado durante o teste, apresentando média final de 8,5 (MONDELLI et al., 2005; WANG et al., 2004).

Após a escovação, os espécimes foram novamente limpos em ultra-som por 10 minutos para remoção de resíduos.

Figura 4.2.3 – Preparo dos espécimes e escovação simulada. A – Fixação do espécime em uma base para adaptação à máquina de corte; B – Corte da porção coronária do dente; C – corte da porção radicular do dente; D – Obtenção dos dois segmentos radiculares; E – Matriz de aço para inserção dos segmentos; F – Condicionamento ácido da face lingual da raiz; G – Aplicação do sistema adesivo na face lingual da raiz; H - Inserção da resina composta ao redor do segmento radicular; I – Bloco da raiz inserida na resina; J – Proteção da região cervical da raiz com fita adesiva e aplicação de esmalte incolor para impermeabilização de todas as demais faces do bloco de resina e da raiz; K – Imersão do espécime em solução de desmineralização; L – Proteção da raiz com fita adesiva, exceto na região cervical; M - Escovação simulada da região cervical; N – Remineralização dos espécimes (somente G3B-G7B) .

4.2.6 Controle do nível de desmineralização/desgaste

Os espécimes do Grupo 2 (10 segmentos), submetidos (G2B) ou não à escovação (G2A) não receberam nenhum tratamento adicional e foram mantidos a 100% de umidade a 4^oC, como controle do nível de desmineralização e desgaste da “lesão” de erosão (NORDBO et al., 2003).

4.2.7 Remineralização

Após serem desmineralizados por 14 dias, e submetidos (G3B) ou não à escovação (G3A), os segmentos radiculares pertencentes ao Grupo 3 (10 segmentos) foram expostos por 7 dias a 37^oC em 25ml de solução remineralizadora (Quadro 4.2.1) para estabelecer o padrão “normal” de remineralização da dentina na área em questão (NORDBO et al., 2003).

4.2.8 Rotina de exposição aos tratamentos adicionais

Após serem desmineralizados por 14 dias e submetidos (GB4-7) ou não (GA4-7) à escovação simulada (Fig. 4.2.3 M), os segmentos radiculares sofreram, então, os seguintes tratamentos (NORDBO et al., 2003):

Grupo 4: Tampão neutro por 2 dias, seguido de solução remineralizadora por 1 dia (10 segmentos) (Quadro 4.2.1).

Grupo 5: Armazenamento em solução remineralizadora (à qual TIMP-2 foi adicionado (10 segmentos) (Quadro 4.2.1).

Grupo 6: Armazenamento em solução remineralizadora à qual MMP-8 e MMP-9 ativas foram adicionadas (10 segmentos) (Quadro 4.2.1).

Grupo 7: Armazenamento em solução remineralizadora à qual TIMP- 2, MMP-8 e MMP-9 ativas foram adicionados (10 segmentos) (Quadro 4.2.1).

4.2.9 Exposição da lesão

Após os tratamentos, todos os espécimes foram seccionados com um disco diamantado (Buehler Ltd, Evanston IL) no sentido longitudinal, para possibilitar a exposição da “lesão” artificial e análise em microscópio eletrônico (Hitachi S-4800, Hitachi High-Technologies Corporation, Japan).

4.2.10 Análise dos espécimes

Preparo dos Espécimes

O esmalte de unha foi removido e os espécimes foram polidos com discos de lixa de carbetto de silício de granulação 600 e 1000, seguidos de discos de alumínio de 15µm a 1µm (NORDBO et al., 2003). Em seguida, os espécimes foram lavados em ultra-som contendo água deionizada por 10 minutos. Uma vez que o objetivo deste trabalho foi realizar uma análise elemental, a desidratação dos espécimes foi executada procurando-se interferir o mínimo possível na estrutura do tecido. Por essa razão, não foi realizada a desidratação com substâncias químicas. Os segmentos radiculares foram desidratados em estufa a 37°C e armazenados em um dessecador contendo sílica gel por 7 dias. Os espécimes foram montadas em *stubs* de alumínio sobre fita dupla-face contendo carbono (Carbon Conductive Tape, Double Coated - 3M) e recobertos a vácuo com uma camada uniforme de carbono (~20 nm) em um *sputter-coater* (Cressington Carbon Coater) para eliminar o acúmulo de eletricidade, ou *charge* (CHU et al., 1989).

4.2.10.1 Análise Elemental

Espécimes representativos de cada grupo foram tratados e analisados em Microscópio Eletrônico de Varredura com Emissão de Campo, denominado *Field Emission Scanning Electron Microscope* (FESEM) (Hitachi S-4800, Hitachi High-Technologies Corporation, Japan).

Para a avaliação do conteúdo mineral, a análise elemental dos espécimes foi realizada através do FESEM equipado com uma sonda eletrônica ou *Electron Probe Microanalyser* (EPMA). O EPMA tem como princípio a incidência de elétrons de uma determinada energia, os quais bombardeiam a amostra, causando a emissão de raios-x, que rastreiam os minerais e indicam os níveis de minerais, tais como cálcio, fosfato, magnésio em % de peso, indicando o nível de mineralização após os procedimentos de Des-Re (NGO et al., 1997). O EPMA oferece um modo simples e preciso de determinação das profundidades da desmineralização da dentina (NGO et al., 1997). Esse instrumento permitiu a identificação tanto qualitativa quanto quantitativa da composição dos elementos Ca^{2+} , PO_4^{3-} , Mg^{2+} , assim como a relação molar Ca/P e Mg/Ca. O EPMA foi operado à voltagem de aceleração de 15kv E_{av} 20nA (NGO et al., 1997; NORDBO et al., 2003). A análise foi realizada em pontos contíguos em intervalos de 10µm a partir da superfície externa radicular em direção à dentina interna. Foram tomadas 8-10 mensurações em intervalos de 10 µm ao longo da linha transversal perpendicular à superfície externa e ainda

duas medidas adicionais, a 150 e 300 μ m. Foi comparado o conteúdo mineral dos grupos a 20, 30 e 50 μ m. O diâmetro da sonda eletrônica foi de 2 μ m e o tempo de contagem de 5 segundos em cada ponto a uma magnificação de 300 X.

4.2.10.2 Imagens por retrodispersão (BSE)

A avaliação qualitativa do grau de mineralização dos espécimes foi realizada utilizando-se imagens por retrodispersão, ou *Back-Scaterring* (BSE). A análise por retrodispersão foi utilizada para demonstrar a distribuição global da densidade mineral (TJADERHANE et al., 1995). Quanto maior o elemento atômico do material, maior retrodispersão irá ocorrer. Quando um feixe de elétrons atravessa uma região de baixo peso molecular para uma área de alto peso molecular, o sinal decorrente da retrodispersão e, conseqüentemente, o brilho da imagem irá aumentar. Como resultado desse fenômeno, há formação de uma imagem de diferentes contrastes causada pela diferença do peso molecular dos elementos que compõem a amostra. As diferenças no grau de mineralização dos tecidos duros podem ser visualizadas como mudanças nos níveis de cinza, sendo que, quanto mais escuro, menor o conteúdo mineral (HALSE, 1971).

4.2.10.3 Análise dos Dados

A análise elemental proporcionou resultados em % de peso dos minerais presentes na estrutura da dentina, os quais foram comparados utilizando-se os testes t de Student e Student-Newman-Keuls para comparações *Post hoc*, considerando-se um índice de significância de 5%, através do programa Sigma Stat 3.1 (Jandel Scientific Software, San Rafael, USA).

5

Resultados

5

5 RESULTADOS

5.1 Estudo I

5.1.1 Zimografia da Saliva Total

Os zimogramas da saliva total demonstraram múltiplas bandas com atividade gelatinolítica, tanto em pacientes com LCNC quanto sem LCNC. Foram detectadas bandas correspondendo às formas pró e ativas de MMP-9 e pró-MMP-2, assim como formando complexos (bandas: >160, 121, 113 e 102kDa) e formas fragmentadas (50kDa) (Fig. 5.1.1.1). Apesar de a análise densitométrica ter apontado maior atividade gelatinolítica nos pacientes com LCNC, não houve diferença, estatisticamente significativa.

Tabela 5.1.1.1 – Análise comparativa da expressão das gelatinases da saliva total de pacientes com e sem LCNC

Banda	Com LCNC (n=16)		Sem LCNC - (n=16)		Valor de P/ Teste
>160kDa complexo	1.219	(0.599) ^a	1.064	(0.673) ^a	(P = 0.495) Student t-test
121 kDa complexo	0.539	(0.585) ^a	0.436	(0.416) ^a	(P = 0.749) Mann-Whitney
113 KDa complexo	0.444	(0.516) ^a	0.457	(0.527) ^a	(P = 0.865) Mann-Whitney
102 kDa	0.871	(0.705) ^a	0.629	(0.525) ^a	(P = 0.474) Mann-Whitney
Pro MMP-9 89 kDa	0.961	(0.793) ^a	0.762	(0.644) ^a	(P = 0.522) Mann-Whitney
Act MMP-9 77kDa	0.422	(0.578) ^a	0.377	(0.388) ^a	(P = 1.000) Mann-Whitney
Pro MMP-2 64kDa	0.269	(0.333) ^a	0.309	(0.380) ^a	(P = 0.955) Mann-Whitney
50 kDa	0.187	(0.155) ^a	0.221	(0.208) ^a	(P = 0.613) Mann-Whitney
Total de atividade gelatinolítica	78,61	(5,82) ^a	68.07	(4.406) ^a	(P=0.798) Mann-Whitney

Tabela 5.1.1.1 - Expressão de gelatinases na saliva total de pacientes com (LCNC+) e sem lesões cervicais não cariosas (LCNC-). n = número de pacientes examinados. Os valores representam a Densitometria (% Densidade de volume adjacente), expressos em média (desvio-padrão). Letras sobrescritas iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre colunas (Testes t de Student e Mann-Whitney p<0,05).

Figura 5.1.1.2 – Zimografia da Saliva Total (A) e FGC(B). Pacientes com lesão cervical não cariosa: Com LCNC (n=16), pacientes sem lesão cervical não-cariosa: sem LCNC (n=16); MWS: padrão de peso molecular; MMP-9, MMP-2: controles positivos.

5.1.2 Zimografia da Saliva da Parótida

Como a Fig. 5.1.1.2 abaixo demonstra, não foram observadas bandas significativas correspondentes às MMPs nas amostras de saliva obtidas da parótida e, por essa razão, não se fez necessária a quantificação através de densitômetro.

Figura 5. 1.1.2 – Zimografia da saliva da Parótida; LCNC +: pacientes com lesão cervical não cariosa; LCNC-: pacientes sem LCNC; MWS: padrão de peso molecular; MMP-9: controle positivo.

5.1.3 Zimografia do Fluido Gengival Crevicular

Os zimogramas das amostras do FGC também demonstraram múltiplas bandas com atividade gelatinolítica, tanto em pacientes do grupo com LCNC quanto do grupo sem LCNC. A maior diferença em relação à saliva total foi a ausência virtual de bandas correspondendo à MMP-2 e a ausência de bandas indicando fragmentos de baixo peso molecular. Também não foi detectada diferença, estatisticamente significativa, no total de atividade gelatinolítica entre os grupos ($p > 0.05$; Student t-test) (Tab. 5.1.1.2).

Tabela 5.1.1.2 - Análise comparativa da expressão das gelatinases do fluido gengival crevicular entre pacientes com e sem LCNC, pelo método da Zimografia.

Banda	Com LCNC (n=16)		Sem LCNC (n=16)		Valor de P/ Teste
>160kDa complexo	0.519	(0.306) ^a	0.687	(0.461) ^a	P = (0.376) Mann-Whitney
121 kDa complexo	0.386	(0.255) ^a	0.575	(0.486) ^a	(P = 0.179) Student t-test
113 KDa complexo	0.318	(0.193) ^a	0.455	(0.341) ^a	(P = 0.291) Mann-Whitney
102 kDa	0.328	(0.348) ^a	0.344	(0.443) ^a	(P = 0.836) Mann-Whitney
Pro MMP-9 89 kDa	0.437	(0.254) ^a	0.665	(0.458) ^a	(P = 0.214) Mann-Whitney
Act MMP-9 77kDa	0.212	(0.188) ^a	0.392	(0.395) ^a	(P = 0.376) Mann-Whitney
Pro MMP-2 64kDa	0		0		0
50 kDa	0		0		0
Total de atividade gelatinolítica	4.138	(2.766) ^a	6.169	(4.202) ^a	(P = 0.273) Student t-test

Expressão de gelatinases fluido gengival crevicular de pacientes com LCNC e sem LCNC. n = número de pacientes examinados. Os valores representam a Densitometria (% Densidade de volume adjacente), expressos em média (desvio-padrão). Letras sobrescritas iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre colunas (Testes t de Student e Mann-Whitney $p < 0.05$).

5.1.2 Western-blotting

Os *Western-blottings* (WB) demonstraram que a principal gelatinase presente, tanto na saliva total (Fig. 5.1.2.1) quanto no FGC, foi a MMP-9 (Fig. 5.1.2.2). Pacientes com LCNC apresentaram total de atividade gelatinolítica maior (Fig. 5.1.2.1), sendo estatisticamente significativa (Teste Mann-Whitney, $p < 0,05$) (Tab. 5.1.2.1), porém não houve diferença quanto à presença de bandas correspondentes à proMMP-9 e à MMP-9 ativa. Nos WB para a MMP-2, tanto na saliva total (Fig. 5.1.2.3) quanto no FGC (Fig. 5.1.2.4), bandas suaves, correspondendo à forma fragmentada da enzima, foram visualizadas (56 kDa).

Tabela 5.1.2.1 - Análise comparativa da expressão de MMP-9 na saliva total de pacientes com e sem LCNC, pelo método WB.

Banda	Com LCNC (n=16)		Sem LCNC (n=16)		Valor de P / Teste
>160kDa complexo	9.04	(96.5) ^a	6.53	(3.50) ^a	(P = 0.30) Mann-Whitney
121 kDa complexo	1.60	(1.7) ^a	1.09	(1.09)	(P = 0.53) Mann-Whitney
113 KDa complexo	0.70	(1.05) ^a	0.57	(0.72) ^a	(P = 0.99) Mann-Whitney
102 kDa	0.80	(0.82) ^a	0.67	(0.76) ^a	(P = 0.75) Mann-Whitney
Pro MMP-9 89 kDa	1.38	(2.05) ^a	0.75	(0.95) ^a	(P = 0.65) Mann-Whitney
Act MMP-9 77kDa	1.13	(1.32) ^a	0.50	(0.42) ^a	(P = 0.51) Mann-Whitney
64kDa	1.07	(2.09) ^a	0.44	(0.72) ^a	(P = 0.99) Mann-Whitney
50 kDa	1.01	(1.14) ^a	0.3	(0.25) ^b	(P = 0.04) Mann-Whitney
Total de atividade gelatinolítica	33.6	(45.1) ^a	21.7	(33.65) ^b	(P = 0.04) Mann-Whitney

Expressão de MMP-9 na saliva total de pacientes com LCNC e sem LCNC. n = número de pacientes examinados. Os valores representam a Densitometria (% Densidade de volume adjacente), expressos em média (desvio-padrão). Diferentes letras sobrescritas indicam diferenças, estatisticamente significantes, entre colunas (Testes t de Student e Mann-Whitney $p < 0,05$).

Figura 5.1.2.1 — *Western-blot* para MMP-9 da saliva total. Pacientes com lesão cervical não cariosa: LCNC + (n=4), pacientes sem lesão cervical não-cariosa: LCNC - (n=4); MWS: padrão de peso molecular; MMP-9: controle positivo.

Figura 5.1.2.2 — *Western-blot* para MMP-9 do fluido do sulco gengival. Pacientes com lesão cervical não cariosa: LCNC + (n=4), pacientes sem lesão cervical não-cariosa: LCNC - (n=4); MWS: padrão de peso molecular; MMP-9: controle positivo.

Figura 5.1.2.3 — *Western-blot* para MMP-2 do fluido do sulco gengival. Pacientes com lesão cervical não cariosa: LCNC + (n=4), pacientes sem lesão cervical não cariosa: LCNC - (n=4); MWS: padrão de peso molecular; MMP-2: controle positivo.

Figura 5.1.2.4 — *Western-blot* para MMP-2 da saliva total. Pacientes com lesão cervical não cariosa: LCNC + (n=4), pacientes sem lesão cervical não-cariosa: LCNC - (n=4); MWS: padrão de peso molecular; MMP-2: controle positivo.

5.2 Estudo II

5.2.1 Efeito da escovação, desmineralização e remineralização

A escovação, isoladamente, não exerceu nenhum efeito significativo sobre a distribuição dos elementos minerais (Student t-test, $p > 0,05$), apesar de haver uma tendência a uma redução no conteúdo de Mg^{2+} nos espécimes submetidos à escovação (Fig.5.2.1.1B). Quando a escovação foi realizada após a desmineralização (G2B), o conteúdo de Mg^{2+} foi significativamente maior nas camadas subsuperficiais ($p = 0,05$ em $30 \mu m$ e $p = 0,006$ em $50 \mu m$) (Student t-test) (Fig. 5.2.1.1D) (Tab. A.3, Apêndice A). Quando os segmentos radiculares foram remineralizados, os espécimes submetidos à escovação (G3B) demonstraram conteúdo de Ca^{2+} significativamente maior ($p = 0,045$) (Student-Newman-Keuls Method) na superfície imediata (Fig. 5.2.1.1E) (Tab. A.1, Apêndice A). Não foram detectadas diferenças significativas (Student t-test, $p > 0,05$) no conteúdo de P em nenhuma das situações (Tab. A.2, Apêndice A).

Figura 5.2.1.1 – Conteúdo de Ca^{2+} e Mg^{2+} nas diferentes profundidades a partir da superfície. Efeito da escovação (A, B) ou com desmineralização seguida da escovação (C, D) e após a remineralização (E, F) da dentina. Barras brancas: sem escovação; barras pretas: espécimes submetidos à escovação. * indica diferença estatisticamente significativa em relação aos espécimes ($p < 0,05$, Student t-test e Student-Newman-Keuls Method para comparações *Post hoc*).

5.2.2 Efeito das MMPs e TIMPs

O efeito das MMPs e TIMPs sobre o conteúdo de Ca^{2+} (Tab. A.1, Apêndice A) e Mg^{2+} (Tab. A.3, Apêndice A) está descrito detalhadamente na Fig. 5.2.2.2 A-D. Para os espécimes escovados (GB5) (Fig. 5.2.2.2 A), na presença dos TIMPs houve redução do conteúdo de Ca^{2+} a 20 μm quando comparados com os grupos imersos em HEPES (GB4) com a combinação MMPs + TIMPs (GB7). Para os espécimes não escovados (Fig. 5.2.2.2 B), em todas as profundidades medidas, os espécimes incubados com MMPs (GA6) apresentaram maiores valores de Ca^{2+} . Aqueles na presença de MMPs (GA6) mostraram maior conteúdo de Ca^{2+} em 50 μm quando comparados com aqueles imersos na solução tampão HEPES (GA4), sendo a diferença estatisticamente significativa (Student-Newman-Keuls Method, $p = 0,046$). Para as amostras escovadas (GB6) (Fig. 5.2.2.2 C) e não escovadas (GA6) (Fig. 5.2.2.2 D), apesar de não haver diferença estatisticamente significativa no conteúdo de Mg^{2+} , em todas as medidas, menores valores de Mg^{2+} foram observados nos grupos em que as MMPs foram adicionadas à solução de remineralização.

Figura 5.2.2.2 – Efeito das MMPs e TIMPs sobre o conteúdo de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Letras sobrescritas iguais indicam diferenças estatisticamente significativas. A – Efeito da desmineralização, escovação e remineralização com HEPES (GB4), TIMP (GB5), MMPs (GB6) e TIMPs + MMPs (GB7) no conteúdo de Ca^{2+} a 20, 30 e 50 μm . B – Efeito da desmineralização e remineralização com HEPES (GA4), TIMP (GA5), MMPs (GA6) e TIMPs + MMPs (GA7) no conteúdo de Ca^{2+} a 20, 30 e 50 μm . C – Efeito da desmineralização, escovação e remineralização com HEPES (GB4), TIMP (GB5), MMPs (GB6) e TIMPs + MMPs (GB7) no conteúdo de Mg^{2+} a 20, 30 e 50 μm . D – Efeito da desmineralização e remineralização com HEPES (GA4), TIMP (GA5), MMPs (GA6) e TIMPs + MMPs (GA7) no conteúdo de Mg^{2+} a 20, 30 e 50 μm .

O efeito das MMPs e TIMPs sobre o conteúdo de Ca^{2+} está descrito detalhadamente na Fig. 5.2.2.3 A-B. Nos espécimes não escovados, menores valores foram detectados nos segmentos incubados com TIMP (* significativamente diferente do grupo Controle e do grupo com MMP+TIMP; $p < 0.05$) (Fig. 5.2.2.3A). Nos espécimes escovados, maiores valores foram observados nas amostras incubadas com MMPs a $50\mu\text{m}$ (* significativamente diferente do grupo controle, $p < 0.05$) (Fig. 5.2.2.3B) (Tab. A.1, Apêndice A).

Figura 5.2.2.3 – Conteúdo de Ca^{2+} após incubação com MMPs/TIMPs. A figura mostra o conteúdo de Ca^{2+} após a incubação dos espécimes com tampão neutro (control) somente com TIMP, com MMP-8/MMP-9 e com a combinação de TIMP + MMP-8/MMP-9 na solução de remineralização.

5.2.3 Razão Ca/P e Mg/Ca

- **Efeito da escovação**

Nos espécimes que não sofreram nenhum tratamento, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na razão molar Ca/P entre os grupos que foram escovados (G1BxG1A) e os não- escovados (Student t-test, $p>0,05$) (Tab. A.4, Apêndice A).

- **Efeito da escovação, desmineralização e remineralização**

Os espécimes desmineralizados, escovados e remineralizados (G3B) apresentaram maior razão molar Ca/P a 20 μ m quando comparados ao grupo não escovado (G3A) (Student t-test, $p = 0.024$) (Tab. A.4, Apêndice A).

- **Efeito das MMPs e TIMPs**

Nos grupos submetidos à desmineralização, escovação e remineralização, a razão molar Ca/P foi maior para o grupo imerso em TIMPs (GB5) quando comparada aos grupos imersos em tampão HEPES (GB4) ou em solução de remineralização contendo MMP + TIMPs (GB7) (Student-Newman-Keuls, $p = 0.013$). Nos grupos não escovados, o efeito das MMPs e TIMPs (GB5-GB7) não ocasionou diferença significativa na razão molar Ca/P (Tab. A.4, Apêndice A).

Para a razão molar Mg/Ca a 50 μ m submetido à escovação, foi detectada diferença, estatisticamente significativa, entre os grupos GB2XGB6, GB2XGB3, GB4XGB6,GB4XGB7, como indicado na tabela (Tab. A.5, Apêndice A) (Testes One-way ANOVA e Student-Newman-Keuls, $p<0,05$).

5.2.4 Imagens em BSE

Algumas imagens em BSE suportam o achado de que espécimes submetidos à escovação e a des- remineralização com uma zona superficial hipermineralizada, sugem conteúdo de Ca^{2+} significativamente maior do que as não escovadas (Fig. 5.2.5.1).

Figura 5.2.5.1 –Fotomicrografia por retrodispersão (BSE) do espécime não escovado (A) e escovado (B) após a des-remineralização. A superfície do espécime submetido à escovação demonstra claramente uma zona hipermineralizada superficial.

Porém, o padrão de distribuição mineral nas amostras sofreu grande variação. A Fig.5.2.5.2 é um exemplo de um espécime desmineralizado por 14 dias, não submetido à escovação e incubado em solução remineralizadora com MMPs (G6A). A chave vermelha mostra a profundidade de 20 μm , a amarela a profundidade de 50 μm e a branca 100 μm (de acordo com a escala no canto esquerdo inferior da imagem). Nessa imagem, é também possível a visualização de uma superfície hipermineralizada. A figura (Fig.5.2.5.2) mostra ainda uma subsuperfície desmineralizada, que se estende até a profundidade de 100 μm .

Figura 5.2.5.2 – Fotomicrografia em BSE de um espécime do Grupo 6A (desmineralizado por 14 dias, não escovado e incubado em solução remineralizadora com MMPs).

As Fig. 5.2.5.3 – 5.2.5.9 exemplificam o perfil linear de distribuição mineral nos espécimes pertencentes aos diferentes grupos. À esquerda, imagens em BSE mostrando a fotomicrografia da região da raiz em que foi criada a lesão artificial. À direita, perfis lineares obtidos pelo EDX mostrando o mapa dos elementos minerais a partir da superfície, em intervalos de medida de 10 μ m até 150 μ m de profundidade, e então a 300 μ m. Cada espectro mostra a presença de picos correspondendo aos elementos F⁻, Na⁺, Mg²⁺, PO₄³⁻, S²⁻, Cl⁻, K⁺ e Ca²⁺. Para análise dos resultados numéricos, foi dada ênfase ao conteúdo de Ca²⁺, Mg²⁺ e PO₄³⁻, pois estes são os elementos minerais mais relevantes na observação de alterações de mineralização que ocorrem na estrutura dentinária. O conteúdo de flúor incorporado foi muito pequeno e por isso os dados numéricos não foram comparados. Note que a escala do perfil linear foi gerada automaticamente pelo programa e não foi a mesma para todos os espécimes.

Figura 5.2.5.3 – Grupo 1 (controle). À esquerda, fotomicrografia obtida por retrodispersão (BSE), indicando o conteúdo mineral uniforme em toda a extensão da área examinada. À direita, gráfico indicando o perfil linear do conteúdo de F^- , Na^+ , Mg^{2+} , PO_4^{3-} , S^{2-} , Cl^- , K^+ e Ca^{2+} . O gráfico apresenta um perfil relativamente constante para todos os elementos.

Figura 5.2.5.4 – Grupo 2 (desmineralizado). À esquerda, fotomicrografia obtida por retrodispersão (BSE). Nas imagens em BSE, quanto mais escuro, menor o conteúdo mineral. A figura indica o conteúdo mineral reduzido na superfície externa, em decorrência da desmineralização da raiz. À direita, gráfico indicando o perfil linear do conteúdo de F^- , Na^+ , Mg^{2+} , PO_4^{3-} , S^{2-} , Cl^- , K^+ e Ca^{2+} . O gráfico indica uma redução no conteúdo de Ca^{2+} e PO_4^{3-} , que se torna constante após a profundidade de 100μm.

Figura 5.2.5.5 – Grupo 3 (desmineralizado e remineralizado). À esquerda, fotomicrografia obtida por retrodispersão (BSE). A figura indica uma zona hipermineralizada na superfície externa, em decorrência da remineralização da raiz. À direita, gráfico indicando o perfil linear do conteúdo de F^- , Na^+ , Mg^{2+} , PO_4^{3-} , S^{2-} , Cl^- , K^+ e Ca^{2+} . O gráfico indica elevado conteúdo de Ca^{2+} e PO_4^{3-} , que se torna constante após a profundidade de 100µm.

Figura 5.2.5.6 – Grupo 4 (desmineralizado, incubado com tampão neutro e remineralizado). À esquerda, fotomicrografia obtida por retrodispersão (BSE). A figura indica uma zona hipermineralizada na superfície externa, em decorrência da remineralização da raiz. À direita, gráfico indicando o perfil linear do conteúdo de F^- , Na^+ , Mg^{2+} , PO_4^{3-} , S^{2-} , Cl^- , K^+ e Ca^{2+} . O gráfico indica elevado conteúdo de Ca^{2+} e PO_4^{3-} , que se torna constante após a profundidade de $100\mu m$.

Figura 5.2.5.7 – Grupo 5 (desmineralizado, remineralizado incubado com TIMP-2). À esquerda, fotomicrografia obtida por retrodispersão (BSE). A figura indica ligeira queda no conteúdo de Ca^{2+} . À direita, gráfico indicando o perfil linear do conteúdo de F^- , Na^+ , Mg^{2+} , PO_4^{3-} , S^{2-} , Cl^- , K^+ e Ca^{2+} . O gráfico indica elevado conteúdo de Ca^{2+} e PO_4^{3-} , que se torna constante após a profundidade de $100\mu\text{m}$.

Figura 5.2.5.8 – Grupo 6 (desmineralizado, remineralizado incubado com MMP-8,-9). À esquerda, fotomicrografia obtida por retrodispersão (BSE). A figura indica zona hipermineralizada e dentina subjacente desmineralizada. À direita, gráfico indicando o perfil linear mostrando acentuada queda no conteúdo de Ca^{2+} e PO_4^{3-} , correspondente à região desmineralizada abaixo da zona hipermineralizada.

Figura 5.2.5.9 – Grupo 7 (desmineralizado, remineralizado e incubado com MMP-9,-8 e TIMP-2). À esquerda, fotomicrografia obtida por retrodispersão (BSE). A figura indica elevado conteúdo mineral, com uma zona hipermineralizada superficial. À direita, gráfico indicando o perfil linear do conteúdo de F^- , Na^+ , Mg^{2+} , PO_4^{3-} , S^{2-} , Cl^- , K^+ e Ca^{2+} . O gráfico indica elevado conteúdo de Ca^{2+} e PO_4^{3-} , que se torna constante após a profundidade de 100µm.

6 Discussão

6

6 DISCUSSÃO

6.1 Estudo I

A saliva tem sido amplamente utilizada como ferramenta no diagnóstico de inúmeras doenças, uma vez que a sua obtenção é fácil e realizada por um processo não invasivo, seu conteúdo é abundante e permite a obtenção de inúmeras moléculas relacionadas aos processos fisiológicos e a várias doenças que acometem os indivíduos.

Dentro do protocolo utilizado, procurou-se padronizar ao máximo a coleta das amostras, para diminuir as variáveis interferentes. O fluxo salivar apresenta alterações durante o dia. Por essa razão, as amostras foram sempre coletadas em um mesmo período do dia, das 10 às 14 h. A idade do indivíduo pode influenciar a atividade glandular, porém não há evidências de que o conteúdo protéico seja alterado em função disso (RUDNEY, 1995). No presente trabalho, os pacientes incluídos no estudo apresentaram uma faixa etária homogênea, de 19 a 25 anos.

Na prática, a saliva total apresenta alguns obstáculos quanto à quantificação acurada das proteínas. Ela pode conter grande quantidade de bactérias orais, células de exfoliação, debris alimentares, neutrófilos e proteínas do plasma, provenientes do fluido gengival crevicular (RUDNEY, 1995). Por outro lado, a saliva glandular permite a obtenção de uma secreção mais pura, livre de bactérias ou substâncias exógenas. Na literatura, são reportadas diferenças quanto à composição protéica da saliva da glândula parótida e da saliva total em humanos. 70% da saliva da parótida é composta por proteínas ricas em prolina (PRP). O restante é constituído, quase em sua totalidade, pela amilase, de modo que as outras proteínas (tais como lisosima, lactoferrina, peroxidase e IgA) estão presentes em concentrações mínimas (DODDS et al., 2005). Até o presente momento, os estudos sobre a constituição protéica da saliva secretada pela parótida não confirmam a presença de MMPs (UITTO et al., 1990; MÄKELÄ et al., 1994) e, por outro lado, indicam a existência de TIMP-1 (NIEW AMERONGEN, VEERMAN, 2002). Essa constatação pode ser uma explicação para a ausência de MMPs na saliva secretada pela parótida analisada neste trabalho. Assim como demonstrado previamente (UITTO et al., 1990; MÄKELÄ et al., 1994), também no presente estudo não foram detectadas bandas indicando a presença de MMPs ou significativa atividade gelatinolítica na saliva secretada exclusivamente pela glândula parótida. Em estudo prévio, a MMP-9 foi detectada apenas no epitélio glandular, não na secreção salivar da parótida (MÄKELÄ et al., 1994). De acordo com Mäkelä et al. (1994), é possível que parte da MMP-9 tenha ficado retida no interior da glândula, uma vez que esses

autores observaram expressão de MMP-9 no tecido glandular e insignificante presença de MMP-9 na saliva excretada pela parótida.

A zimografia com gelatina é uma técnica usada, freqüentemente, pela capacidade de identificar as MMP-2 e MMP-9 através da degradação de seu substrato preferencial, a gelatina e, também, por identificar seu peso molecular (SNOEK-VAN BEURDEN, VON DEN HOFF, 2005). No entanto, os resultados da zimografia devem ser avaliados com cautela, uma vez que o substrato utilizado no gel (a gelatina ou o colágeno desnaturado) pode ser também degradado por outras MMPs, tais como MMP-1, MMP-8 e MMP-13 (SNOEK-VAN BEURDEN, VON DEN HOFF, 2005; STERNLICHT, WERB, 2001). Além disso, o SDS presente no tampão da amostra dissocia as MMPs dos TIMPs, identificando as MMPs sem que, necessariamente, estas estivessem na sua forma ativa *in vivo*. Apesar de algumas limitações, a zimografia é considerada um método adequado para a análise das MMPs (SNOEK-VAN BEURDEN, VON DEN HOFF, 2005).

Os dados gerais obtidos através da zimografia revelaram que a principal gelatinase presente, tanto na saliva total, quanto no fluido gengival crevicular, é a pró-MMP-9, localizada na região de 92kDa, como previamente descrito (MAKELA et al., 1994; WESTERLUND et al., 1996). Foram também observadas bandas em 125 kDa, correspondendo à formação de um complexo entre a MMP-9 e NGAL (KJELDSEN et al., 1993). Atividade gelatinolítica em menor intensidade foi detectada em 77kDa e em 64kDa, correspondendo, respectivamente, à forma ativa da MMP-9 e à forma inativa da MMP-2.

A comparação entre pacientes com e sem LCNC, através da zimografia, mostrou não haver diferença estatisticamente significativa, nos zimogramas, tanto para saliva total quanto para o fluido gengival crevicular.

Para uma identificação mais acurada da presença das MMPs na saliva total e no FGC, foram realizados testes de *western-blotting*, utilizando-se anticorpos específicos para MMP-2 e MMP-9. Os resultados dos *western-blot*s indicaram escassa presença de MMP-2, uma vez que imunoreatividade à MMP-2 foi raramente detectada. Por outro lado, os WB indicaram que a principal gelatinase na cavidade oral é mesmo a MMP-9 (VISSE, NAGASE, 2003). Os WB da saliva total para MMP-9 evidenciaram maior atividade gelatinolítica nos pacientes com LCNC, sendo estatisticamente significativa (Teste Mann-Whitney, $p < 0,05$). Essa MMP é principalmente secretada pelos neutrófilos, macrófagos, osteoclastos, eosinófilos e queratinócitos (VISSE, NAGASE, 2003). Entretanto, deve-se ressaltar aqui que as amostras foram obtidas de pacientes considerados saudáveis, quanto aos parâmetros clínicos de doença periodontal, descartando-se a possibilidade de que a maior expressão de MMP-9 em relação ao grupo controle seja oriunda de células inflamatórias provenientes do FGC.

Há inúmeras evidências de que as MMPs desempenham importante papel em diversos processos biológicos, mesmo que o mecanismo de ação das MMPs em certos eventos ainda necessite de maior esclarecimento. Atualmente, tem-se dado ênfase à atuação das MMPs em processos patológicos, e o seu papel fisiológico tem sido menos apreciado, mesmo sendo também muito relevante. As MMPs apresentam importante função tanto na fisiologia humana como no processamento de fatores de crescimento e a proteção através da inibição de proteinases endógenas (OVERALL, LOPEZ-OTIN, 2002 ; OWEN et al., 2004). Recentemente, foi comprovado, por exemplo, que a MMP-8 possui propriedades antiinflamatórias (OWEN et al., 2004). Deve-se, portanto, analisar a presença/ausência das MMPs com muita atenção, uma vez que sua elevada expressão em determinado processo nem sempre indica um efeito deletério (SORSA, GOLUB, 2005).

A MMP-9 apresenta atividade de telopeptidase, uma vez que ela remove os peptídeos terminais das fibrilas colágenas contendo ligações cruzadas. Esse processo é considerado o primeiro estágio da degradação das fibrilas colágenas (EECKHOUT, DELAISSE, 1988). Sua atividade poderia contribuir para a formação de lesões cervicais não cariosas. A ausência de maior expressão de MMPs em pacientes com LCNC ainda não descarta uma possível relação das endopeptidases com a etiologia dessas lesões. São necessários mais estudos para a confirmação ou exclusão de tal correlação.

É preciso considerar que o mecanismo de desenvolvimento das LCNC é dependente de eventos que já ocorreram ou que ainda ocorrem em um determinado período de tempo. Ao se examinarem determinados pacientes, no que diz respeito à ocorrência de LCNC, conclui-se que não há fatores presentes que possam ser responsabilizados por elas. Entretanto, o levantamento da história clínica do paciente mostra que, em algum momento, um fator ou determinados fatores tiveram participação eventual no processo de desenvolvimento das lesões. Observa-se, ainda, que tais eventos são cíclicos, resultado da variedade de situações que podem exacerbar ou reduzir seu efeito ao longo do tempo. Incluem-se nesse particular os hábitos mastigatórios, de higiene, alimentares e comportamentais. O mesmo raciocínio pode ser empregado para justificar a inconsistência da presença de MMPs ativas ou inativas. É possível que as amostras ou, pelo menos parte delas, colhidas num determinado lapso de tempo, tenham coincidido com o momento em que, estimuladas ou não por fatores intrínsecos ou extrínsecos, estivessem desprovidas de endopeptidases. Tal hipótese é apoiada por (RUDNEY, 1995) que sugere a colheita de amostras de saliva em diferentes momentos do dia, o que, de fato, não foi realizado no presente estudo.

Até o presente momento, a causa das lesões cervicais deve ser considerada de origem multifatorial, uma vez que seu diagnóstico geralmente está associado à abrasão, corrosão, atrição (SMITH, KNIGHT, 1984). Entretanto, ao se analisar a literatura pertinente e

a própria experiência com a observação clínica das LCNC, depara-se com situações em que é impossível se estabelecer uma relação de causa e efeito com qualquer fator etiológico potencial conhecido, seja no momento do exame ou anteriormente a ele. Nessas condições, como último recurso de registro diagnóstico, considera-se a lesão de origem idiopática. Como o próprio termo sugere, isso significa que não há causa conhecida aparente. Todavia, é certo que alguma causa que não se pode distinguir fez ou faz parte do processo de desenvolvimento da lesão, e que fatores próprios do organismo do paciente, ainda não surpreendidos pela acurácia dos métodos de investigação, podem estar alterando a integridade das estruturas dentárias. Reforça-se, assim, a necessidade de se desenvolverem estudos clínico/laboratoriais, com metodologia ajustada para desvendar o eventual papel das MMPs no processo de desenvolvimento das LCNC (BARTLETT, SHAH, 2006).

6.2 Estudo II

6.2.1 Efeito da Escovação

O efeito da abrasão sobre a dentina hígida sujeita à escovação é considerado insignificante por alguns autores (ATTIN et al., 2001). Como foi observado neste estudo, a escovação sem desmineralização prévia da dentina não alterou significativamente o conteúdo mineral quando foram comparados espécimes de dentina radicular escovados e não escovados. No entanto, ainda não há um consenso na literatura no que se refere ao efeito da escovação sobre espécimes de dentina quando estes são submetidos à desmineralização. A maioria das pesquisas laboratoriais e *in situ* reforçam a hipótese de que a combinação de processos erosivos e abrasivos aumenta o desgaste dentário (AMAECHI et al., 2003; ATTIN et al., 2004; AZZOPARDI et al., 2004; BARTLETT, SHAH, 2006; JAEGGI, LUSSI, 1999). Em um estudo de caso controle (BADER et al., 1996), foi reportado que o desgaste cervical é um processo multifatorial, tanto em sua iniciação quanto na sua progressão. Tanto o consumo de ácidos na dieta quanto a frequência de escovação são correlacionados a um aumento do desgaste (LUSSI, SCHAFFNER, 2000). Ainda no que diz respeito à idéia de etiologia multifatorial das LCNC, a tensão oclusal (abfração) tem sido considerada um fator importante no processo de degradação inicial das estruturas mineralizadas dos dentes. Alguns estudos clínicos relataram correlação positiva entre as lesões cervicais e a presença de facetas de desgaste, indicativos importantes de oclusão traumática (PEGORARO et al., 2002; TELLES et al., 2005, 2006). Em contraste, outra investigação não detectou correlação entre as dimensões da lesão e a presença de áreas de facetas de desgaste nos dentes (PIOTROWSKI et al., 2001). Esses autores propuseram que as lesões são mais provavelmente resultantes da escovação dentária que da tensão oclusal. Enquanto a maioria das evidências que correlaciona abfração à tensão oclusal é indireta (BARTLETT, SHAH, 2006), não se pode subestimar os inúmeros achados que suportam essa correlação. Outro aspecto a ser considerado é que a abrasão devido à escovação pode ser também influenciada pelo tipo de dentífrico utilizado e que o flúor presente nos dentífricos pode reduzir a abrasão (MUNOZ et al., 1999). Nesse experimento, porém, o efeito do flúor foi evitado através do emprego de uma pasta dental não fluoretada para o controle dessa variável.

No presente estudo, a abrasão eventual causada pela escovação da dentina desmineralizada influenciou apenas o conteúdo mineral de Mg^{2+} nas amostras após a desmineralização, que foi maior nos grupos submetidos à escovação (G2B).

Quando desmineralizado e remineralizado, o grupo escovado (G3B) mostrou índices elevados de Ca^{2+} até uma profundidade de 20 μm . A razão para esse conteúdo aumentado

de Ca^{2+} na região mais superficial dos espécimes pode ser o fato de que a escovação tenha realmente removido completamente, ou em sua maior parte, a matriz de colágeno desmineralizada, concentrando o conteúdo de Ca^{2+} na região superficial. Por outro lado, nos espécimes não escovados (G3A), com superfície completamente ou parcialmente desmineralizada e com seu conteúdo de colágeno desnaturado, a rede de fibrilas colágenas assim alterada bloqueou a penetração de Ca^{2+} na superfície.

Esse fenômeno é corroborado pelos resultados observados na comparação entre TIMP e MMP em espécimes não escovados. Aqueles espécimes incubados com MMPs (G6A) mostraram maiores valores de Ca^{2+} em todas as profundidades medidas (Fig. 6.2.1). Assim, no caso dos espécimes não escovados (quando não inibidos pelos TIMPs) (G6B), as MMPs degradaram completamente o colágeno superficial (B na Fig. 6.2.1), permitindo melhor recalcificação nas áreas mais profundas após a remineralização.

Figura 6.2.1 – Ilustração esquemática do efeito da escovação sobre o conteúdo de Ca^{2+} . É possível que os espécimes incubados com MMPs tenham apresentado maior conteúdo de Ca^{2+} em decorrência da degradação da superfície desmineralizada pelas MMPs (B na figura acima), nos espécimes não escovados, permitindo melhor remineralização da superfície interna.

A formação *in vivo* de uma superfície hipermineralizada em lesões de cárie ativas resulta da precipitação de componentes salivares e da reprecipitação de íons de Ca^{2+} e PO_4^{-3} dissolvidos e que sofreram difusão a partir do meio externo (SCHUPBACH et al., 1992). O presente estudo mostrou haver a coexistência de uma zona hipermineralizada e uma subsuperfície desmineralizada, as quais expressam a dinâmica dos eventos físico-químicos que ocorrem durante os estágios de cárie ativa sobre a superfície da raiz (SCHUPBACH et al., 1992). As fotomicrografias em BSE obtidas neste trabalho evidenciam a presença dessa zona superficial hipermineralizada, corroborando o achado de Schüpbach et al. (1992).

6.2.2 Conteúdo Mineral

A saliva humana é supersaturada em relação à apatita, o que não só previne a dissolução dos tecidos duros, mas também tem a capacidade de remineralizar o tecido desmineralizado (FEATHERSTONE et al., 1993). A presença de uma zona hipermineralizada superficial sugere o aumento do conteúdo de Ca^{2+} a 20 μm em alguns grupos. Porém, o mesmo não foi observado por Tohda et al. (1996), uma vez que esses autores observaram que o perfil de Ca^{2+} na superfície não refletiu um aparente aumento na mineralização.

Os valores da relação molar Ca/P foram próximos àqueles encontrados na literatura (ARNOLD et al., 2007; LEGEROS, 1991). Essa relação não variou significativamente entre as diferentes profundidades medidas. Os espécimes desmineralizados, escovados e remineralizados (G 3B) apresentaram maior razão molar Ca/P na camada mais superficial quando comparados ao grupo não escovado (G3A), provavelmente devido ao aumento do conteúdo de Ca^{2+} na superfície no grupo sujeito à escovação, como foi explicado anteriormente.

A presença de magnésio pode inibir a remineralização da matriz de dentina (SAITO et al., 2003). Durante a formação do dente, a repressão da secreção de odontoblastos na matriz dentinária e uma mudança na deposição de dentina ocorrem em consequência da deficiência de Mg^{2+} (SANO et al., 2005). Indiretamente, o magnésio influencia o metabolismo mineral através de fatores enzimáticos e outros, e, indiretamente, afeta o processo de cristalização da fase inorgânica mineral (ALTHOFF et al., 1982).

Em relação à distribuição de Mg^{2+} , neste estudo, para as amostras escovadas e não escovadas, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa no conteúdo de Mg^{2+} em todas as medidas, menores valores de Mg^{2+} foram observados nos grupos em que

as MMPs foram adicionadas à solução de remineralização. Esse fenômeno pode ter ocorrido seguindo à mesma dinâmica do processo carioso em dentina, no qual a redução no conteúdo de Mg^{2+} ocorre previamente à redução do conteúdo de Ca^{2+} ou PO_4^{-3} (TAKUMA et al., 1975). A 30 μ m e 50 μ m foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as amostras desmineralizadas escovadas e não escovadas (G3AxG3B), sendo que os espécimes escovados apresentaram maior conteúdo de Mg^{2+} . O aumento no nível de Mg^{2+} pode ser atribuído à deposição desse elemento na porção de dentina calcificada. Segundo Sano et al. (2005), a adição continuada de Mg^{2+} de outras fontes e um índice reduzido de formação de dentina podem causar um aumento nos valores de Mg^{2+} . A dissolução de dentina mineral causa um aumento na relação molar Mg/Ca, o que favorece a formação de β -TCP com substituição pelo Mg^{2+} (DACULSI et al., 1987). Neste estudo, não foi encontrada razão molar Mg/Ca maior que 0,03, talvez porque a única fonte de Mg^{2+} fosse a dentina.

6.2.3 MMP

Os odontoblastos dos dentes humanos totalmente formados sintetizam várias MMPs, tais como as gelatinases (MMP-2 e -9) (TJADERHANE et al., 2001), a collagenase-2 (MMP-8) (PALOSAARI et al., 2000) a MMP-14 (MT1-MMP) (PALOSAARI et al., 2002) e a enamelinase (SULKALA et al., 2002). As gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9) (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; MAZZONI et al., 2006), a enamelinase (SULKALA et al., 2002) e a collagenase-2 (MMP-8) (SULKALA et al., 2007) foram encontradas incorporadas à dentina mineralizada.

As MMPs (especialmente MMP-2 e -20) são cruciais na formação/mineralização dos tecidos duros dentais durante a formação da dentina/esmalte (BOURD-BOITTIN et al., 2005). Falhas na degradação de moléculas da matriz extracelular parecem influenciar negativamente a mineralização da dentina e a formação do esmalte (BOURD-BOITTIN et al., 2005; FANCHON et al., 2004). A proteção contra a dissolução mineral pelos componentes orgânicos da matriz pode ser um fator-chave para a remineralização e/ou paralisação das lesões em dentina. Por outro lado, alguns estudos mostraram que a remoção do colágeno antes da remineralização não afetou o nível de deposição mineral em lesões radiculares (KLONT, TEN CATE, 1991) sujeitas a collagenases (obtidas de *Clostridium histolyticum*). Pode-se especular que a remoção do colágeno, na investigação de Klont & Ten Cate (1991), não tenha sido suficiente, uma vez que, no protocolo utilizado por esses autores, a desmineralização foi realizada por 3 a 7 dias, tempo considerado insuficiente para proporcionar adequada desmineralização. Já no presente estudo, o

processo de desmineralização foi realizado por 14 dias e foram utilizadas a collagenase (MMP-8) e gelatinase (MMP-9) humanas. Assim, a incorporação de Ca^{2+} e Mg^{2+} foi ligeiramente afetada pela presença ou ausência de colágeno exposto, conforme o regime de exposição adotado para os diferentes grupos, provavelmente porque as soluções empregadas para o armazenamento não apresentavam Mg^{2+} , diferentemente do que ocorre na boca. Além disso, nenhuma alteração significativa no conteúdo de fósforo foi observada.

Para as lesões erosivas, a partir do momento em que suficiente mineral é inicialmente perdido para permitir acesso da enzima à matriz colágena, a destruição pode progredir rapidamente, mesmo em uma solução de pH neutro (KAWASAKI, FEATHERSTONE, 1997). A manutenção da matriz orgânica na lesão pode ser importante para a redução da progressão da erosão (HARA et al., 2005). A alta resistência mecânica e química à digestão enzimática e o desafio ácido sobre as fibrilas de colágeno dentinário são atribuídas às suas ligações cruzadas covalentes, à proteção por uma camada mineral e às interações entre o colágeno e as proteínas não colagênicas (DUNG, LIU, 1999).

A estrutura química do agente erosivo exerce um papel fundamental na iniciação e progressão da lesão de erosão. É possível que a escolha do ácido acético pH 4,3 tenha influenciado os achados deste trabalho. Os resultados do presente estudo demonstraram que a perda ou o ganho mineral na fase de remineralização foram muito pequenos, mesmo em presença de MMPs/TIMPs. Isso pode ter ocorrido devido a uma insuficiente desmineralização prévia, mesmo que esta tendo sido feita por 14 dias. O pH 4,3 foi utilizado com o intuito de reproduzir o protocolo utilizado por Nordbo et al. (2003), que examinaram o efeito das MMPs/TIMPs sobre a dentina coronária, ao passo que a presente investigação avaliou o efeito das MMPs/TIMPs sobre lesões em dentina radicular. Pode ser que a redução do pH ou a utilização de ácido cítrico (pH 2,0) exerçam um efeito desmineralizador mais pronunciado, pois haveria maior exposição das fibrilas colágenas e isso poderia tornar o efeito das enzimas e seus inibidores mais pronunciado. Esse fenômeno foi observado no estudo realizado por Kawasaki, Featherstone (1997), em que a erosão superficial foi observada apenas nos grupos sujeitos à severa desmineralização. De acordo com Kleter et al. (1994), durante a fase inicial da formação da lesão, uma parte relativamente grande de colágeno não é ainda susceptível à collagenase, porque o colágeno dentinário é recoberto por mineral e resistente ao ataque enzimático. Esses autores especulam que a matriz orgânica possa inibir a desmineralização da dentina. Assim, se a degradação ocorresse, ela promoveria o desenvolvimento da uma lesão radicular (KLETER et al., 1994). Mais estudos são necessários para se compreender o efeito das collagenases em uma lesão em estágio mais avançado.

Um resultado interessante foi o de que a adição de TIMPs à solução de remineralização causou um decréscimo no conteúdo de cálcio na dentina mais superficial

dos espécimes sujeitos à escovação. Esse fenômeno pode ser atribuído à inibição das MMPs presentes na dentina, as quais foram incapazes de degradar as fibrilas de colágeno completamente desmineralizadas, o que tornaria a superfície mais susceptível à recalcificação das áreas mais profundas.

Postulou-se que a atividade da MMP-8 durante a mineralização poderia perturbar o processo de remineralização e, assim, contribuir para a redução da mineralização dentinária (NORDBO *et al.*, 2003). No entanto, neste estudo, o efeito da MMP-8, da MMP-9 e dos TIMPs afetou levemente o processo de remineralização de lesões radiculares artificialmente criadas, pois foram detectadas apenas suaves alterações no conteúdo mineral da dentina em função da presença de tais enzimas e seu inibidor. No trabalho de Nordbo *et al.* (2003), foi avaliado o efeito da MMP-8 sobre a dentina coronal, ao passo que no presente estudo foi verificado o efeito da MMP-8, da MMP-9 e dos TIMPs sobre a dentina radicular. Além disso, Nordbo *et al.* (2003) não realizaram uma análise estatística dos resultados obtidos, mostrando apenas os gráficos comparativos, os quais demonstraram diferenças no perfil mineral da dentina em função da presença de MMP-8 e TIMPs, sem indicar se houve diferença significativa.

Os dados obtidos não suportam os achados prévios de que as MMPs/TIMPs teriam efeito significativo sobre a patogênese das lesões cervicais cáries. Com base nos resultados obtidos no presente estudo, a investigação do efeito das MMPs/TIMPs em lesões artificiais mais avançadas deveria ser executada para elucidar a influência das MMPs/TIMPs em lesões artificiais radiculares. Talvez, diferentes protocolos de desmineralização pudessem ser testados para a criação de lesões em estágios distintos como, por exemplo, lesões iniciais, estagnadas e em progressão. As lesões desenvolvidas no presente trabalho apresentavam dimensões reduzidas, correspondentes a uma fase muito inicial da lesão e, talvez por isso, tenham-se observado apenas alterações no conteúdo de Mg^{2+} e de Ca^{2+} .

O EDX é um método útil para a análise elemental dos tecidos mineralizados. No entanto, não se pode subestimar as variações inerentes às leituras individuais do aparelho, que sofrem a influência de alterações na corrente de voltagem e, também, as variações decorrentes da heterogeneidade do tecido dentinário entre os espécimes.

7

Conclusões

7

7 CONCLUSÕES

Considerando-se os achados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

ESTUDO I

I - Não houve diferença, quanto à expressão de MMP-2 e MMP-9, na saliva total, da parótida e no fluido do sulco gengival entre pacientes com e sem LCNC. Dessa forma, a hipótese nula foi aceita.

ESTUDO II

II.1 – A atividade das MMP-8 e MMP-9 e de seu TIMP influenciou a remineralização de lesões artificiais na dentina radicular, ainda que pequenas alterações no conteúdo mineral da dentina tenham sido detectadas. Assim, a hipótese nula foi rejeitada.

Quando não inibidas pelos TIMPs, as MMPs degradaram o colágeno completamente desmineralizado na superfície radicular, permitindo melhor recalcificação na superfície subjacente.

II.2 – O fenômeno de remineralização foi facilitado pela abrasão por escovação.

II.3 – A atividade dessas enzimas alterou, qualitativamente, a constituição do substrato dentinário.

Referências

Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 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.
- 2 Althoff J, Quint P, Krefting ER, Hohling HJ. Morphological studies on the epiphyseal growth plate combined with biochemical and X-ray microprobe analyses. *Histochemistry.* 1982;74(4):541-52.
- 3 Amaechi BT, Higham SM. Eroded enamel lesion remineralization by saliva as a possible factor in the site-specificity of human dental erosion. *Arch Oral Biol.* 2001;46(8):697-703
- 4 Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Influence of abrasion in clinical manifestation of human dental erosion. *J Oral Rehabil.* 2003;30(4):407-13.
- 5 Arnold WH, Bietau V, Renner PO, Gaengler P. Micromorphological and micronanalytical characterization of stagnating and progressing root caries lesions. *Arch Oral Biol.* 2007;52(6):591-7.
- 6 Asatsuma M, Ito S, Watanabe M, Takeishi H, Nomura S, Wada Y, et al. Increase in the ratio of matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in saliva from patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Chim Acta.* 2004;345(1-2):99-104.
- 7 Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28(1):12-24.
- 8 Attin T, Buchalla W, Gollner M, Hellwig E. Use of variable remineralization periods to improve the abrasion resistance of previously eroded enamel. *Caries Res.* 2000;34(1):48-52.
- 9 Attin T, Buchalla W, Putz B. In vitro evaluation of different remineralization periods in improving the resistance of previously eroded bovine dentine against tooth-brushing abrasion. *Arch Oral Biol.* 2001;46(9):871-4.
- 10 Attin T, Siegel S, Buchalla W, Lennon AM, Hannig C, Becker K. Brushing abrasion of softened and remineralised dentin: an in situ study. *Caries Res.* 2004;38(1):62-6.
- 11 Avellan NL, Sorsa T, Tervahartiala T, Mantyla P, Forster C, Kemppainen P. Painful tooth stimulation elevates matrix metalloproteinase-8 levels locally in human gingival crevicular fluid. *J Dent Res.* 2005;84(4):335-9.

- 12 Aw TC, Lepe X, Johnson GH, Mancl L. Characteristics of noncarious cervical lesions. A clinical investigation. *J Am Dent Assoc.* 2002;133(6):725-33.
- 13 Awawdeh LA, Lundy FT, Linden GJ, Shaw C, Kennedy JG, Lamey PJ. Quantitative analysis of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in gingival crevicular fluid associated with painful human teeth. *Eur J Oral Sci.* 2002;110(3):185-91
- 14 Azzopardi A, Bartlett DW, Watson TF, Sherriff M. The measurement and prevention of erosion and abrasion. *J Dent.* 2001;29(6):395-400.
- 15 Azzopardi A, Bartlett DW, Watson TF, Sherriff M. The surface effects of erosion and abrasion on dentine with and without a protective layer. *Br Dent J.* 2004;27;196(6):351-4.
- 16 Bader JD, McClure F, Scurria MS, Shugars DA, Heymann HO. Case-control study of non-carious cervical lesions. *Community Dent Oral Epidemiol* 1996;24(4):286-91.
- 17 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.
- 18 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.
- 19 Benjavongkulchai B. Matrix metalloproteinases in parotid saliva of primary Sjögren Syndrome patients. *J Dent Res.* 1997;76(Spec Iss):274.
- 20 Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol.* 1993;64(Suppl 5):474-84.
- 21 Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol.* 1995;7(5):728-35.
- 22 Björklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochem Biophys Acta.* 2005;1755(1):37-69.
- 23 Borcic J, Anic I, Urek MM, Ferreri S. The prevalence of non-carious cervical lesions in permanent dentition. *J Oral Rehabil.* 2004;31(2):117-23.
- 24 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.

- 25 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.
- 26 Chakrabarti S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res*. 2005;31(6):599-621.
- 27 Chauncey HH. Salivary enzymes. *J Am Dent Assoc*. 1961; 63(9):360-8. Cheng PT, Grabher JJ, LeGeros RZ. Effects of magnesium on calcium phosphate formation. *Magnesium*. 1988;7(3):123-32.
- 28 Cheng PT, Grabher JJ, LeGeros RZ. Effects of magnesium on calcium phosphate formation. *Magnesium*. 1988;7(3):123-32.
- 29 Ciancio SG. Systemic medications: clinical significance in periodontics. *J Clin Periodontol*. 2002;29(Suppl 2):17-21.
- 30 Clarkson BH, Hall DL, Heilman JR, Wefel JS. Effect of proteolytic enzymes on caries lesion formation in vitro. *J Oral Pathol Med*. 1986;15(8):423-9.
- 31 Daculsi G, LeGeros RZ, Jean A, Kerebel B. Possible physico-chemical processes in human dentin caries. *J Dent Res*. 1987;66(8):1356-9.
- 32 Dahan M, Nawrocki B, Elkaïm R, Soell M, Bolcato-Bellemin AL, Birembaut P, et al. Expression of matrix metalloproteinases in healthy and diseased human gingiva. *J Clin Periodontol*. 2001;28(2):128-36.
- 33 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.
- 34 De Las Casas EB, Cornacchia TP, Gouvea PH, Cimini CAJ. Abfraction and anisotropy--effects of prism orientation on stress distribution. *Comput Methods Biomech Biomed Engin*. 2003;6(1):65-73.
- 35 De Menezes M, Turssi CP, Hara AT, Messias DC, Serra MC. Abrasion of eroded root dentine brushed with different toothpastes. *Clin Oral Investig*. 2004;8(3):151-5.
- 36 Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. *J Dent*. 2005;33(3):223-33.
- 37 Dung TZ, Liu AH. Molecular pathogenesis of root dentin caries. *Oral diseases*. 1999;5(2):92-9.

- 38 Eccles JD. Tooth surface loss from abrasion, attrition and erosion. *Dent Update*. 1982;9(7):373-4, 6-8, 80-1.
- 39 Eeckhout Y, Delaisse JM. The role of collagenase in bone resorption. An overview. *Pathol Biol (Paris)*. 1988;36(9):1139-46.
- 40 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.
- 41 Fanchon S, Bourd K, Septier D, Everts V, Beertsen W, Menashi S, et al. Involvement of matrix metalloproteinases in the onset of dentin mineralization. *Eur J Oral Sci*. 2004;112(2):171-6.
- 42 Featherstone JD. Fluoride, remineralization and root caries. *Am J Dent*. 1994;7(5):271-4.
- 43 Featherstone JD, Behrman JM, Bell JE. Effect of whole saliva components on enamel demineralization in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4(3-4):357-62.
- 44 Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1997;25(1):5-12.
- 45 Flint S, Scully C. Orofacial age changes and related disease. *Dent Update*. 1988;15(8):337-42.
- 46 Gangbar S, Overall CM, McCulloch CA, Sodek J. Identification of polymorphonuclear leukocyte collagenase and gelatinase activities in mouthrinse samples: correlation with periodontal disease activity in adult and juvenile periodontitis. *J Periodontal Res*. 1990;25(5):257-67.
- 47 Gaspersic D. Micromorphometric analysis of cervical enamel structure of human upper third molars. *Arch Oral Biol*. 1995;40(5):453-7.
- 48 Geiger SB, Harper E. The inhibition of human gingival collagenase by an inhibitor extracted from human teeth. *J Periodontal Res*. 1981;16(1):8-12.
- 49 Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999 May;6(3):437-9.
- 50 Goel VK, Khera SC, Ralston JL, Chang KH. Stresses at the dentinoenamel junction of human teeth--a finite element investigation. *J Prosthet Dent*. 1991;66(4):451-9.

- 51 Golub LM, Sorsa T, Lee HM, Ciancio S, Sorbi D, Ramamurthy NS, et al. Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. *J Clin Periodontol*. 1995;22(2):100-9.
- 52 Golub LM, Lee HM, Greenwald RA, Ryan ME, Sorsa T, Salo T, et al. A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult periodontitis. *Inflamm Res*. 1997;46(8):310-9.
- 53 Grippo J. Abfractions: a new classification of hard tissue lesions of teeth. *J Esthet Dent*. 1991;3(1):14-9.
- 54 Grippo JO, Simring M, Schreiner S. Attrition, abrasion, corrosion and abfraction revisited - a new perspective on tooth surface lesions. *J Am Dent Assoc*. 2004;135(8):1109-18.
- 55 Gudmundsson K, Kristleifsson G, Theodors A, Holbrook WP. Tooth erosion, gastroesophageal reflux, and salivary buffer capacity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995;79(2):185-9.
- 56 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.
- 57 Hall AF, Buchanan CA, Millett DT, Creanor SL, Strang R, Foye RH. The effect of saliva on enamel and dentine erosion. *J Dent*. 1999;27(5):333-9.
- 58 Halse A. Electron microprobe analysis of deep layers of rat incisor enamel. *Scand J Dent Res*. 1971;79(6):377-80.
- 59 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.
- 60 Hara AT, Ando M, Cury JA, Serra MC, Gonzalez-Cabezas C, Zero DT. Influence of the organic matrix on root dentine erosion by citric acid. *Caries Res*. 2005;39(2):134-8.
- 61 Ingman T, Sorsa T, Lindy O, Koski H, Konttinen YTI. Multiple forms of gelatinases/type IV collagenases in saliva and gingival crevicular fluid of periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 1994a;21(1):26-31.
- 62 Ingman T, Sorsa T, Michaelis J, Konttinen YT. Matrix metalloproteinases-1, -3, and -8 in adult periodontitis *in situ*. An immunohistochemical study. *Ann N Y Acad Sci*. 1994b;732:459-61.

- 63 Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, D.F. K, et al. Matrix Metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 1996;23(12):1127-32.
- 64 Ishiguro K, Yamashita K, Nakagaki H, Iwata K, Hayakawa T. Identification of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in human teeth and its distribution in cementum and dentine. *Arch Oral Biol*. 1994;39(4):345-9.
- 65 Jackson RJ, Lim DV, Dao ML. Identification and analysis of a collagenolytic activity in *Streptococcus mutans*. *Curr Microbiol*. 1997 34(1):49-54.
- 66 Jaeggi T, Lussi A. Toothbrush abrasion of erosively altered enamel after intraoral exposure to saliva: an *in situ* study. *Caries Res*. 1999;33(6):455-61.
- 67 Järvinenm VK, Rytömaa II, Heinonen OP. Risk factors in dental erosion. *J Dent Res* 1991;70(6):942-7.
- 68 Jensdottir T, Holbrook P, Nauntofte B, Buchwald C, Bardow A. Immediate erosive potential of cola drinks and orange juices. *J Dent Res*. 2006;85(3):226-30.
- 69 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.
- 70 Katz S, Park KK, Palenik CJ. In-vitro root surface caries studies. *J Oral Med*. 1987;42(1):40-8.
- 71 Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis--a review. *J Clin Periodontol*. 2000;27(7):453-65.
- 72 Kawasaki K, Featherstone JD. Effects of collagenase on root demineralization. *J Dent Res*. 1997 76(1):588-95.
- 73 Khan F, Young WG, Shahabi S, Daley TJ. Dental cervical lesions associated with occlusal erosion and attrition. *Aust Dent J*. 1999;44(3):176-86.
- 74 Kiili M, Cox SW, Chen HY, Wahlgren J, Maisi P, Eley BM, et al. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. *J Clin Periodontol*. 2002;29(3):224-32.

- 75 Kinane DF, Darby IB, Said S, Luoto H, Sorsa T, Tikanoja S, et al. Changes in gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels during periodontal treatment and maintenance. *J Periodontal Res.* 2003;38(4):400-4.
- 76 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.
- 77 Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem.* 1994;218(2):325-9.
- 78 Kleter GA, Damen JJ, Everts V, Niehof J, Ten Cate JM. The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin in vitro. *J Dent Res.* 1994;73(9):1523-9.
- 79 Klont B, ten Cate JM. Remineralization of bovine incisor root lesions in vitro: the role of the collagenous matrix. *Caries Res.* 1991;25(1):39-45.
- 80 Konttinen Y, Kangaspunta P, Lindy O, Takagi M, Sorsa T, Segerberg M. Collagenase in Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 1994;53(12):836-9.
- 81 Konttinen YT, Halinen S, Hanemaaijer R, Sorsa T, Hietanen J, Ceponis A, et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-9 type IV collagenase/gelatinase implicated in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Matrix Biol.* 1998;17(5):335-47.
- 82 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.
- 83 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(259):680-5.
- 84 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.
- 85 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.
- 86 LeGeros RZ. *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine.* Basel (Switzerland): S. Karger AG; 1991, 201p.
- 87 LeGeros RZ, Sakae T, Bautista C, Retino M, LeGeros JP. Magnesium and carbonate in enamel and synthetic apatites. *Adv Dent Res.* 1996;10(2):225-31.

- 88 Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle - a review. *Adv Dent Res.* 2000;14:22-8.
- 89 Levitch LC, Bader JD, Shugars DA, Heymann HO. Non-carious cervical lesions. *J Dent.* 1994;22(4):195-207.
- 90 Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4(5):679-728.
- 91 Litonjua LA, Bush PJ, Andreana S, Tobias TS, Cohen RE. Effects of occlusal load on cervical lesions. *J Oral Rehabil.* 2000;31(3):225-32.
- 92 Litonjua LA, Andreana S, Bush PJ, Tobias TS, Cohen RE. Wedged cervical lesions produced by toothbrushing. *Am J Dent.* 2004;17(4):237-40.
- 93 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
- 94 Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res.* 2004;38 Suppl 1:34-44.
- 95 Lussi A, Schaffner M. Progression of and risk factors for dental erosion and wedge-shaped defects over a 6-year period. *Caries Res.* 2000;34(2):182-7.
- 96 Mahoney EK, Kilpatrick NM. Dental Erosion: part 1. aetiology and prevalence of dental erosion. *New Zealand Dent J.* 2003;99(2):33-41.
- 97 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.
- 98 Mancini S, Romanelli R, Laschinger CA, Overall CM, Sodek J, McCulloch CA. Assessment of a novel screening test for neutrophil collagenase activity in the diagnosis of periodontal diseases. *J Periodontol.* 1999;70(11):1292-302.
- 99 Mäntylä P, Stenman M, Kinane DF, Salo T, Suomalainen K, Tikanoja S, et al. Monitoring periodontal disease status in smokers and nonsmokers using a gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8-specific chair-side test. *J Periodontal Res.* 2006;41(6):503-12.
- 100 Mäntylä P, Stenman M, Kinane DF, Tikanoja S, Luoto H, Salo T, et al. Gingival crevicular fluid collagenase-2 (MMP-8) test stick for chair-side monitoring of periodontitis. *J Periodontal Res.* 2003;38(4):436-9.

- 101 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.
- 102 Mayhew R, Jessee SA, Martin R. Association of occlusal, periodontal and dietary factors with the presence of non-carious cervical dental lesions. *Am J Dent*. 1998;11(1):29-31.
- 103 Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjaderhane L, et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials*. 2006;27(25):4470-6.
- 104 Meurman JH, Drysdale T, Frank RM. Experimental erosion of dentin. *Scand J Dent Res*. 1991;99(6):457-62.
- 105 Meurman JH, Vesterinen M. Wine, alcohol, and oral health, with special emphasis on dental erosion. *Quintessence Int*. 2000;31(10):729-33.
- 106 Mistry M, Grendy TH. Erosion by soft drinks of rat molar teeth assessed by digital image analysis. *Caries Res*. 1993;27(1):21-5.
- 107 Mondelli RFL, Wang L, Garcia FCP, Prakki A, Mondelli J, Franco EB, et al. Evaluation of weight loss and surface roughness of compomers after simulated toothbrushing abrasion test. *J Appl Oral Sci*. 2005;13(2):131-5.
- 108 Munoz CA, Feller R, Haglund A, Triol CW, Winston AE. Strengthening of tooth enamel by a remineralizing toothpaste after exposure to an acidic soft drink. *J Clin Dent*. 1999;10(1 Spec No):17-21.
- 109 Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. 2006 69(3):562-73.
- 110 Nagase H, Woessner JFJ. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999;274(31):21491-4.
- 111 Nekrashevych Y, Stosser L. Protective influence of experimentally formed salivary pellicle on enamel erosion. An in vitro study. *Caries Res* 2003; 37(3):225-31
- 112 Nieuw Amerongen AV, Oderkerk CH, Driessen AA. Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro. *Caries Res*. 1987;21(4):297-309.
- 113 Nieuw Amerongen AV, Veerman EC. Saliva--the defender of the oral cavity. *Oral diseases*. 2002;8(1):12-22.

- 114 Ngo H, Ruben J, Arends J, White D, Mount GJ, Peters MC, et al. Electron probe microanalysis and transverse microradiography studies of artificial lesions in enamel and dentin: a comparative study. *Adv Dent Res*. 1997;11(4):426-32.
- 115 Nordbo H, Leirskar J, Ngo H, Mount GJ, Wahlgren J. The influence of a matrix metalloproteinase on the remineralization of artificially demineralized dentin. *Oral Health Prev Dent*. 2003;1(4):267-72.
- 116 Nunn JH. Prevalence of dental erosion and the implications for oral health. *J Oral Sci*. 1996; 104(2): 156-161.
- 117 Nyberg P, Ylipalosaari M, Sorsa T, Salo T. Trypsins and their role in carcinoma growth. *Exp Cell Res*. 2006;312(8):1219-28.
- 118 Nyvad B, Fejerskov O. Active root surface caries converted into inactive caries as a response to oral hygiene. *Scand J Dent Res*. 1986;94(3):281-4.
- 119 Nyvad B, ten Cate JM, Fejerskov O. Arrest of root surface caries in situ. *J Dent Res*. 1997;76(12):1845-53.
- 120 Offner GD TR. Heterogeneity of high-molecular-weight human salivary mucins. *Adv Dent Res*. 2000;14:69-75.
- 121 Overall CM, Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*. 2002 2(9):657-72.
- 122 Owen CA, Campbell EJ. Extracellular proteolysis: new paradigms for an old paradox. *J Lab Clin Med*. 1999;134(4):341-51.
- 123 Owen CA, Hu Z, Lopez-Otin C, Shapiro SD. Membrane-bound matrix metalloproteinase-8 on activated polymorphonuclear cells is a potent, tissue inhibitor of metalloproteinase-resistant collagenase and serpinase. *J Immunol*. 2004;172(12):7791-803.
- 124 Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res*. 2004;83(3):216-21
- 125 Patterson ML, Atkinson SJ, Knäuper V, Murphy G. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Letters*. 2001;503 (2-3):158-62.
- 126 Pegoraro LF, Sclaro JM, Conti PC, Telles D, Pegoraro TA. Noncarious cervical lesions in adults: prevalence and occlusal aspects. 2005. 2005;136(12):1694-700.

- 127 Pereira JC. Hiperestesia dentinária: aspectos clínicos e formas de tratamento. *Maxi Odonto*. 1995;1:1-24.
- 128 Pindborg JJ. Pathology of the dental hard tissues. Philadelphia: Saunders; 1970. p. 274-320.
- 129 Piotrowski BT, Gillette WB, Hancock EB. Examining the prevalence and characteristics of abfractionlike cervical lesions in a population of U.S. veterans. *J Am Dent Assoc*. 2001;132(12):1694-701.
- 130 Pirila E, Maisi P, Salo T, Koivunen E, Sorsa T. In vivo localization of gelatinases (MMP-2 and -9) by in situ zymography with a selective gelatinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;287(3):766-74.
- 131 Radentz WH, Barnes GP, Cutright DE. A survey of factors possibly associated with cervical abrasion of tooth surfaces. *J Periodontol*. 1976;47(3):148-54.
- 132 Raitio A, Tuomas H, Kokkonen N. Levels of matrix metalloproteinase-2, -9 and -8 in the skin, serum and saliva of smokers and non-smokers. *Arch Dermatol Res* 2005;297(6):242-8.
- 133 Reddy MS, Geurs NC, Gunsolley JC. Periodontal host modulation with antiproteinase, anti-inflammatory, and bone-sparing agents. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003 8(1):12-37.
- 134 Rees JS, Jacobsen PH. The effect of cuspal flexure on a buccal Class V restoration: a finite element study. *J Dent*. 1998;26(4):361-7.
- 135 Rees JS. The effect of variation in occlusal loading on the development of abfraction lesions: a finite element study. *J Oral Rehabil*. 2002;29(2):188-93.
- 136 Rees JS, Hammadeh M, Jagger DC. Abfraction lesion formation in maxillary incisors, canines and premolars: a finite element study. *Eur J Oral Sci*. 2003;111(2):149-54.
- 137 Romanelli R, Mancini S, Laschinger C, Overall CM, Sodek J, McCulloch CAG. Activation of neutrophil collagenase in human periodontitis. *Infect Immun*. 1999;67(5):2319-26.
- 138 Rudney JD. Does variability in salivary protein concentrations influence oral microbial ecology and oral health? *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995;6(4):343-67.
- 139 Saito T, Toyooka H, Ito S, Crenshaw MA. In vitro study of remineralization of dentin: effects of ions on mineral induction by decalcified dentin matrix. *Caries Res*. 2003;37(6):445-9.

- 140 Salo T, Liotta LA, Tryggvason K. Purification and characterization of a murine basement membrane collagen-degrading enzyme secreted by metastatic tumor cells. *J Biol Chem*. 1983;258(5):3058-63.
- 141 Sano T, Morohashi T, Amano H, Yamada S, Nakamura M. Distributions of magnesium and sulphur in defect layers of incisor dentine in magnesium-deficient rats. *Arch Oral Biol*. 2005;50(8):715-25.
- 142 Saxton CA, Cowell CR. Clinical investigation of the effects of dentifrices on dentin wear at the cements/enamel junction. *J Am Dent Assoc*. 1981;102(1):38-43.
- 143 Schupbach P, Lutz F, Guggenheim B. Human root caries: histopathology of arrested lesions. *Caries Res*. 1992;26(3):153-64.
- 144 Smith BG, Knight JK. A comparison of patterns of tooth wear with aetiological factors. *Br Dent J*. 1984;157(1):16-9.
- 145 Snoek-Van Beurden PA, von Den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *J Biotechniques*. 2005;38(1):73-83.
- 146 Sorsa T, Uitto VJ, Suomalainen K, Vauhkonen M, Lindy S. Comparison of interstitial collagenases from human gingiva, sulcular fluid and polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontal Res*. 1988;23(6):386-93.
- 147 Sorsa T, Uitto VJ, Suomalainen K. Characteristics of human salivary collagenase and its relationship to periodontal diseases. *Matrix* (Stuttgart, Germany). 1992;1:406-7.
- 148 Sorsa T, Ding Y, Salo T, Lauhio A, Teronen O, Ingman T, et al. Effects of tetracyclines on neutrophil, gingival, and salivary collagenases. A functional and western-blot assessment with special reference to their cellular sources in periodontal diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;732:112-31.
- 149 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.
- 150 Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral diseases*. 2004;10(6):311-8.
- 151 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.

- 152 Staninec M, Nalla RK, Hilton JF, Ritchie RO, Watanabe LG, Nonomura G. Dentin erosion simulation by cantilever beam fatigue and pH change. *J Dent Res.* 2005;84(4):371-5.
- 153 Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001(17):463-516.
- 154 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.
- 155 Sueda T, Bang J, Cimasoni G. Collection of gingival fluid for quantitative analysis. *J Dent Res.* 1969;48(1):159.
- 156 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.
- 157 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.
- 158 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.
- 159 Takuma S, Ogiwara H, Suzuki H. Electron-probe and electron microscope studies of carious dentinal lesions with a remineralized surface layer. *Caries Res.* 1975;9(4):278-85.
- 160 Telles D, Pegoraro LF, Pereira JC. Incidence of noncarious cervical lesions and their relation to the presence of wearfacets. *J Esthet Restor Dent.* 2006;18(4):178-83.
- 161 Telles D, Pegoraro LF, Pereira JC. Prevalence of noncarious cervical lesions and their relation to occlusal aspects: a clinical study. *J Esthet Dent.* 2000;12(1):10-5.
- 162 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.
- 163 Tjaderhane L, Hietala E-L, Larmas M. Mineral element analysis of carious and sound rat dentin by electron probe microanalysis combined with back-scattering electron image. *J Dent Res.* 1995;74(11):1770-74.

- 164 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.
- 165 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.
- 166 Tohda H, Fejerskov O, Yanagisawa T. Transmission electron microscopy of cementum crystals correlated with Ca and F distribution in normal and carious human root surfaces. *J Dent Res*. 1996;75(3):949-54.
- 167 Uitto VJ. Gingival crevice fluid – an introduction. *Periodontol 2000*. 2003;31(1):9-11.
- 168 Uitto VJ, Suomalainen K, Sorsa T. Salivary collagenase. Origin, characteristics and relationship to periodontal health. *J Periodontal Res*. 1990;25(3):135-42.
- 169 van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res*. 1994;73(3):672-81.
- 170 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.
- 171 van Strijp AJ, van Steenberghe TJ, Ten Cate JM. Bacterial colonization of mineralized and completely demineralized dentine *in situ* *Caries Res* 1997;31(5):349-55.
- 172 Vanuspong W, Eisenburger M, Addy M. Cervical tooth wear and sensitivity: erosion, softening and rehardening of dentine; effects of pH, time and ultrasonication. *J Clin Periodontol*. 2002;29(4):351-7.
- 173 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.
- 174 Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003;92(8):827-39.
- 175 Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev*. 2000;14(17):2123-33.
- 176 Vuotila T, Ylikontiola L, Sorsa T, Luoto H, Hanemaaijer R, Salo T, et al. The relationship between MMPs and pH in whole saliva of radiated head and neck cancer patients. *J Oral Pathol Med*. 2002;31(6):329-38.

- 177 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.
- 178 Walters C, Eyre DR. Collagen crosslinks in human dentin: increasing content of hydroxypyridinium residues with age. *Calcif Tissue Int*. 1983;35(4-5):401-5.
- 179 Wang L, Garcia FCP, Araújo PA, Franco EB, Mondelli RFL. Wear resistance of packable resin composites after simulated toothbrushing test. *J Esthet Rest Dent*. 2004;16(5):303-15.
- 180 Welgus HG, Stricklin GP, Eisen AZ, Bauer EA, Cooney RV, Jeffrey JJ. A specific inhibitor of vertebrate collagenase produced by human skin fibroblasts. *J Biol Chem*. 1979;254(6):1938-43.
- 181 Westerlund U, Ingman T, Lukinmaa PL, Salo T, Kjeldsen L, Borregaard N, et al. Human neutrophil gelatinase and associated lipocalin in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res*. 1996;75(8):1553-63.
- 182 Wu AJ. Production of matrix metalloproteinases in Sjögren's Syndrome. *J Dent Res*. 1996;75(Spec Is):271.
- 183 Xhonga FA. Bruxism and its effect on the teeth. *J Oral Rehabil*. 1977;4(1):65-76.

Apêndices

APÊNDICE A

Tabelas com os resultados da análise elemental

Tabela A.1 – Conteúdo de Ca^{2+} a 20 μm , 30 μm e 50 μm

Grupo	20 μm	30 μm	50 μm
GA1	33,38 ($\pm 4,57$)	35,77 ($\pm 7,31$)	32,74 ($\pm 4,40$)
GA2	37,33 ($\pm 5,77$)	37,14 ($\pm 4,29$)	38,06 ($\pm 6,46$)
GA3	31,44 ($\pm 5,66$)	32,22 ($\pm 5,13$)	34,18 ($\pm 5,71$)
GA4	34,47 ($\pm 3,47$)	31,94 ($\pm 2,30$)	31,57 ($\pm 2,69$)
GA4	24,98 ($\pm 4,69$)	25,61 ($\pm 6,77$)	26,75 ($\pm 11,46$)
GA6	30,47 ($\pm 5,97$)	31,31 ($\pm 8,13$)	32,01 ($\pm 6,52$)
GA7	33,31 ($\pm 4,54$)	33,22 ($\pm 5,53$)	34,99 ($\pm 7,26$)
GB1	40,58 ($\pm 8,55$)	35,81 ($\pm 2,15$)	37,46 ($\pm 2,33$)
GB2	33,45 ($\pm 1,73$)	36,26 ($\pm 6,43$)	33,64 ($\pm 1,04$)
GB3	39,91 ($\pm 5,63$)	37,80 ($\pm 7,95$)	36,20 ($\pm 3,06$)
GB4	30,09 ($\pm 4,04$)	30,08 ($\pm 3,42$)	29,47 ($\pm 4,24$)
GB5	34,77 ($\pm 12,88$)	36,54 ($\pm 13,46$)	36,44 ($\pm 5,56$)
GB6	37,44 ($\pm 3,33$)	40,31 ($\pm 8,65$)	39,18 ($\pm 5,47$)
GB7	34,41 ($\pm 6,67$)	34,11 ($\pm 5,86$)	33,96 ($\pm 4,82$)

Conteúdo de Ca^{2+} em 20 μm , 30 μm e 50 μm . Valores expressos em % peso, como média $\pm$ D.P.

Tabela A.2 – Conteúdo de P a 20 μm , 30 μm e 50 μm

Grupo	20 μm	30 μm	50 μm
GA1	16,56 ($\pm 1,26$)	16,89 ($\pm 3,52$)	16,51 ($\pm 2,39$)
GA2	17,79 ($\pm 0,81$)	19,02 ($\pm 1,07$)	18,71 ($\pm 2,03$)
GA3	16,73 ($\pm 1,81$)	17,27 ($\pm 1,85$)	17,80 ($\pm 2,45$)
GA4	17,51 ($\pm 0,62$)	17,34 ($\pm 0,90$)	17,25 ($\pm 0,66$)
GA4	15,11 ($\pm 1,53$)	15,35 ($\pm 1,82$)	15,81 ($\pm 2,24$)
GA6	16,35 ($\pm 2,28$)	17,43 ($\pm 1,84$)	16,27 ($\pm 2,33$)
GA7	16,85 ($\pm 1,62$)	17,10 ($\pm 2,35$)	17,22 ($\pm 2,01$)
GB1	17,95 ($\pm 1,31$)	18,09 ($\pm 0,76$)	18,82 ($\pm 0,64$)
GB2	17,47 ($\pm 0,39$)	18,52 ($\pm 1,89$)	17,84 ($\pm 0,82$)
GB3	18,64 ($\pm 1,78$)	17,94 ($\pm 1,94$)	18,04 ($\pm 1,16$)
GB4	16,71 ($\pm 1,58$)	16,73 ($\pm 1,14$)	16,54 ($\pm 0,96$)
GB5	16,31 ($\pm 2,73$)	16,41 ($\pm 1,53$)	17,78 ($\pm 0,74$)
GB6	17,56 ($\pm 3,55$)	16,01 ($\pm 3,78$)	18,48 ($\pm 2,34$)
GB7	17,64 ($\pm 2,11$)	17,37 ($\pm 2,31$)	17,49 ($\pm 1,33$)

Conteúdo de P em 20 μm , 30 μm e 50 μm . Valores expressos em % peso, como média $\pm$ D.P.

Tabela A.3 – Conteúdo de Mg^{2+} a 20 μm , 30 μm e 50 μm

Grupo	20 μm	30 μm	50 μm
GA1	0,72 ($\pm 0,17$)	0,57 ($\pm 0,16$)	0,72 ($\pm 0,19$)
GA2	0,33 ($\pm 0,25$)	0,40 ($\pm 0,21$)	0,33 ($\pm 0,16$)
GA3	0,34 ($\pm 0,14$)	0,25 ($\pm 0,12$)	0,34 ($\pm 0,15$)
GA4	0,37 ($\pm 0,29$)	0,41 ($\pm 0,26$)	0,44 ($\pm 0,33$)
GA4	0,40 ($\pm 0,18$)	0,43 ($\pm 0,23$)	0,35 ($\pm 0,14$)
GA6	0,21 ($\pm 0,11$)	0,30 ($\pm 0,17$)	0,26 ($\pm 0,17$)
GA7	0,39 ($\pm 0,13$)	0,33 ($\pm 0,19$)	0,40 ($\pm 0,28$)
GB1	0,42 ($\pm 0,33$)	0,45 ($\pm 0,30$)	0,47 ($\pm 0,19$)
GB2	0,64 ($\pm 0,39$)	0,76 ($\pm 0,27$)	0,76 ($\pm 0,20$)
GB3	0,26 ($\pm 0,31$)	0,24 ($\pm 0,20$)	0,30 ($\pm 0,25$)
GB4	0,42 ($\pm 0,10$)	0,42 ($\pm 0,35$)	0,59 ($\pm 0,17$)
GB5	0,28 ($\pm 0,18$)	0,46 ($\pm 0,30$)	0,42 ($\pm 0,32$)
GB6	0,26 ($\pm 0,21$)	0,25 ($\pm 0,25$)	0,31 ($\pm 0,16$)
GB7	0,44 ($\pm 0,13$)	0,44 ($\pm 0,33$)	0,43 ($\pm 0,27$)

Conteúdo de Mg^{2+} em 20 μm , 30 μm e 50 μm . Valores expressos em % peso, como média $\pm$ D.P.

Tabela A.4 – Relação molar Ca/P

Grupo	20 μm	30 μm	50 μm
GA1	2,01 ($\pm 0,22$)	2,13 ($\pm 0,15$)	2,00 ($\pm 0,23$)
GA2	2,09 ($\pm 0,28$)	1,95 ($\pm 0,14$)	2,03 ($\pm 0,22$)
GA3	1,87 ($\pm 0,15$) ^a	1,86 ($\pm 0,11$)	1,91 ($\pm 0,11$)
GA4	1,97 ($\pm 0,15$)	1,84 ($\pm 0,06$)	1,83 ($\pm 0,09$)
GA4	1,64 ($\pm 0,16$)	1,65 ($\pm 0,31$)	1,65 ($\pm 0,46$)
GA6	1,85 ($\pm 0,15$)	1,78 ($\pm 0,33$)	1,96 ($\pm 0,21$)
GA7	1,97 ($\pm 0,17$)	1,94 ($\pm 0,18$)	2,02 ($\pm 0,32$)
GB1	2,25 ($\pm 0,39$)	1,98 ($\pm 0,06$)	1,99 ($\pm 0,07$)
GB2	1,92 ($\pm 0,14$)	1,95 ($\pm 0,16$)	1,89 ($\pm 0,06$)
GB3	2,14 ($\pm 0,15$) ^a	2,09 ($\pm 0,22$)	2,01 ($\pm 0,10$)
GB4	1,80 ($\pm 0,09$) ^b	1,80 ($\pm 0,13$)	1,78 ($\pm 0,16$)
GB5	2,09 ($\pm 0,54$) ^{bc}	2,29 ($\pm 1,07$)	2,05 ($\pm 0,30$)
GB6	2,18 ($\pm 0,33$)	2,72 ($\pm 1,19$)	2,12 ($\pm 0,22$)
GB7	1,94 ($\pm 0,17$) ^c	1,96 ($\pm 0,11$)	1,93 ($\pm 0,16$)

Relação molar Ca/P em 20 μm , 30 μm e 50 μm . Valores expressos em % peso, como média $\pm$ D.P. Mesma coluna: letras sobrescritas iguais indicam diferenças estatisticamente significantes. (Testes One-way ANOVA e Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).

Tabela A.5 – Relação molar Mg/Ca em 20µm, 30µm e 50µm

Grupo	20µm	30µm	50µm
GA1	0,022(±0,007)	0,017 (±0,006)	0,022 (±0,006)
GA2	0,010 (±0,009)	0,011 (±0,008)	0,010 (±0,006)
GA3	0,011 (±0,005)	0,008 (±0,004)	0,010 (±0,004)
GA4	0,009(±0,003)	0,007 (±0,002)	0,007 (±0,003)
GA4	0,017 (±0,011)	0,020 (±0,016)	0,015 (±0,008)
GA6	0,007 (±0,004)	0,010 (±0,006)	0,008 (±0,005)
GA7	0,012 (±0,005)	0,010 (±0,007)	0,013 (±0,013)
GB1	0,011 (±0,009)	0,013 (±0,008)	0,012 (±0,005)
GB2	0,019 (±0,013)	0,022 (±0,010)	0,023 (±0,006) ^{ab}
GB3	0,007 (±0,010)	0,007 (±0,006)	0,008 (±0,007) ^b
GB4	0,010 (±0,003)	0,008 (±0,002)	0,007 (±0,001) ^{cd}
GB5	0,011 (±0,010)	0,015 (±0,010)	0,014 (±0,008)
GB6	0,007 (±0,005)	0,008 (±0,008)	0,008 (±0,004) ^{ac}
GB7	0,013 (±0,005)	0,013 (±0,010)	0,013 (±0,007) ^d

Relação molar Mg/Ca em 20µm, 30µm e 50µm. Valores expressos em % peso, como média ± D.P. Mesma coluna: mesma letra sobrescrita indica diferença, estatisticamente significativa (ANOVA e SNK, p<0,05).

Anexos

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)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa

Processo nº 28/2004

Bauru, 05 de abril de 2004.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado **“Determinação da expressão de MMP-2 e MMP-9 na saliva de pacientes portadores de lesões cervicais não cariosas”**, de autoria de Angélica Reis Hannas, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 31 de março de 2004 o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes.

Informamos que após o envio do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final, que será utilizado para publicação do trabalho.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Arsenio Sales Peres
Vice-Coordenador

Ilmº Sr. **Prof. Dr. José Carlos Pereira**
DD. Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materias Dentários

ANEXO B

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – Brasil – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (3235-8356)

Of.nº CEP/03 2006/FOB

Reg. CONEP nº 12878
Parecer CONEP nº 558/2006

REF: PROC. CEP-FOB/USP Nº 110/2005

Bauru, 09 de junho de 2006.

Senhor Professor,

Encaminhamos a V.Sª PARECER Nº 558/2006 emitido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, referente ao projeto de pesquisa **"Influência das metaloproteinases em lesões radiculares artificiais cariosas e não cariosas"** de autoria de Angélica Reis Hannas, a ser desenvolvido sob sua orientação.

Referido protocolo foi considerado **aprovado** pela CONEP.

Solicitamos que ao término do trabalho V.Sª envie um relatório para parecer final o qual será utilizado para publicações científicas.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Henrique Rubo
Coordenador

Ilmº Sr. Prof. Dr. JOSÉ CARLOS PEREIRA
DD. Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários

ANEXO C

05/31/2006 17:57

0612266453

CONEP

PAGE 01

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 558/2006

Registro CONEP: 12878 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 110/2005

Processo nº 25000.051439/2006-25

Projeto de Pesquisa: *Influência das metaloproteínas em lesões radiculares artificiais cariosas e não cariosas.*

Pesquisador Responsável: Dra. Angélica Reis Hannas

Instituição: Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo

Área Temática Especial: Cooperação estrangeira

Patrocinador: CAPES, no Programa de Doutorado no Exterior (PDEE)

Resumo/comentários

Trata-se de estudo com participação estrangeira, *in vitro*, em dentes humanos – terceiros molares, extraídos por indicação clínica – objetivando investigar se as metaloproteínas MMP-8 e 9 podem influenciar a remineralização de lesões cervicais cariosas e lesões cervicais não cariosas, artificialmente criadas na superfície radicular.

Após os primeiros ensaios laboratoriais de preparo dos segmentos radiculares – desmineralização e escovação dos espécimes – estes serão encaminhados a University of Helsinki, Finlândia, onde serão submetidos à microscopia eletrônica de varredura (MEV) e escaneamento por *Electron Probe Microanalysis* (EPMA) para avaliação do nível de mineralização.

Colabora nesta pesquisa o Dr. Leo Tjäderhane, docente da referida universidade, figurando como co-orientador, que em correspondência encaminhada a CPG da FOB/USP assume pessoalmente a responsabilidade de acompanhar a pesquisadora durante o período em que esta permanecerá trabalhando em seu laboratório, oferecendo-lhe todos os equipamentos e materiais necessários a condução da pesquisa.

Foi apresentado o termo de doação dos dentes pelo Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários, onde o doador é informado da indicação clínica da exodontia, a pesquisa a que se destinam estes espécimes e que esta doação não é obrigatória, sem prejuízo ao tratamento.

O orçamento apresentado, a ser financiado pela CAPES no Programa de Doutorado no Exterior (PDEE) totaliza R\$ 40.800,00 referentes a aquisição de reagentes, 06 meses de bolsa de estudo no PDEE e despesas com viagem.

O CEP de origem aprovou a realização da pesquisa, apresentando Parecer Consubstanciado.

Considerações

O presente estudo é relevante e apresenta-se, no aspecto metodológico, bem delineado. Solicita-se que seja acrescida à Folha de Rosto (campos 5 e 6) a informação sobre a área temática especial (cooperação estrangeira).

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Brasília, 31 de maio de 2006.

WILLIAM SAAD HOSSNE
Presidente do CONEP/CNS