UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MELISSA THIEMI KATO

**Inibição das metaloproteinases da
matriz como nova estratégia para
prevenção da erosão dentinária**

Bauru
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MELISSA THIEMI KATO

**Inibição das metaloproteinases da matriz como nova estratégia
para prevenção da erosão dentinária**

BAURU
2011

MELISSA THIEMI KATO

**Inibição das metaloproteinases da matriz como nova estratégia
para prevenção da erosão dentinária**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf.

Versão corrigida

BAURU
2011

K156i Kato, Melissa Thiemi
Inibição das metaloproteinases da matriz como
nova estratégia para prevenção da erosão
dentinária / Melissa Thiemi Kato. – Bauru, 2011.
207p. : il. ; 31cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo
Buzalaf

Nota: A versão original desta dissertação/tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

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

Assinatura:

Data: 10/08/2011

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 021/2007,
128/2008, 019/2008

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Janus

CERTIFICADO DE DEFESA

CERTIFICO, para os devidos fins, que Sr(a). Melissa Thiemi Kato, número USP 3147969, defendeu em Sessão Pública, no dia 01 de julho de 2011, no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas do(a) Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, a Tese de Doutorado intitulada:

"Inibição das metaloproteinases da matriz como nova estratégia para prevenção da erosão dentinária"

CERTIFICO, ainda, que o(a) aluno(a) faz jus ao título de Doutor em Ciências - Área: Estomatologia e Biologia Oral, tendo sido o relatório da Comissão Julgadora homologado pela Comissão de Pós-Graduação, em 15 de agosto de 2011.

Bauru, 19 de agosto de 2011.

Maria Margareth Pereira Mokarzel
Chefe Administrativo de Serviço
Pós-Graduação - FOB-USP

DEDICATÓRIA

A **Deus**, pois sempre que precisei, foi na fé que eu me agarrei e o Senhor nunca me desamparou.

Dedico este trabalho à minha família,
a quem eu devo tudo.

Aos meus pais queridos,
Jorge Kato e Cleide Kato,

Se algum dia me perguntarem como eu serei com meus filhos, e Deus há de permitir que um dia eu seja mãe, responderei que serei como meus pais foram pra mim. Não teria conseguido contornar obstáculos, enfrentado meus medos, nem atingido meus objetivos se não fosse pelo esforço, dedicação e estrutura que sempre me ofereceram. Vocês são os maiores exemplos de honestidade, trabalho, esforço e amor incondicional que um pai e mãe podem oferecer para um filho. Tenho muito orgulho de ser filha de vocês! Amo vocês!

Dedico também, ao meu anjo, **Dav**, não tenho nem palavras para expressar o quanto o seu amor incondicional é importante pra mim.

O que dizer de alguém que representa ser tudo pra alguém? Você é meu amigo, meu companheiro, meu anjo protetor, meu consolo, meu conselheiro, meu apoio, minha razão de querer ser uma pessoa melhor a cada dia!

Adorei, ou melhor, eu amei todas as fotos e desenhos que fez para minha tese!

Obrigada por tudo meu amor! Tenho certeza de que fiz a escolha certa!

Thi amo com T - H - I !!!!!!!

Aos meus irmãos,
Helder e Mirella,

e
cunhados: **Márcia e Bruno**

Com certeza nossas vidas não seriam as mesmas se não tivéssemos irmãos. Tenho muito orgulho de vocês dois. Vejam se eu não tenho vários motivos: Meu irmão é um homem feito, excelente pai e marido. Foi emancipado aos dezessete anos quando ingressou na Academia Militar do Barro Branco, vestibular super concorrido. Como não bastasse a inteligência, também passou no curso de matemática da UNESP.

Hoje em dia tem uma família linda!

Minha irmã é a pessoa mais batalhadora que eu conheço. Com seu jeito astuto, personalidade forte e cheia de amor no coração. Ama tanto os animais, que desistiu da medicina veterinária por não suportar as experiências e os sacrifícios de tais bichinhos, necessários para o aprendizado da profissão.

Não tenho razões de sobra pra me orgulhar? Amo muito vocês dois e obrigada por existirem!

Má e Bruno, dedico esse trabalho a vocês também, pois fazem parte da minha família e são os principais responsáveis pela felicidade dos meus irmãos.

A minha sobrinha **Lívia**,

Nossa princesinha... primeira filha, neta e sobrinha... você foi muito desejada!
Espero que em breve a titia Thiemi possa te dar uma priminha e que ela seja
tão meiga, doce, esperta, inteligente e linda como você!

A titia te ama muito!

A minha filha de quatro patas, **Bisteka!**

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À professora ***Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf***,

Hoje em dia, eu já consigo chamá-la de simplesmente “Má”, forma bastante íntima de pronunciar as iniciais de seu nome. Isso representa muito mais que uma aproximação da minha parte, pois sempre foi muito receptiva e amigável. Apesar da intimidade, ainda é difícil conseguir remover o “senhora” ou “professora”, pois

tamanho é o respeito que sinto pela “senhora”. Já lhe disse e deixei registrado na minha dissertação, que quando eu entrei no mestrado, a melhor notícia que eu tive foi que seria minha orientadora. Eu chorava de tanta felicidade! Pra mim você representava, e ainda representa um ícone,

um ídolo ou o inatingível. Esforcei-me ao máximo para que ao final dessa trajetória, como sua orientada, sentisse sempre orgulho de mim. Dei ao máximo de mim mesma, pois meu objetivo sempre foi ir além, mas muuuuuuito além das suas expectativas. Esforcei-me para tentar ajudá-la naquilo que eu podia e que me delegava a fazer: desde preparo de aulas, revisão de manuscritos, co-orientação dos alunos de iniciação científica, que foram dezenas deles, bem como terminar os milhares de experimentos antes que o mundo científico pudesse voltar os olhos naquilo que me cobrava e que considerávamos inusitado. Meu intuito nunca foi decepcioná-la. Obrigada por confiar em mim. Serei eternamente grata pelas oportunidades que me ofereceu.

Ao **prof. Leo Tjäderhane**, muito obrigada por ter me permitido aprender o pouco do que sei sobre o mundo das MMPs! Sou extremamente grata e saiba que pode contar sempre comigo!

À

amiga **Angélica**,

Tudo começou em outubro de 2007 quando conheci Angélica Hannas, hoje, uma grande amiga. Ela estava defendendo sua tese, a qual tinha realizado grande parte dos experimentos em Helsinki. A seu convite, o

Prof. Leo Tjäderhane foi pra Bauru.

A partir daí, nossa parceria e amizade cresceram e deram ótimos frutos. Adorei conhecê-la amiga!

Ao casal mais fofo que eu conheço: **Luiz e Angela**: tive que ir literalmente ao fim do mundo para conhecer esse casal tão

querido. Muito obrigada pela estada em Oulu e pela amizade. Contém comigo pra qualquer coisa!

À **Aline**, minha amiguinha pequenininha e muito querida, apesar de ser palmeirense... obrigada pela amizade e acima de tudo, muitíssimo obrigada por ter me ensinado a gostar de Biologia Molecular. Por sua causa, dei meus primeiros passos, os quais eu considero fundamentais para meu processo de aprendizagem. Saiba que vai ser difícil

livrar-se da minha presença, pois quero aprender muito mais com você!

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Bauru – USP**, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. José Carlos Pereira**, obrigada pela oportunidade em realizar o curso de Doutorado. Desde pequena passava em frente à faculdade e dizia: um dia estudarei aqui! Mal sabia que eu já era “USPiana”. A FOB é minha segunda casa. Por onde eu passar, sempre levantarei a bandeira da USP, pois eu amo esta instituição!

À vice diretora **Profa. Dra. Maria Aparecida Machado**, agradeço pela prontidão em ter ajudado nas solicitações de recurso financeiro junto à Pró Reitoria de Pós Graduação, enquanto era presidente da Comissão de Pós Graduação. Seu espírito político e administrador trazem muitos benefícios a nossa Faculdade!

À **Pró Reitoria de Pós Graduação**, pelo suporte financeiro que me permitiu participar de vários eventos internacionais, pelo menos um por ano, e por tornar possível a realização de estágio no exterior.

À **FAPESP**, por mais este indispensável apoio financeiro que possibilitou o meu aprimoramento acadêmico, científico e profissional, meu estágio no exterior e também o desenvolvimento deste trabalho.

À **Profa. Dra. Maria Fidela de Lima Navarro**, modelo de mulher e exemplo de profissional no mundo científico e acadêmico. Obrigada pelo carinho!

Ao **Prof. Dr. João Adolfo Caldas Navarro**, por ser meu primeiro orientador, apresentando-me à vida científica.

Ao **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**, pelo incentivo e orientação científica durante a graduação. Nosso trabalho daquela época tem gerado frutos que eu colho até hoje.

Aos professores do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru, **Dr. Gustavo, Dra. Ana Paula, Dr. Flávio, Dr. Carlos, Dr. Rumio, Dr. Gerson, Dr. Antônio, Dr. Toledo, Dr. Jesus**, com os quais eu tive

maior contato, obrigada pelo empenho, dedicação e satisfação ao transmitirem seus conhecimentos.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso**, sugeri sua participação na banca examinadora, pois tinha certeza de que contribuiria grande parte para melhora da minha defesa de doutorado. Grata por ser sempre muito solícita!

Ao **Prof. Dr. Thomas Attin**, pela oportunidade de estudar na Universidade de Zürich, Suíça. Grata pela colaboração e sugestões na fase do projeto inicial desta tese.

À **Profa. Dra. Annette Wiegand**, Universidade de Zürich, Suíça, por ter sido tão receptiva, generosa e querida. Suas contribuições foram muito importantes.

À **Profa. Dra. Tuula Salo**, por ter permitido desenvolver parte dos experimentos na Universidade de Oulu, Finlândia e pela doação das metaloproteinases que servirão em pesquisas futuras.

À **Profa. Dra. Daniela Rios**, a qual tenho profundo carinho, respeito e admiração. A Dani foi pioneira nas pesquisas de erosão na faculdade. Com certeza seu esforço no passado, facilita nossa vida no presente. Sua história de conquista e determinação faz com que eu acredite que o sonho em tornar um dia professora da FOB, pode ser possível. Muito obrigada!

À **Profa. Dra. Ana Carolina Magalhães** e minha colega de turma, apesar das nossas diferenças, acredito que me tornei uma pessoa ainda mais competitiva por me mostrar que a vida é feita de obstáculos, e que temos que contorná-los ou enfrentá-los e por isso, estamos sempre sujeitos a errar porque somos humanos, mas errar, querendo acertar.

Ao **Prof. Dr. José Roberto de Magalhães Bastos**, pela oportunidade oferecida no departamento de Saúde Coletiva. Meus primeiros passos como tentativa em ser professora foram triados de acordo com suas orientações. Obrigada pelo incentivo e pela inspiração obtida com suas experiências.

À **Profa. Dra. Sílvia Helena de Carvalho Sales Peres**, desculpe-me pelos desentendimentos. Minha intenção foi ser uma extensão do departamento de Saúde Coletiva, onde fiz meu mestrado e pude contar com sua co-orientação. Saiba que estarei sempre disponível para tudo que precisar.

Ao **Prof. Dr. Arsenio Sales Peres**, por ter me estendido as mãos no momento em que mais precisei e que estava desamparada. Se estou onde estou ou conquistei algo no mundo acadêmico, foi porque me apoiou e me deu oportunidade de iniciar numa área em que eu jamais tinha pensado e que no fim deu certo, pois amo a Odontologia Preventiva.

Ao **Prof. Dr. Rafael Mondelli**, por ter cedido inúmeras vezes o perfilômetro para análise de minhas amostras, pois sem o esse equipamento, jamais seria possível a realização de minha tese.

A todos os **professores do curso de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP que participaram direta ou indiretamente do meu aprendizado. Obrigada pelos ensinamentos.

Aos funcionários da Bioquímica: **Aline, Ovídio, Thelma e Larissa**. Sempre solidários e dispostos a me ajudar. Obrigada pelo acolhimento que sempre demonstraram terem por mim.

Aos funcionários do Laboratório de Dentística e Materiais Dentários: **Rita, Nelson, Alcides e Sandrinha**, sempre muito receptivos.

Aos funcionários da Saúde Coletiva: **Marta, Sílvia, Rosa e tia Helena**, muito obrigada pela atenção e carinho de sempre.

Aos **funcionários da biblioteca da FOB- USP**, pela prontidão, desde minha chegada à pós-graduação, orientação bibliográfica e apoio na normatização da tese.

À **Dalva e Vera**, muito obrigada por serem sempre tão eficientes!

À **Maristela**, secretária da maioria das Comissões da FOB, especialmente da Comissão de Pesquisa e Comitê de Ética em Pesquisa, com a qual tive mais contato e pude perceber sua dedicação.

À **Meg, Letícia, Fátima e Leila** pelo apoio na secretaria de Pós-Graduação.

Meus sinceros agradecimentos aos voluntários que participaram dessa pesquisa, **Agnes, Aline, Amanda, Angélica, Bruna, Bruno, Carol, Carolzinha, Cláudia, Cíntia, Dani, Davison, Flavinha, Gisele, Guilherme, Helô, Juliana, Karina, Larissa, Lia, Livia, Milene, Mirella e Senda**. Muito obrigada pela cooperação, desprendimento, dedicação e pela grande responsabilidade que demonstraram com a participação de vocês, pois sem vocês não seria possível o desenvolvimento da pesquisa.

À amiga e **Dra. Flávia Italiani**,
por toda ajuda desde a época do mestrado, fato que nos tornou grandes amigas.
Obrigada pela paciência, amizade e pelo convívio tão agradável!

À **Agnes, Claudinha, Juliana e Tatiana**, amizade nascida durante o mestrado.
Obrigada por sempre ouvirem meus desabafos. A amizade de vocês, eu levarei pra sempre comigo. Eu adoro vocês!

Ao **Juliano Pessan**, por ter me indicado à Profa. Marília na escolha da sua orientação a partir do mestrado. Com certeza, você foi primordial no meu ingresso à pós-graduação. Pode não acreditar, mas muitas das minhas decisões que tive que tomar durante minha estada na bioquímica, foram tomadas por ouvir seus conselhos. Nunca vou me esquecer de você e saiba que pode contar comigo sempre que precisar. Obrigada pelo carinho!

Ao **André Sales Peres, Bruno Zarella, Carolina Barbosa, Lia Montagnolli, Helô, Melissa, Gisele, Lucas, Suzana, Miriam, Marina, Priscila, Sushi**, meus fiéis escoteiros, por me permitirem aprender quando tentava lhes ensinar.

À **Andrieli**, minha aluninha querida de pré iniciação científica. Espero ter plantado uma sementinha dentro do seu coração. Nunca desista dos seus sonhos!

À **Claudineide Gadelha** ou apenas **Cláudia**, como é conhecida, por ter ajudado com o corte dos dentes da última fase da minha tese. Sem sua ajuda não teria acabado a tempo.

Aos amigos do laboratório de bioquímica, mesmo aqueles que não estão mais por aqui: **Bruna, Camila, Cíntia, Cristiane, Flávia Iano, Flávia Levy, Helô, Juliane, Bruna, Kelly, Livia, Mileni, Priscila, Rejane, Senda, Taísa e Vandinha**, obrigada pela amizade e pelo convívio tão agradável.

À **Marcela Calábria**, pela ajuda com o preparo das amostras e análise da microscopia eletrônica de varredura, fato que nos aproximou e nos tornou amigas.

Às amigas, solidárias sempre, cada uma a seu modo, **Cacau, Etiene e Fernanda**, Sei que posso contar com vocês. Muito obrigada!

À família **Alvares, Dirceu, Lúcia, Luciana e Lidiane**, por vocês terem me recebido como membro da família.

Aos colegas e amigos do **SEST/SENAT**, ao diretor da unidade, **Milton Yamada, Dra. Adriana, Dra. Elisângela, Dr. Fábio, Dra. Rita, Dra. Renata, Valéria, Karina, Dra. Cássia, Bárbara, Renata, Patrícia, Carlos, Fábio, Leandro, Mário, Marinho, Paulo, Waldecir, Graciany, Ana, Giovana, Eleandro, Paulino, Waldomiro, Ivonete, Fátima, Kelly**.

Às alunas do curso de auxiliar e técnico em saúde bucal do **Instituto Ana Nery e Uningá**, pois aprendi muito com vocês, bem como, aos coordenadores, **Marta e André** pela oportunidade oferecida!

À **Focus Idiomas** e à **profa. Marina** por me treinar nas apresentações em inglês.

À **Editores Abril e Revista Saúde** por acreditarem e incentivarem premiações na área de saúde e por ter nos concedido o primeiro lugar do “Prêmio Saúde é Vital” na categoria Saúde Bucal.

Ao **IADR e Colgate**, por ter nos concedido o prêmio IADR/Colgate Research in Prevention Travel Awards em San Diego-EUA, março de 2011, fechando com chave de ouro todo nosso esforço e dedicação conferida nesta tese de doutorado.

Àqueles que não mencionei, mas, que de alguma forma, colaboraram com a realização deste trabalho e com meu desenvolvimento científico e pessoal, meu mais sincero agradecimento. Tenho certeza de que tudo valeu a pena.

“O futuro tem muitos nomes. Para os fracos, é o inatingível. Para os temerosos, o desconhecido. Para os valentes, a oportunidade.”

Victor Hugo

“Um homem leva muito tempo a fazer-se porque é preciso que se prepare para se movimentar à vontade no campo do espírito. Tem de crescer não apenas corporalmente. Deve atingir uma envergadura que ultrapassa em muito o âmbito das coisas materiais. Deve fazer-se... homem.”

Paulo Geraldo

“A firmeza de propósitos consiste em mesmo sem ter muita esperança ter a determinação necessária para transformar a situação.”

F. Scott Fitz Gerald

RESUMO

A degradação da dentina pelas metaloproteinases da matriz (MMPs) pode facilitar a progressão de lesões erosivas. Objetivos: Avaliar, por meio de uma série de 5 subprojetos: 1) A atividade de MMPs em dentina bovina e humana; 2) O efeito do chá verde contra erosão/abrasão de dentina; 3 e 4) Géis contendo inibidores de MMPs (epigallocatechin-3-galate-EGCG, clorexidina-CHX e sulfato ferroso-FeSO₄) sobre a prevenção de erosão de dentina sozinha ou associada à abrasão, respectivamente, e 5) Sobre a degradação de colágeno e desgaste. Material e Métodos: 1) Extração proteica de dentina de coroa e raiz bovina e humana foi realizada (ácido cítrico a 0,87 M, pH 2,3) e testada por zimografia e atividades gelatinolíticas; 2) Voluntários (n=10) bochecharam chá verde ou água (1 min, 10 mL) entre os desafios erosivos (Coca-Cola, pH 2,6, 4x/dia/5 min, extraoralmente) e abrasivos. A abrasão (escova elétrica + dentífrico não fluoretado) foi realizada imediatamente ou 30 min depois da erosão por 30 s. O desgaste da dentina foi analisado por perfilometria (µm); 3 e 4) Voluntários (n=10-13) utilizaram dispositivos palatinos contendo 12 blocos de dentina e distribuídos aleatoriamente para 6 grupos, de acordo com o tipo de gel aplicado ou não (não tratado-NT). Os géis tinham composição idêntica, exceto pela presença de EGCG (400 µM), CHX (0,012%), FeSO₄ (1 mM), flúor (NaF-1,23%) ou sem ativo (Placebo-P). Os géis foram ou não aplicados sobre os espécimes em fina camada e removidos depois de 1 min. A erosão (Coca-Cola, pH 2,6, 4x5min/dia, extraoralmente) foi realizada por 5 ou 10 dias, respectivamente. A cada dia, depois do primeiro e último desafios erosivos, os blocos eram (ERO) ou não escovados (ERO+ABR) por 15 s (escova elétrica + solução de dentífrico não fluoretado). O desgaste da dentina foi avaliado por perfilometria (µm) depois de 5 e 10 dias. 5) Dentina (n=45/grupo) foi desmineralizada com ácido cítrico (0,87 M, pH 2,3) por 36 h. Na sequência, foi ou não tratada (NT) com os mesmos géis descritos acima e estocada em saliva artificial (5 dias, 37°C), contendo inibidores de protease EDTA-free e collagenase (*Clostridium histolyticum*, 238 U/mL). A degradação de colágeno foi analisada pelo conteúdo de hidroxiprolina (µg/mL) e o desgaste dentinário avaliado por perfilometria (µm, n=12/grupo,). Os dados foram analisados por ANOVA (p<0,05). Resultados: A dentina bovina mostrou ser um substrato confiável para estudos envolvendo atividades de MMPs. O chá verde reduziu o desgaste dentinário para todas as condições. A média de desgaste

e de degradação de colágeno foi significativamente reduzida para os géis experimentais quando comparados aos géis NaF e P ou NT, em todos os protocolos testados. Para ERO, o desgaste não aumentou significativamente com tempo, enquanto que para ERO+ABR, foi observado um aumento significativo com o tempo para os gel de NaF e NT. Conclusão: O uso de bochecho com chá verde, bem como de um gel como veículo de aplicação de inibidores de MMP demonstrou reduzir consistentemente a degradação de colágeno e o desgaste e promoveu prevenção duradoura contra erosão e erosão mais abrasão em dentina.

Palavras-chave: Abrasão. Dentina, Erosão. Flúor. Metaloproteinases da matriz. MMP.

ABSTRACT

Matrix metalloproteinases inhibition as a new strategy to prevent dentin erosion

The dentin degradation by matrix metalloproteinases (MMPs) can increase the progression of erosive lesions. Objectives: Five studies were conducted to evaluate: 1) The activity of MMPs in bovine and human dentin; 2) The effect of green tea rinse against dentin erosion/abrasion; 3 and 4) Gels containing MMP inhibitors (epigallocatechin-3-gallate-EGCG, chlorhexidine-CHX and ferrous sulphate-FeSO₄) to prevent dentin erosion alone or associated with abrasion, respectively, and 5) On collagen degradation and wear. Material and Methods: 1) Protein extraction from crown and root of bovine and human dentin was performed (0.87 M citric acid, pH 2.3) and tested by zymography and gelatinolytic activities; 2) Volunteers (n=10) rinsed with green tea or water (1 min, 10 mL) between the erosive (Coke, pH 2.6, 4x5min/day, extraorally) and abrasive challenges. The abrasion (electric toothbrush + fluoride-free toothpaste) was performed immediately or 30 min after erosion for 30 s. Dentin wear was analyzed by profilometry (µm); 3 and 4) Volunteers (n=10-13) wore palatal devices containing 12 bovine dentin blocks randomly allocated to 6 groups, according to the type of gels applied or not (not treated-NT). The gels had identical composition, except for the presence of EGCG (400 µM), CHX (0.012%), FeSO₄ (1 mM), fluoride (NaF-1.23%) or not (Placebo-P). Gels were applied or not on specimens once in a thin layer and removed after 1 min. Erosion (Coke, pH 2.6, 4x5 min/day, extraorally) was performed for 5 or 10 days, respectively. Each day, after first and last erosive challenges, blocks were (ERO) or not brushed (ERO+ABR) for 15 s (electric toothbrush + fluoride-free toothpaste slurry). Dentin wear was evaluated by profilometry (µm) after days 5 and 10. 5) Demineralization of dentin (n=45/group) was performed with 0.87 M citric acid, pH 2.3, for 36 h. In sequence, dentin was or not (NT) treated with the same gels described above. Specimens were stored in artificial saliva (5 days, 37°C), containing EDTA-free protease inhibitors and collagenase (*Clostridium histolyticum*, 238 U/mL). Collagen degradation was analyzed by hydroxyproline content (µg/mL) and dentin wear was evaluated by profilometry (µm, n=12/group). Data were analyzed by ANOVA (p<0.05). Results: Bovine dentin showed to be a reliable substrate for studies involving the activity of

MMPs. Green tea significantly reduced the dentin wear for all conditions. The mean wear and collagen degradation was significantly reduced for the experimental gels when compared to NaF and P gels or NT in all protocols tested. For ERO, wear did not significantly increase with time, while for ERO+ABR, significant increase along time was observed for NaF, P and NT. Association between ERO and ABR was only able to significantly increase the wear at 10 days for NaF and NT. Conclusion: The use of green tea rinse and a gel as a vehicle to deliver MMP inhibitors to dentin was shown to consistently reduce collagen degradation and provide long-lasting prevention against dentin erosion and erosion plus abrasion.

Key words: Abrasion. Dentin. Erosion. Fluoride. Matrix metalloproteinases. MMP

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ag	Elemento químico prata, prata
Al	elemento químico alumínio, alumínio
ANOVA	análise de variância
APMA	acetato de 4-aminofenilmercúrio
Ca	elemento químico cálcio, cálcio
Ca ⁺²	íon cálcio
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CaF ₂	fluoreto de cálcio
CaSO ₄	sulfato de cálcio
CHX	clorexidina
cm	centímetro
Cu	elemento químico cobre, cobre
CuSO ₄	sulfato de cobre
DAB	(inglês) p- dimethylaminobenzaldehyde
DL ₅₀	dose letal em que a concentração de uma substância química é capaz de matar 50% da população testada
DP	desvio padrão
<i>et al.</i>	(latim) - e colaboradores
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGCG	epigallocatech-galate ou epigallocatequina galato
<i>ex vivo</i>	vide <i>in situ</i> , pesquisa antigamente realizada no ser humano
FeSO ₄	sulfato de ferro
FeSO ₄ .7H ₂ O	sulfato de ferro hepta-hidratado
F	elemento químico flúor, fúor
F ⁻	íon fluoreto
Fe	elemento químico ferro, ferro
Fe ²⁺	íon ferro II
Fe ³⁺	íon ferro III
FeSO ₄	sulfato ferroso
g	grama
h	hora

H ⁺	íon hidrogênio
HCl	ácido clorídrico
HEPES	(inglês) 4- (2-hydroxyerhyl) piperazine-1-erhanesulfonic
Hg	elemento químico mercúrio, mercúrio
HgSO ₄	sulfato de mercúrio
H ₂ NC(CH ₂ OH) ₃	TRIS
H ₂ Od	água deionizada
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IC ₅₀	concentração de inibição de 50%
<i>in situ</i>	(latim) – em sítio, no local (no caso, a cavidade bucal)
<i>in vitro</i>	(latim) – em laboratório
<i>in vivo</i>	(latim) – no ser humano
<i>in press</i>	(inglês) – em impressão
K	elemento químico potássio, potássio
kDa	quilo Dalton
KCl	cloreto de potássio
KHN	Knoop hardness number (número de dureza Knoop)
KH ₂ PO ₄	dihidrogenofosfato de potássio
kV	quilo Volt
L	litro
M	molar ou mol por litro
mA	miliampère
MEC	matriz extracelular
MEV	microscopia eletrônica de varredura
Mg	elemento químico magnésio, magnésio
MgCl ₂ .6H ₂ O	cloreto de magnésio hexa-hidratado
mg	miligrama
mg F/mL	miligrama de flúor por mililitro
mg/kg/dia	miligrama por quilo por dia
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mm ²	milímetro quadrado

MMP	metaloproteinase da matriz
mol/L	mol por litro
mmol/L	milimol por litro
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar ou milimol por litro
n	tamanho da amostra
ng	nanograma
ng/mL	nanograma por mililitro
Na	elemento químico sódio, sódio
NaCl	cloreto de sódio
NaF	fluoreto de sódio
NaN ₃	azida sódica
P	nível de significância
Pb	elemento químico chumbo, chumbo
pH	potencial hidrogeniônico
ppm	partes por milhão
ppm F	partes por milhão de flúor
p/v	peso por volume
QLF	(inglês) Quantitative Light-induced Fluorescence
r ²	coeficiente de correlação
rpm	rotação por minuto
s	segundo
SDS	dodecil sulfato de sódio
Sn	elemento químico estanho, estanho
TIMP	inibidor tecidual de metaloproteinase
U/mL	Unidade por mililitro
V	Volt
W	watt
Zn	elemento químico zinco, zinco
Zn ⁺²	íon zinco
ZnCl ₂	cloreto de zinco
ZnSO ₄	sulfato de zinco

μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrometro
μM	micromolar ou micromol por litro
$\mu\text{mol/L}$	micromol por litro
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
®	marca registrada
%	por cento
<	menor
>	maior
$\leq$	menor ou igual a
$\geq$	maior ou igual a
$\pm$	mais ou menos
=	igual
%PDS	porcentagem de perda de dureza superficial
~	Aproximadamente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 REVISÃO DE LITERATURA	33
2.1 Metaloproteínases da matriz e suas funções na cavidade bucal.....	37
2.2 O papel das MMPs na progressão da cárie dentária e na recidiva da lesão cariosa por infiltração em restaurações de resinas compostas	41
2.3 O papel das MMPs sobre a progressão da erosão de dentina	42
2.4 Efeito do sulfato de ferro na redução da progressão de cárie e erosão	44
3 PROPOSIÇÃO	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1 Subprojeto 1: Perfil de expressão e atividade das metaloproteínases da matriz em dentina bovina e humana	53
4.1.1 Delineamento experimental	53
4.1.2 Obtenção e preparo da amostra	54
4.1.3 Extração das proteínas	55
4.1.4 Extração das proteínas a partir de amostras recém preparadas.....	58
4.1.5 Quantificação de proteínas	59
4.1.6 Zimografia	59
4.1.6.1 Etapas da zimografia	60
4.1.6.1.1 Preparo do Gel de Separação e do Gel de Largada	60
4.1.6.1.2 Padrão de peso molecular	61
4.1.6.1.3 Controles positivos	62
4.1.6.1.4 Corrida e incubação do gel	62

4.1.6.1.5 Coloração e Descoloração do gel	63
4.1.7 Análise Densitométrica	64
4.1.8 Determinação do perfil de atividade das MMP-2 e -9.	65
4.2 Subprojeto 2: Avaliação do efeito do chá verde, inibidor natural das metaloroteinasas da matriz, sobre a erosão da dentina: um estudo <i>in situ</i>	67
4.2.1 Delineamento Experimental	67
4.2.2 Obtenção dos dentes e preparo dos blocos de dentina	68
4.2.3 Amostra e grupos experimentais	71
4.3.4 Seleção dos voluntários	72
4.2.5 Protocolo <i>in situ</i>	73
4.2.6 Análise do desgaste	74
4.2.7 Análise estatística	76
4.3 Subprojeto 3: Géis de aplicação tópica contendo inibidores de MMPs da matriz na prevenção contra erosão dentinária.....	77
4.3.1 Parte 1 - Determinação da inibição da MMP- 2 e -9 pelo sulfato ferroso	77
4.3.2 Parte 2 - Efeito de géis contendo inibidores de MMPs na prevenção da erosão dentinária <i>in situ</i>	78
4.3.2.1 Delineamento experimental.....	78
4.3.2.2 Obtenção dos dentes e preparo dos blocos de dentina	79
4.3.2.3 Amostra e grupos experimentais.....	79
4.3.2.4 Seleção dos voluntários	80
4.3.2.5 Protocolo <i>in situ</i> e tratamento	80

4.3.2.6 Análise do desgaste	81
4.3.2.7 Microscopia eletrônica de varredura	81
4.3.2.8 Análise estatística	82
4.4 Subprojeto 4 - Géis de aplicação tópica contendo inibidores de metaloproteinases da matriz na prevenção da erosão associada ou não à abrasão a longo prazo	84
4.4.1 Delineamento experimental	84
4.4.2 Obtenção dos dentes e preparo dos blocos de dentina	85
4.4.3 Amostra e grupos experimentais	87
4.4.4 Seleção dos voluntários	87
4.4.5 Protocolo <i>in situ</i> e tratamento	88
4.4.6 Análise do desgaste	90
4.4.7 Análise estatística	92
4.5 Subprojeto 5 - Estudo de prova de conceito – Efeito de inibidores de metaloproteinases da matriz sobre a preservação da matriz orgânica de dentina bovina submetida à erosão <i>in vitro</i>	93
4.5.1 Delineamento experimental	93
4.5.2 Preparo das amostras de dentina e tratamento	94
4.5.3 Determinação da hidroxiprolina	97
4.5.3.1 Procedimento.....	98
4.5.4 Análise do desgaste	99
4.5.5 Microscopia eletrônica de varredura	101
4.5.6 Análise estatística	102

5 RESULTADOS	103
5.1 Subprojeto 1	105
5.2 Subprojeto 2	108
5.3 Subprojeto 3	109
5.4 Subprojeto 4	119
5.5 Subprojeto 5	121
6 DISCUSSÕES	127
7 CONCLUSÕES	145
REFERÊNCIAS.....	151
ANEXOS	165

Introdução

Ninguém é tão grande que não possa aprender,
nem tão pequeno que não possa ensinar.
(Autor desconhecido)

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, foi constatada uma redução na incidência de cárie dentária em países desenvolvidos (PETERSSON; BRATTHALL, 1996). Dessa forma, os dentes permanecem hígidos por mais tempo na boca, o que os tornam susceptíveis a outros tipos de lesões, sendo uma delas a erosão dentária.

A erosão dentária é definida como perda irreversível de estrutura dentária, devido a um processo químico, sem envolvimento de micro-organismos (IMFELD, 1996; LITONJUA et al., 2003), desencadeado por ácidos de origem intrínseca e extrínseca. Os ácidos intrínsecos são oriundos do estômago em pacientes que apresentam anorexia, bulimia nervosa e problemas gastroesofágicos (SCHEUTZEL; 1996). A hipossalivação também pode ter influência no aparecimento da lesão, devido à diminuição na liberação de saliva responsável pelo equilíbrio do pH (tamponamento dos ácidos) (SCHEUTZEL, 1996).

Os ácidos de origem extrínseca incluem os alimentos, as bebidas, os medicamentos e produtos ácidos advindos do ambiente de trabalho (ECCLES; JENKINS, 1974; IMFELD, 1996; LITONJUA et al., 2003; YIP et al., 2003; LUSI et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2009b).

Atualmente, os ácidos extrínsecos têm sido considerados os principais fatores relacionados com a ocorrência de erosão dentária, em função de uma mudança dos hábitos dietéticos da população, que tem consumido com maior frequência alimentos ácidos (ASHER; READ, 1987; NUNN, 1996; YIP et al., 2003). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2004), o consumo de refrigerantes aumentou no Brasil em 490% de 1995 a 2003.

O frequente consumo de bebidas ácidas tem alto impacto sobre a dentina, especialmente para a população idosa, na qual é comum a ocorrência de recessão gengival e a subsequente exposição de dentina radicular, sendo este tecido dentário altamente susceptível à erosão (HARA et al., 2006b).

A dentina contém 18-20% de material orgânico, sendo 90% colágeno tipo I. A presença de uma superfície dentinária rica em colágeno parece diminuir a difusão de ácidos para o tecido, minimizando a erosão dentária (OGAARD et al., 1988; KLONT; TEN CATE, 1991; KLETER et al., 1994; GANSS et al., 2004; HARA et al., 2005). No entanto, esta matriz orgânica pode ser degradada mecânica ou

quimicamente, o que irá facilitar a posterior desmineralização. A degradação química da matriz orgânica ocorre pela ação das metaloproteinases da matriz (MMPs) presentes na própria dentina ou na saliva. Já foram detectadas as MMPs 1, 2, 3, 8, 9 e 20 em dentina e/ou saliva. Todas elas teriam potencial para degradar a matriz dentinária em situações patológicas, mas seu papel específico no desenvolvimento de lesões de cárie ainda não foi completamente elucidado, embora tenha sido relatado que indivíduos que apresentam alta concentração de MMPs na saliva ou dentina têm maior susceptibilidade à cárie dentária (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006). Isto ocorre porque as MMPs tornam-se ativas quando o pH cai, durante o metabolismo bacteriano, sendo que a subsequente neutralização salivar permite a degradação da matriz dentinária, já que as MMPs, embora sejam ativadas em pH ácido, não podem degradar a matriz orgânica de dentina neste pH (TJÄDERHANE et al., 1998). Por isso, estudos sobre agentes inibidores das MMPs são de grande valia para o tratamento de determinados pacientes (BAKER et al., 2002). No caso de pacientes de risco à erosão dentária, pode-se hipotetizar que a inibição das MMPs, poderia reduzir a velocidade de remoção desta superfície rica em colágeno, tendo, conseqüentemente, um efeito benéfico na prevenção da erosão dentinária.

Dentre os potenciais inibidores das MMPs, o chá verde, obtido da *Cammelia sinensis*, parece ter um bom potencial terapêutico, principalmente pelo fato de ser um produto natural e sem efeitos colaterais (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006).

Em virtude do exposto, se for comprovado o efeito do chá verde na inibição da erosão dentinária, a sua utilização poderá ser uma importante ação preventiva disponível para esta alteração dentária, constituindo-se uma medida de grande viabilidade, por se tratar de um produto natural, de fácil obtenção, baixo custo, sem efeitos colaterais e cujo potencial terapêutico e preventivo vem sendo sugerido para vários outros tratamentos. Em adição, se um dos mais utilizados princípios ativos do chá verde, o EGCG (epigallocatechin-gallate), tiver um efeito similar ou mesmo superior ao chá na inibição da erosão dentinária, bem como outros inibidores de metaloproteinases, como a clorexidina e o sulfato ferroso, poder-se-á pensar na incorporação dos mesmos a produtos odontológicos de uso diário, como dentifrícios e soluções para bochecho, ou de uso profissional, como vernizes e géis de aplicação tópica.

Revisão de Literatura

Há três classes de pessoas que são infelizes: a que não sabe e não pergunta, a que sabe e não ensina, a que ensina e não faz.
(V. Borda)

2 REVISÃO DE LITERATURA

Atualmente, muito se investiga a respeito da presença da camada orgânica que resta após a desmineralização (seja pelas bactérias envolvidas na formação da lesão cariosa, pelo condicionamento ácido ou pela erosão dentária) presente na dentina, a qual pode ser afetada por enzimas do próprio hospedeiro, as MMPs. Estas estão presentes tanto na saliva quanto nos tecidos dentários duros. As MMPs compreendem um grupo de enzimas capazes de degradar quase todas as proteínas da matriz extracelular, incluindo o colágeno desnaturado (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006; HANNAS et al., 2007). A collagenase MMP-8 e as gelatinases MMP-2 e -9 são as principais enzimas relacionadas à degradação da matriz de colágeno na dentina (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; MAZZONI et al., 2007; SULKALA et al., 2007; MAZZONI et al., 2009), bem como, a MMP-3 está presente na dentina (MAZZONI et al., 2011) e parece exercer alguma influência (BOUKPESSI et al., 2008).

Essas enzimas foram identificadas nas lesões de cárie tanto na forma latente, quanto na forma ativa. Com a queda do pH na presença de ácidos, as formas latentes destas enzimas tornam-se ativadas (TJÄDERHANE et al., 1998).

Suspeita-se que a atividade das MMPs possa estar envolvida na degradação das fibrilas de colágeno não protegidas pela incompleta infiltração de monômeros resinosos na dentina condicionada por ácido (PASHLEY et al., 2004; HEBLING et al., 2005; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b), o que poderia explicar a degradação progressiva da camada híbrida observada em inúmeros estudos *in vitro* (CARRILHO et al., 2007a; MUNCK et al., 2003) e *in vivo* (CARRILHO et al., 2007b; HASHIMOTO et al., 2000; HEBLING et al., 2005).

A erosão dentária é considerada um processo progressivo e destrutivo, caracterizado pela perda do tecido duro dos dentes por ação de ácidos contidos em bebidas e/ou alimentos, ou ainda, provenientes do próprio organismo (MAGALHÃES et al., 2009b). Sendo assim, poder-se-ia relacionar a progressão dos desgastes dentários por erosão com o processo de degradação das fibrilas de colágeno pelas MMPs após exposição do ambiente oral ao meio ácido, uma vez que a ação química dos ácidos sobre o dente causa a degradação da matriz orgânica, rica em colágeno, pelas MMPs e tem-se relatado que a perda dessa matriz causa uma aceleração na

desmineralização do dente (OGAARD et al., 1988; KLONT; TEN CATE, 1991; KLETER et al., 1994; GANSS et al., 2001).

O frequente consumo de bebidas ácidas apresenta alto impacto sobre a dentina, um tecido dentário altamente susceptível à erosão (HARA et al., 2006b). A dentina contém 18-20% de material orgânico, sendo 90% dele colágeno tipo I. Entretanto, a manutenção de uma superfície dentinária rica em colágeno parece diminuir a difusão de ácidos para o tecido mineralizado, minimizando a erosão dentária (OGAARD et al., 1988; KLONT; TEN CATE, 1991; KLETER et al., 1994; GANSS et al., 2001).

Inicialmente, quando há exposição da dentina aos ácidos, os minerais presentes na dentina peritubular/intertubular são liberados, ocorrendo aumento do diâmetro dos túbulos (MEURMAN et al., 1991) e exposição da camada superficial da matriz de colágeno da dentina desmineralizada. Assim, é possível que essa camada superficial de matriz de colágeno proteja a camada subjacente de dentina mineralizada contra forças mecânicas e de desgaste, ou seja, o processo de desmineralização da dentina diminui à medida que a quantidade de colágeno não degradado aumenta, uma vez que é atribuída à matriz de colágeno a capacidade de prevenir a difusão iônica através da dentina (KLONT; TEN CATE, 1991; KLETER et al., 1994). Existe uma controvérsia na literatura com relação à degradação da matriz de colágeno. Tem-se especulado que a matriz de colágeno pode ser degradada tanto mecanicamente, pela ação de forças abrasivas como aqueles decorrentes da escovação dentária (GANSS et al., 2010), quanto quimicamente pela ação das MMPs, endopeptidases responsáveis pela degradação de praticamente todas as proteínas da matriz extracelular, incluindo colágeno intacto ou desnaturado (VISSE; NAGASE, 2003). No entanto, existem trabalhos mostrando que essa degradação ocorre apenas quimicamente, pela ação das MMPs, já que as cerdas das escovas não seriam capazes de alcançar, desorganizar ou remover fibrilas (GANSS et al., 2001).

Metaloproteínases da matriz (MMPs), coletivamente conhecidas como matrixidinas, formam uma família multigene dentro da classe das metaloproteínases de endopeptidases que mediam a degradação de praticamente todas as moléculas da matriz extracelular (MEC), incluindo colágeno nativo e desnaturado (VISSE; NAGASE, 2003; SORSA et al., 2004). Agora, reconhece-se que as MMPs degradam

normalmente vários substratos, com sobreposição considerável de substratos entre MMPs individuais (HANNAS et al., 2007).

A ativação das MMPs poderia exercer um papel na progressão da erosão dentinária, uma vez que a quebra do colágeno leva à progressão de lesões de cárie em dentina (TJÄDERHANE et al., 1998). A prévia inibição das MMPs tem mostrado ser efetiva na prevenção da degradação da matriz da dentina em cárie dentinária (SULKALA et al., 2001). Assim, na presença de collagenases, a degradação da matriz desmineralizada poderia levar à progressão da erosão. Portanto, a manutenção da matriz desmineralizada poderia ser uma boa medida para prevenção de erosão em dentina.

Essa revisão de literatura apresentará de forma sucinta um conceito sobre MMPs, bem como suas funções na cavidade bucal. A seguir será discutido o papel destas enzimas no desenvolvimento da cárie e na recidiva da lesão cariosa devido à infiltração em restaurações de resinas compostas, bem como, o possível mecanismo de ação das MMPs na progressão da erosão de dentina. Será discutido ainda o efeito protetor do sulfato ferroso contra cárie e erosão.

2.1 Metaloproteínas da matriz e suas funções na cavidade bucal

As MMPs constituem uma importante família de endopeptidases metalodependentes e representam a maior classe de enzimas responsáveis pela degradação ou reabsorção de praticamente todos os componentes da matriz extracelular (MEC), facilitando o remodelamento e a migração celular (VISSE; NAGASE, 2003). Essas enzimas regulam a maior parte dos processos de desenvolvimento, homeostase e doença (STERNLICHT; WERB, 2001), sendo sintetizadas como zimogênios inativos que requerem ativação. As MMPs apresentam propriedades estruturais funcionais diferentes, porém todas exibem capacidade de degradar uma ou mais moléculas constituintes da MEC. Normalmente, estas moléculas são secretadas como zimogênios e encontram-se desativadas por inibidores específicos, também conhecidos como inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) (VISSE; NAGASE, 2003). Atualmente, das 24 MMPs diferentes identificadas, 23 delas são encontradas nos seres humanos (NAGASE; WOESSNER, 1999; VISSE; NAGASE, 2003; NUTTALL et al., 2004). Foi sugerido que cada MMP é capaz de degradar um substrato em particular. Esse conceito levou

ao uso de uma nomenclatura de acordo com o substrato de ação das MMPs. Sendo assim, em geral, as collagenases quebram colágeno fibrilar intacto, as gelatinases degradam o colágeno desnaturado (gelatina) e as metaloelastases atacam a elastina, embora atualmente, reconhece-se que as MMPs podem agir sobre múltiplos substratos, coincidindo entre MMPs individuais (HANNAS et al., 2007).

A classificação das MMPs baseada nos seus substrato é amplamente utilizada, sendo as mesmas usualmente divididas entre 6 subgrupos: collagenases (MMP-1, -8, -13 e -18 ou collagenase 1, collagenase 2, collagenase 3 e collagenase 4, respectivamente); gelatinases (MMP-2 ou gelatinase A e MMP-9 ou gelatinase B) ou ainda, collagenases tipo IV; estromelisinases (MMP-3, -10, -11 ou estromelisina 1, 2, 3, respectivamente); matrilisinas (MMP-7 ou matrilisina 1, MMP-26 ou matrilisina 2); metaloproteinases tipo membrana (MMP-14, -15, -16, 17, -24, -25 ou MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, MT5-MMP, MT6-MMP, respectivamente) e outras (MMP-12 ou elastase macrofágica, MMP-19, MMP-20 ou enamelisina, MMP-21 ou MMP *Xenopus*, MMP-23 ou CA-MMP, MMP-27 ou CMMP ou *Gallus* e MMP-28 ou epilisina (HANNAS et al., 2007).

Em geral, a classificação das MMPs corresponde à função de degradação de um determinado substrato. Portanto, as collagenases têm a habilidade em clivar o colágeno intersticial do tipo I, II e III e são capazes de digerir outras moléculas da MEC, além de moléculas que não fazem parte da MEC. As gelatinases degradam colágeno desnaturado, gelatina. A estromelisina 1 (MMP-3) e a estromelisina 2 (MMP-10) possuem especificidades ao substrato similares, mas a MMP-3 possui maior eficiência proteolítica e também ativa proMMPs. As matrilisinas processam moléculas da superfície celular e as MMPs tipo membrana (MT-MMP) são capazes de ativar a pro-MMP-2, exceto a MT4-MMP. Essas enzimas podem também digerir moléculas da MEC, sendo que a MT1-MMP é capaz de degradar colágeno tipo I, II e III e também possui papel importante na angiogênese (VISSE; NAGASE, 2003; HANNAS et al., 2007).

As MMPs são geralmente expressas como zimogênios inativos e o “pró” domínio¹ deve ser dissociado do catalítico antes da enzima ser ativada. Essa

¹ As MMPs possuem uma estrutura formada por 5 domínios protótipos, seguidos pela adição ou deleção de domínios regulatórios. As MMPs clássicas devem ter dois domínios, denominados de prodomínio (com cerca de 80 aminoácidos) e domínio catalítico, contendo um sítio ativo Zn^{+2} in Visse R, Nagase H: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827-839.

dissociação pode ser realizada pela autocatálise ou pela ação de outras enzimas proteolíticas, como a furina, plastina ou ainda por outras MMPs (GEIGER; HARPER, 1981). Além de serem ativadas pelas proteinases, as MMPs podem ser ativadas *in vitro* por agentes químicos, como os agentes modificadores de tiol, a glutadiona oxidada, o detergente surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS), agentes caotrópicos e oxigênios reativos. O tratamento térmico também pode levar à ativação das MMPs (VISSE; NAGASE, 2003). Esses agentes provavelmente agem por meio da modificação da interação zinco-cisteína, representado pelo domínio *cisteína-switch*². Tem sido demonstrado *in vitro* e *in vivo* que mudanças no pH podem ativar as gelatinases (TJÄDERHANE et al., 1998; VUOTILA et al., 2002), o que será explicado em detalhes mais adiante.

Existem diversos estudos indicando que as MMPs exercem um papel fundamental no desenvolvimento e remodelamento dos tecidos orais, incluindo a dentina (**Figura 1**). Estão envolvidas no desenvolvimento do esmalte, bem como na fluorose (CATERINA et al., 2000; DENBESTEN et al., 2002; BARTLETT et al., 2004). Elas estão também associadas com o remodelamento da matriz orgânica da dentina (HALL et al., 1999; MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; SULKALA et al., 2002). A ativação das MMP-2, -8 e -9 tem sido demonstrada desempenhar papel crucial na quebra do colágeno da dentina de lesões cariosas (TJÄDERHANE et al., 1998; SULKALA et al., 2002). Foram identificadas ainda MMPs em processos inflamatórios de polpa e região periapical (GUSMAN et al., 2002; WAHLGREN et al., 2002) e doenças periodontais (SORSA et al., 2006). As MMPs também são componentes essenciais no crescimento e invasão de tumores (SORSA et al., 2004). Mais recentemente, tem-se destacado o papel das MMPs na perda adesiva das restaurações numa relação tempo-dependente (PASHLEY ET AL., 2004; TAY; PASHLEY, 2004; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; GARCIA-GODOY et al., 2007; CHEN et al., 2008).

A matriz de dentina é uma complexa rede de estruturas fibrilares e globulares que constituem o arcabouço orgânico da dentina (MARSHALL et al., 1997). O colágeno tipo I é o principal componente da matriz dentinária, enquanto que as proteoglicanas e outras proteínas não colagenosas completam essa porção orgânica (LINDE; GOLDBERG, 1993; EMBERY et al., 2001; BUTLER et al., 2003;

² Representa o domínio catalítico, no qual a MMP será clivada para ficar na forma ativada.

GOLDBERG; SMITH, 2004). Já foram identificadas as MMP-2, -3, -8 e -9 em dentina humana (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; MAZZONI et al., 2007; SULKALA et al., 2007; MAZZONI et al., 2009; SANTOS et al., 2009; MAZZONI et al., 2011). Elas estão presentes em dentina cariada, tanto na forma ativa quanto na forma latente (pró-ativa) (TJÄDERHANE et al., 1998; VAN STRIJP, 2003). Em adição, a MMP-20 está presente ao menos no fluido dentinário (SULKALA et al., 2002).

Fonte – Tjäderhane, 2001

Figura 1 - Possíveis sítios de ação das MMPs (representadas por estrelas) na dentina e polpa.

As MMPs podem participar na organização da matriz orgânica da dentina na pré-dentina (A) ou podem regular a mineralização pelo controle do *turnover* proteoglicano da pré-dentina (B). As MMPs são incorporadas na dentina mineralizada (C). Elas podem degradar o colágeno intratubular e outras proteínas (D) ou participar na formação da dentina intratubular e mineralização (E). Em progressão de cárie, as MMPs podem estar envolvidas na liberação e ativação dos fatores de crescimento ligado à dentina (F), os quais ativariam reações de defesa da polpa. Visto que as MMPs possuem um papel na progressão da cárie dentinária, as MMPs ligadas à matriz podem participar na patogênese da cárie ou degradação da interface dentina-restauração (G). Durante a dentinogênese reparadora, as MMPs podem ter um papel na degradação da matriz ou contribuir na formação da dentina reparadora atubular (H). Finalmente, as MMPs podem participar na regulação do *turnover* da MEC no tecido pulpar (I) em condições fisiológicas e patológicas (Tjäderhane et al., 2001).

2.2 O papel das MMPs na progressão da cárie dentária e na recidiva da lesão cariosa por infiltração em restaurações de resinas compostas

A cárie dentária é definida como uma doença infecciosa causada por certas bactérias (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacilli*) presentes na cavidade bucal. Em processos cariosos, essas bactérias produzem ácidos que se difundem através dos tecidos dentários calcificados, diminuindo o pH local para abaixo de 5,5, levando à dissolução dos cristais de apatita (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006). A lesão pode ser iniciada no esmalte ou cemento, e eventualmente, progride para a dentina subjacente. Depois que parte mineral da dentina é dissolvida, a matriz orgânica da dentina é exposta à degradação por enzimas derivadas do hospedeiro ou das bactérias. É fato que a collagenase bacteriana não resiste à queda para um pH extremamente ácido (pH 4,3), sugerindo-se que a contribuição dessas enzimas para a degradação da matriz pode ser menos importante, e que enzimas proteolíticas derivadas do hospedeiro, como as MMPs dentinárias e salivares, devam ter um papel mais importante na degradação da matriz orgânica da dentina (TJÄDERHANE et al., 1998; CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006).

Por outro lado, em Odontologia adesiva, foi demonstrado que a exposição por condicionamento ácido de matrizes colágenas da dentina que foram infiltradas incompletamente por dimetacrilatos as torna sensíveis à degradação hidrolítica, mesmo na ausência de colonização bacteriana (PASHLEY et al., 2004). Os autores sugerem que as MMPs da matriz de dentina mineralizada poderiam ter sido ativadas durante o procedimento de condicionamento ácido, e seriam provavelmente responsáveis pela degradação de colágeno.

Entre as 24 diferentes MMPs que já foram identificadas (HANNAS et al., 2007), a ativação das gelatinases (MMP-2 e MMP-9), localizadas tanto em dentina (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; MAZZONI et al., 2007) quanto em saliva (VAN STRIJP, 2003), tem demonstrado exercer um papel na degradação do colágeno da dentina em lesões de cárie, assim como na camada híbrida (SULKALA et al., 2001; CARRILHO et al., 2005; HEBLING et al., 2005; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b).

Os TIMPs (inibidores teciduais de metaloproteinases) são os maiores inibidores de MMPs. Eles mantêm o equilíbrio entre destruição e formação de matriz,

e em muitas doenças, quando o equilíbrio entre MMPs e TIMPs é rompido, pode haver degradação do excesso de tecido ou acúmulo de matriz extracelular. Assim, a atual tendência para restabelecer o balanço MMP-TIMP a fim de bloquear ou reverter o progresso da doença, envolve acrescentar TIMPs no local ou inibir a atividade das MMPs (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006).

2.3 O papel das MMPs sobre a progressão da erosão de dentina

Basicamente, o esmalte do dente permanente é composto por uma parte mineral (85% do volume), na forma de cristais de (hidróxi ou flúor) apatita, organizados em prismas. Quando o pH está menor do que 4,5, os cristais de apatita são facilmente dissolvidos pelos ácidos, gerando uma lesão superficial (BUZALAF et al., 2010). Diferentemente do esmalte, a dentina permanente contém 47% de componentes inorgânicos (apatita), 33% de componentes orgânicos (colágeno) e 20% de água. Estudos têm demonstrado que a desmineralização da dentina é primeiramente aparente na interface inter e peritubular da dentina. Com o aumento do tempo de exposição, o ataque erosivo resulta no afunilamento dos túbulos, até que a dentina peritubular é completamente dissolvida. A desmineralização erosiva resulta na exposição de uma camada externa de matriz orgânica totalmente desmineralizada, seguida por uma zona parcialmente desmineralizada, até que sejam atingidas áreas mais internas da dentina (MEURMAN et al., 1991; KINNEY et al., 1995). A taxa de desmineralização da dentina diminui quando a quantidade de colágeno degradável aumenta. Acredita-se que a matriz desmineralizada dificulta a difusão iônica para dentro e para fora da área desmineralizada (KLONT; TEN CATE, 1991; KLETER et al., 1994). A matriz orgânica da dentina pode ser degradada mecânica e quimicamente, pela ação das MMPs (BIRKEDAL-HANSEN, 1995).

As MMPs podem ser ativadas pela queda no pH abaixo de 4,5, seguida pela neutralização (TJÄDERHANE et al., 1998), como ocorre durante o processo cariioso quando o pH no biofilme cai em poucos minutos após a ingestão de açúcar até ser neutralizado pelos tampões salivares. O mesmo raciocínio poderia ser aplicado para a erosão em dentina (**Figura 2**). Depois de um desafio erosivo, a queda do pH causa desmineralização da dentina, expondo as fibrilas de colágeno. Ao mesmo tempo, a queda do pH ativa as MMPs da dentina e/ou da saliva, as quais, quando o pH retorna ao nível neutro, degradam a matriz orgânica desmineralizada,

então permitindo o progresso da perda dentinária. É proposto que a aplicação de inibidores de MMP poderia reduzir a perda de dentina durante os desafios erosivos subsequentes. A camada protetora composta de matriz orgânica desmineralizada dificultaria a difusão do ácido e reduziria a progressão da erosão em dentina (GANSS et al., 2004).

Fonte – Tjäderhane et al., 1998, modificado

Figura 2 – Apresentação esquemática das sequências alternadas de desmineralização e degradação da matriz orgânica em uma lesão de dentina erodida, demonstrando as mudanças no pH (A) e mudanças correspondentes na lesão erosiva (B). Imediatamente depois de um desafio erosivo (DE), o pH diminuiu abaixo do nível no qual a desmineralização ocorre ($\text{pH} \leq 4,5$, linha pontilhada). Abaixo deste pH, as MMPs latentes são convertidas nas formas ativas (Tjäderhane et al., 1998). De acordo com a capacidade tampão da saliva, o pH aumenta lentamente, mas a desmineralização continua até o pH 5,5 (DM = período de desmineralização). Durante a desmineralização, as fibrilas de colágeno da matriz orgânica ficam expostas (B). Durante o pH baixo, a atividade das MMPs é baixa. Com o aumento do pH, a atividade das MMPs aumenta e então a matriz de colágeno desmineralizada é hidrolisada (DC = degradação do colágeno) (B). A sequência é repetida a cada desafio erosivo. Ilustração modificada de Tjäderhane et al. (1998).

Portanto, partindo-se dos conhecimentos em biologia molecular e do papel das MMPs nos diversos fenômenos que ocorrem na cavidade oral, o uso de inibidores de MMPs passou a ser considerado eficaz no tratamento dos problemas que ocorrem na cavidade oral. A clorexidina (CHX) (GENDRON et al., 1999) e o polifenol epigallocatechin-3-gallate, componente do chá verde (EGCG), apresentam

atividades inibitórias sobre distintas MMPs (DEMEULE et al., 2000; GARBISA et al., 2001; SARTOR et al., 2002; CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006) e seriam princípios ativos ideais para estudos envolvendo inibição de MMPs como estratégia para prevenção de erosão dentinária.

2.4 Efeito do sulfato de ferro na redução da progressão de cárie e erosão

Resultados de estudos conduzidos em humanos e animais têm mostrado que íons ferro (Fe^{+2} e Fe^{+3}) possuem propriedades cariostáticas. O ferro adicionado à sacarose, sozinho ou em combinação com outros íons, como flúor e cobre, possuem grande efeito na redução do potencial cariogênico do açúcar (BOWEN; PEARSON, 1994; ROSALEN et al., 1996; MIGUEL et al., 1997a, b, c).

O mecanismo exato relacionado às propriedades cariostáticas do ferro ainda não é conhecido, mas algumas hipóteses têm sido sugeridas, como redução da solubilidade do esmalte em ácidos (TORELL, 1988), redução da acidogenicidade da placa dentária (OPPERMANN; ROLLA, 1980), efeito bactericida e bacteriostático nos estreptococos mutans (DUNNING et al., 1998). Uma possível explicação para esse efeito seria a diminuição na acidogenicidade do biofilme dentário (OPPERMANN; ROLLA, 1980). O ferro poderia ter um efeito na colonização bacteriana da superfície do esmalte, bem como no metabolismo do biofilme dentário, reduzindo a produção de ácido lático e também a taxa de incorporação do açúcar para dentro da bactéria pela ação do sistema fosfotransferase (DUNNING et al., 1998). Devulapalle; Mooser (2001) demonstraram, *in vitro*, que 6 mmol/L de sulfato de ferro (FeSO_4) podem reduzir a atividade da glicosiltransferase (DEVULAPALLE; MOOSER, 2001). Essa enzima é um dos fatores de virulência mais importantes dos estreptococos mutans (HAMADA; SLADE, 1980; LOESCHE, 1986; RYTOMAA et al., 1988). Estudos *in situ* mostraram que o ferro reduz a desmineralização de blocos de esmalte *in situ* e altera a composição do biofilme formado em situação de alto desafio cariogênico (PECHARKI et al., 2005; MARTINHON et al., 2006), aumentando a concentração de fósforo (MARTINHON et al., 2006) e diminuindo a contagem de estreptococos do grupo mutans (PECHARKI et al., 2005).

Experimentos *in vitro* utilizando modelos abióticos que simulam condições erosivas (ácido acético) demonstraram que o ferro é capaz de diminuir a

desmineralização da hidroxiapatita sintética (BROOKES et al., 2004) ou pó de esmalte dentário bovino (BUZALAF et al., 2006).

Assim, foi utilizado o sulfato de ferro como suplemento de bebidas erosivas, usando o mesmo modelo abiótico, utilizando-se pó de esmalte bovino (KATO et al., 2007a) ou em bloco (KATO et al., 2007b) e substituindo-se o ácido acético por bebidas ácidas comerciais à base de ácido fosfórico (Coca-Cola®) ou ácido cítrico (Sprite Zero®), contendo ou não o sulfato de ferro. Houve redução do potencial erosivo para as duas bebidas testadas, porém não foi significativa a diferença para a bebida cítrica, podendo-se concluir que o tipo de ácido pode influenciar no seu efeito antierosivo (KATO et al., 2007a; KATO et al., 2007b).

Diante de tais resultados, foi utilizado o sulfato de ferro como bochecho durante 1 min na prevenção da erosão e erosão associada à abrasão (SALES-PERES et al., 2007). Durante 5 dias experimentais, 10 voluntários utilizaram dispositivos palatinos, contendo blocos de esmalte e dentina. Os resultados indicaram que o esmalte apresentou mais desgaste que a dentina sobre todas as condições experimentais, sendo que a solução de ferro causou uma redução significativa na %PDS (porcentagem de perda de dureza superficial) no esmalte e uma redução significativa no desgaste na dentina.

Da mesma forma descrita anteriormente por Sales-Peres et al., (2007), foi feita a tentativa de se adicionar o sulfato ferroso à bebida ácida à base de cola para redução do seu efeito erosivo num estudo *in situ* e, novamente, os resultados foram significativamente melhores para a dentina do que para o esmalte (KATO, 2007).

Assim, fica claro que o íon ferro tem ação inibitória sobre a desmineralização dentária, seja em processo carioso ou erosivo. Assim, o seu potencial na inibição da erosão merece ser testado sob outras condições, como por exemplo, seu possível potencial inibidor sobre MMPs, já que seu efeito na inibição da desmineralização parece ser melhor sobre a dentina que sobre o esmalte (KATO, 2007).

Em virtude do exposto, acredita-se que a inibição das MMPs e a consequente redução da degradação de colágeno podem apresentar um efeito benéfico na prevenção da erosão dentinária, o que foi avaliado na série de estudos apresentados nesta tese, utilizando protocolos *in vitro* e *in situ*. Antes de serem iniciados os estudos propriamente ditos, foi necessário avaliar se a dentina bovina poderia ser utilizada nos experimentos, o que foi feito por meio de um protocolo *in*

vitro. O primeiro estudo *in situ/ex vivo* avaliou o efeito de bochecho com chá verde na prevenção da erosão dentinária, associada ou não à abrasão (**Subprojeto 2**). Em estudos subsequentes, também empregando protocolos erosivos *in situ/ex vivo*, os inibidores de MMPs CHX e EGCG ou sulfato ferroso (**Subprojeto 3**) foram empregados utilizando-se géis como veículos, a fim de prolongar o tempo de contato dos mesmos com a dentina. Como houve inibição total da erosão dentinária, num estudo subsequente, o tempo de desafio erosivo foi estendido, sendo associado também a desafio abrasivo (**Subprojeto 4**). Por fim, foi realizado um estudo *in vitro* de prova-de-conceito, a fim de se demonstrar que a utilização dos géis contendo inibidores de MMPs é capaz de reduzir a degradação da camada de dentina desmineralizada (**Subprojeto 5**).

Proposição

Há três métodos para ganhar sabedoria: primeiro, por reflexão, que é o mais nobre; segundo, por imitação, que é o mais fácil; e terceiro, por experiência, que é o mais amargo.
(Confúcio)

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo é avaliar o efeito de inibidores de MMPs sobre a prevenção da erosão da dentina, associada ou não à abrasão.

As seguintes hipóteses nulas foram testadas:

1) A dentina bovina não pode ser utilizada como substituta de dentina humana em estudos envolvendo perfil de atividade de MMPs;

2) O bochecho com chá verde, depois do consumo de uma bebida ácida, não é capaz de diminuir o seu efeito sobre a erosão e a erosão associada à abrasão imediata ou mediata da dentina bovina *in situ*;

3) O sulfato de ferro não é um inibidor de MMPs;

4) O uso de diferentes inibidores de MMPs na forma de gel em uma única aplicação tópica antes do consumo de uma bebida ácida, não é capaz de diminuir o seu efeito sobre a erosão de dentina bovina *in situ*;

5) O uso de diferentes inibidores de MMPs na forma de gel de uma única aplicação tópica antes do consumo de uma bebida ácida, não é capaz de diminuir o seu efeito sobre a erosão associada ou não à abrasão de dentina bovina a longo prazo *in situ*.

6) Géis contendo inibidores de MMPs não são capazes de preservar a matriz orgânica de dentina bovina submetida à erosão *in vitro*.

Material e Métodos

Necessitamos de um grande conhecimento só para nos apercebermos da
enormidade da nossa ignorância.
(Thomas Sowell)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Subprojeto 1: Perfil de expressão e atividade das metaloproteinases da matriz em dentina bovina e humana

O manuscrito referente a este subprojeto está em fase final de revisão junto ao periódico Caries Research (**Anexo E**).

4.1.1 Delineamento experimental

Blocos de incisivos bovinos e molares humanos foram obtidos de raízes e coroas. Foram, então, triturados utilizando-se um moinho criogênico. O pó de dentina foi desmineralizado em ácido cítrico a 0,87 mol/L pH 2,3 por 24 h a 4°C sob agitação. Após a centrifugação, o pó desmineralizado de dentina foi suspenso em um tampão de extração e sonificado três vezes. As amostras foram incubadas por 24 h no tampão de extração. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e o total de concentração de proteínas foi medido pelo método de Lowry. Foi realizada análise zimográfica e da atividade gelatinolítica para as MMPs -2 e -9. (**Figura 3**).

Figura 3 - Desenho esquemático do protocolo de extração de MMPs de dentina humana e bovina.

4.1.2 Obtenção e preparo da amostra

Para a realização deste estudo foram utilizados incisivos bovinos obtidos do Frigorífico Vangélio Mondelli Ltda (Bauru-SP) e terceiros molares obtidos nas clínicas de cirurgia da FOB-USP, após aprovação pelo CEP Institucional (Proc. 128/2008, **Anexo B**). Após obtenção, os dentes permaneceram armazenados em recipientes de vidro, contendo solução de timol, em temperatura ambiente por no mínimo 6 meses.

Os dentes foram fixados com godiva termoativada (Kerr Corporation, EUA) numa placa de acrílico (40 mm X 40 mm X 5 mm) para facilitar a adaptação posterior na máquina de corte. A placa de madeira foi parafusada em um aparelho de corte de precisão ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) e, com auxílio de dois discos diamantados (Isomet 1000; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) e um espaçador de 4 mm, foram obtidas fatias com a mesma espessura, tanto da raiz quanto da coroa de dentes humanos (RH e CH, respectivamente) e bovinos (RB e CB, respectivamente), como demonstrado na **Figura 4a**. Em seguida, a superfície

de esmalte foi totalmente removida, utilizando-se lixas de carbeto de silício de granulação 320 para desgaste de todo esmalte remanescente na Politriz Metalográfica, em alta velocidade (**Figura 4b**). Os fragmentos de dentina foram então triturados em um moedor convencional tipo gral e pistilo (VEB Leuchtenbau 4600, Alemanha) (**Figuras 4c e 4d**) e o pó de dentina congelado até sua utilização.

Figura 4 - Resumo das etapas realizadas para obtenção do pó da dentina. **a**- máquina de corte e corte em coroa bovina; **b**- desgaste do esmalte para obtenção de dentina, utilizando-se politriz; **c**- trituração da dentina em triturador tipo gral e pistilo; **d**- obtenção do pó de dentina.

4.1.3 Extração das proteínas

Aproximadamente 1 g de pó de dentina de raiz ou coroa, humana e bovina foram desmineralizados com 10 mL de solução de ácido cítrico 0,26 mmol/L a 4°C por 24 h, sob agitação (MAZZONI et al., 2007). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm (Sorval RC2-B, Waltham, MA, EUA) e o pó de

dentina desmineralizado lavado duas vezes em água gelada sob agitação em vórtex e centrifugado a 2000 rpm, por 1 min. Após as lavagens, o pó foi ressuspensão em tampão de extração contendo Tris-HCl a 50 mmol/L pH 6,0, CaCl_2 a 5 mmol/L, NaCl a 100 mmol/L, Triton X-100 a 0,1%, NONIDET P-40 a 0,1%, ZnCl_2 a 0,1 mmol/L, NaN_3 0,02% e inibidores de protease.

As amostras foram então submetidas ao ultrassom a 30-40 W (Branson Sonic Power Co e Smithkline Company, Modelo Sonifier Cell Disruptor, Danbury, EUA), sendo feitas 3 exposições de 20 s cada a 4°C, com intervalo de 2 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 18000 rpm por 30 min a 4°C e o sobrenadante foi coletado. Para precipitação das proteínas foi adicionado ao sobrenadante sulfato de amônio para a concentração final de 85%, incubando-se por 30 min a 4°C. Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas a 18000 rpm por 30 min a 4°C. A **Figura 5** demonstra os passos citados. Ao final deste procedimento, um *pellet* deveria se formar, o que não aconteceu.

Figura 5 - Procedimentos para obtenção do *pellet*. **a**- Desmineralização do pó de dentina com ácido cítrico; **b**- centrifugação; **c**- coleta do sobrenadante; **d**- ressuspensão do pó de dentina em tampão de extração; **e**- sonificação; **f**- centrifugação; **g**- precipitação com sulfato de amônio.

A hipótese para tal foi que o moinho utilizado não foi adequado, pois o mesmo não apresentava controle de temperatura, e o calor gerado no atrito poderia ter resultado na desnaturação das proteínas. Um dos pontos importantes no preparo da amostra para a técnica de zimografia é que as amostras não devem ser extraídas sob condições redutoras, pois isso acarreta na perda da estrutura nativa da proteína, impedindo que a mesma seja ativada. O calor é uma condição redutora e por esse motivo, a trituração foi realizada, utilizando-se um moinho criogênico (Fisher Scientific, Modelo Spex SamplePrep 6770, PA, EUA), que acabara de ser adquirido. Além desta alteração, ao reler o artigo de Mazzoni et al. (2007), foi observada a existência de uma informação contraditória, onde na seção de materiais e métodos dizia que a concentração do ácido cítrico era 0,26 mol/L enquanto que na tabela fornecida nos resultados, a informação dada era que a concentração do ácido era de 0,87 mol/L. Diante disto, o experimento foi repetido, utilizando-se o ácido cítrico a 0,87 mol/L. Porém, a formação do *pellet* novamente não aconteceu.

Diante destas tentativas infrutíferas, suspeitou-se que as amostras poderiam ser o problema, já que tinham sido preparadas a partir de dentes antigos (~1 ano de armazenamento), e como relatado na literatura, a quantidade da MMP-2 em dentina é reduzida com o tempo (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000). Outra hipótese foi que as amostras poderiam não ter sido corretamente conservadas, uma vez que foram mantidas em timol e à temperatura ambiente por longo tempo (6 meses no mínimo), o que poderia ter causado degradação das proteínas.

O próximo passo foi, então, a busca por amostras frescas, que foram coletadas diretamente do frigorífico citado anteriormente. Cinquenta incisivos bovinos frescos foram obtidos de animais jovens, os quais são usualmente abatidos no frigorífico Mondelli. Os dentes foram coletados, limpos e imediatamente armazenados em azida sódica 0,02% a 4°C. Da mesma maneira, cerca de 40 terceiros molares humanos foram obtidos de voluntários jovens, com idade entre 18 e 25 anos, da clínica de cirurgia da Faculdade de Odontologia de Bauru. No dia após a coleta, os dentes foram cortados e lixados para remoção do esmalte, como feito para os blocos anteriores. Os novos fragmentos de dentina foram então triturados em moinho criogênico (Fisher Scientific, Modelo Spex SamplePrep 6770, PA, EUA) (**Figura 6**) e o pó de dentina foi liofilizado para conservação da amostra até o dia da sua utilização. As amostras foram divididas em quatro grupos: raiz bovina (RB), raiz humana (RH), coroa bovina (CB) e coroa humana (CH).

Figura 6 - Moinho criogênico para trituração da amostra

Os procedimentos de extração e quantificação foram realizados na Universidade de Oulu, Finlândia, sob supervisão do prof. Leo Tjäderhane.

4.1.4 Extração das proteínas a partir de amostras recém preparadas

De posse de amostras novas, cerca de 1 g de pó de dentina de raiz ou coroa, humana ou bovina foi desmineralizado com 10 mL de solução de ácido cítrico ou ácido acético a 0,26 mol/L e 0,87 mol/L pH 2,3 a 4°C por 24 h, sob agitação (MAZZONI et al., 2007), pois as informações referentes às concentrações dos ácidos testados eram contraditórias. A formação de *pellet* obtida a partir da desmineralização por ácido cítrico a 0,87 mol/L foi a que apresentou os melhores resultados. Sendo assim, para o protocolo experimental foi utilizado o ácido cítrico a 0,87 mol/L para desmineralização do pó de dentina.

O protocolo experimental foi, portanto, adaptado de Mazzoni et al. (2007). O pó de dentina desmineralizada foi suspenso em tampão de extração (Tris-HCl a 50 mmol/L e pH 6,0, CaCl₂ a 5 mmol/L, NaCl a 100 mmol/L, Triton X-100 a 0,1%, NONIDET P-40 0,1%, ZnCl₂ a 0,1 mmol/L, NaN₃ 0,02%) e coquetel de inibidores de proteases livre de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA Free, Roche). As amostras foram tratadas com ultrassom a 30-40 W (Branson Sonic Power Co e Smithkline company, Modelo Sonifier Cell Disruptor, Danbury, EUA), sendo feitas 3 exposições de 20 s cada a

4°C, com intervalo de 2 min. Os tubos foram centrifugados a 18000 rpm (19900 X g) por 30 min a 4°C e o sobrenadante foi coletado. A este sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio 85% para a precipitação das proteínas e feita incubação *overnight* (4°C). A seguir, as amostras foram centrifugadas a 18000 rpm (19900 X g) por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi redissolvido em um tampão de extração diluído 10X, e dialisado através de uma membrana para microdiálise de 50 kDa (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) por 24 h. Por fim, as amostras foram estocadas a 4°C até análise.

4.1.5 Quantificação de proteínas

A concentração total de proteína foi mensurada pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando o kit DC Protein Assay Reagent (Amersham-Pharmacia, Milão, Itália) e albumina como padrão. A leitura da absorbância foi realizada por espectrofotometria (EGeG Wallac, Modelo Victor 1420 Multilabel Counter, Turku, Finlândia) com comprimento de onda 660 nm, utilizando-se o software Wallac 1420 Victor, versão 1.00. Foram feitas determinações de proteína total, utilizando o método adaptado de Lowry (1929) (LOWRY *et al.*, 1951), em triplicata e em três diferentes estágios de preparo das amostras: antes da precipitação proteica, após a precipitação proteica e antes da diálise ou após a precipitação proteica e após a diálise.

Os sobrenadantes foram coletados e concentrados 4 vezes em um concentrador de proteínas refrigerado (Savant Speedvac System, UVS400A, Arizona, EUA). Foi observada maior concentração para os substratos que não foram precipitados com sulfato de amônio e dialisados.

4.1.6 Zimografia

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 proteico, geralmente a gelatina, é copolimerizado com acrilamida (LAEMMLI, 1970) durante a confecção do gel de separação. As enzimas são

separadas sob condições não redutoras, renaturadas com dodecil sulfato de sódio - 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 (MÄKELÄ 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 por meio 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.

4.1.6.1 Etapas da Zimografia

4.1.6.1.1 Preparo do Gel de Separação e do Gel de Largada

Primeiramente, o gel de separação foi colocado entre as placas de vidro com o auxílio de uma pipeta e foram aguardados 30 min para sua polimerização, em temperatura ambiente. O gel de poliácridamida contém gelatina como substrato.

Em seguida, o gel de largada 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.

Tabela 1 - Descrição dos constituintes do gel de poliacrilamida

Reagente/Solução	Gel de Separação a 11%	Gel de Larga a 4%
Água deionizada (H ₂ O)	2120 µL	2970 µL
30% Acrilamida + 0,8% Bisacrilamida	2920 µL	670 µL
Tampão do Gel de Separação (Tris Cl) pH 8,8	2000 µL	----
Tampão do Gel de Larga (Tris Cl) pH 6,8	-----	1250 µL
Gelatina	800 µL	-----
10 % SDS	80 µL	50 µL
TEMED	8 µL	5 µL
Persulfato de amônio 10%	80 µL	50 µL

4.1.6.1.2 Padrão de peso molecular

O padrão de peso molecular (*Pre stained SDS-PAGE Standards – Low Range*, Cat nº 161-0305, Control 300002319. BIO-RAD Laboratories Inc, CA,EUA) foi inserido no primeiro poço, calibrado com os pesos moleculares descritos na **Figura 7** 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 7- Descrição dos marcadores de peso molecular

4.1.6.1.3 Controles positivos

Controles positivos foram utilizados para confirmar as bandas correspondentes a MMP-2 e MMP-9 recombinantes humana. Foram inseridos em poços separados, contendo 0,5 ng de cada enzima MMP-2 e MMP-9 (PF037 e PF038, respectivamente Calbiochem, EMD, Biosciences Inc., La Jolla, Ca, EUA)

4.1.6.1.4 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).

Para a realização da zimografia, as amostras obtidas da extração da dentina bovina (CB, CH, RB e RH) foram imersas em um tampão não redutor (Tris HCl/SDS 0,1 mol/L pH 6,8) na proporção de 2:1 (v/v) antes da aplicação no “poço” correspondente do gel (Sistema Bio-Rad (Mini-Protean® Tetra Cell System; EUA). Após a aplicação de todas as amostras, o sistema de placas que suporta o gel foi mantido a uma temperatura de 4°C, ajustando a mili-amperagem para 20 mA, enquanto as amostras passavam pelo gel de largada e, em seguida, ajustou-se a amperagem para 10 mA para o restante da corrida. O gel de separação contendo 11% de poliacrilamida a 110 V por aproximadamente 2 h e 15 min (SULKALA et al., 2007). Com o objetivo de se confirmar se as enzimas estudadas eram MMPs, um gel representativo com as amostras foram incubadas em 1,10 fenantrolina a 3 mmol/L, um inibidor específico de MMP. (**Figuras 8 e 9**).

Figura 8 – Cuba de eletroforese

Figura 9 – Separação das proteínas durante o processo de eletroforese

4.1.6.1.5 Coloração e Descoloração do gel

Ao final da corrida, o sistema foi desmontado e o gel separado e colocado em recipiente plástico para a substituição do tampão de corrida por Tampão I de enxágue (Tris HCl, Tween 80 a 2,5%, NaN_3 a 0,02% (p/v), pH 7,5 a 22°C) e Tampão II (Tris HCl, Tween 80 a 2,5%, NaN_3 a 0,02% (p/v), ZnCl_2 a 10 $\mu\text{mol/L}$, CaCl_2 a 100 mmol/L). As soluções foram descartadas após a agitação por 30 min e substituídas por Tampão III (Tris HCl, NaN_3 a 0,02% (p/v), ZnCl_2 a 10 $\mu\text{mol/L}$, CaCl_2 a 100 mmol/L, pH 7,5, solução de incubação). Nessa etapa de incubação, o gel foi mantido em estufa (Orion®; estufa de cultura 502; Fanem; Brasil) a 37°C durante 24 h. Terminado o período de incubação, a solução de Tampão III foi substituída pelo Corante de Coomassie Blue G-250 (0,5%). O gel ficou nesse corante por um período de 30 min. Por fim, a solução corante foi substituída por uma solução descorante (metanol 30% + ácido acético 10%) (**Figuras 10 e 11**). Para confirmação dos resultados, o protocolo de preparo e corrida do gel de zimografia foi realizado em triplicata.

Figura 10 – Gel no tampão de enxágue

Figura 11 – Incubação do gel em estufa a 37°C por 24 h

4.1.7 Análise Densitométrica

A quantificação foi feita por meio da análise da quantidade de digestão enzimática. Os géis foram escaneados e então foi 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 escaneado (Image Scanner; modelo PowerLock 1120UDS; Amersham Biosciences; Suecia) e analisado em um densitômetro (Kodak Molecular Imaging, Rochester, EUA, software versão 4,5), (SORSA et al., 1994) para a quantificação das bandas.

A verificação da atividade enzimática foi feita como bandas negativas de massa molecular correspondente às enzimas com atividade gelatinolítica. Por meio desse processo, foram observadas bandas de atividade proteolítica, as quais correspondem às formas de MMP-2 e MMP-9. De acordo com o peso molecular identificado, pode-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).

4.1.8 Determinação do perfil de atividade das MMP-2 e -9

A atividade total das MMPs 2 e 9 foi determinada nos substratos de dentina (2 µg) com auxílio do kit específico de atividade gelatinolítica, separadamente para cada MMP (Matrix Metalloproteinases, MMP-2 e 9, Activity Assay Biotrak System, GE Healthcare, Reino Unido, #RPN2631 e #RPN2634 para a MMP-2 e MMP-9, respectivamente), de acordo com as instruções do fabricante. O limite de detecção da atividade da enzima foi determinada a 0,5 e 0,25 µg/mL para a MMP-2 e MMP-9, respectivamente e a curva de calibração foi de $r^2 > 0,95$. A detecção da atividade da enzima foi determinada com ou sem a adição de APMA (acetato de 4-aminofenilmercúrio), um ativador de MMP. A leitura da absorbância foi realizada por espectrofotometria (EGeG Wallac, Modelo Victor 1420 Multilabel Counter, Turku, Finlândia) com comprimento de onda 660 nm, utilizando-se o software Wallac 1420 Victor, versão 1.00. Os experimentos foram feitos em triplicatas (**Figuras 12 a 15**).

Figura 12 – Padrões específicos de detecção para a MMP-2 e MMP-9

Figura 13 – Preparo das amostras em microplaca

Figura 14 – Leitura colorimétrica da atividade da MMP-2

Figura 15 - Leitura colorimétrica da atividade da MMP-9

4.2 Subprojeto 2: Avaliação do efeito do chá verde, inibidor natural das metaloroteinases da matriz, sobre a erosão da dentina: um estudo *in situ*

O manuscrito referente a este subprojeto foi publicado no periódico Journal of Applied Oral Science (**Anexo F**).

4.2.1 Delineamento experimental

Dez voluntários adultos participaram de um estudo cruzado e cego (pesquisador), realizado em 2 fases. Em cada fase, os voluntários realizaram um bochecho por 1 min, com 10 mL de chá verde ou água de abastecimento, dependendo da fase. Em seguida, a erosão foi provocada pela imersão do dispositivo em 150 mL de Coca-Cola[®], durante 5 min. Na sequência, os voluntários realizaram os bochechos com o aparelho posicionado na boca, utilizando 10 mL da solução, durante 1 min. Para avaliação da erosão associada à abrasão, uma das fileiras horizontais, contendo 2 dos blocos, foi escovada, realizando-se movimentos de vai-e-vem com escova elétrica e dentifrício não fluoretado durante 30 s em cada bloco, imediatamente após a erosão. Outra fileira horizontal recebeu escovação após 30 min do bochecho (escovação mediata). Estes procedimentos foram repetidos 4 vezes ao dia, durante 5 dias, para cada uma das fases. A variável de resposta utilizada para avaliação da alteração da dentina foi a perfilometria (desgaste) (**Figura 16**).

Figura 16 – Desenho esquemático do protocolo experimental do subprojeto 2.

4.2.2 Obtenção dos dentes e preparo dos blocos de dentina

Aproximadamente 150 dentes incisivos bovinos extraídos de gado da raça Nelore com idade média de 36 meses, abatidos para consumo no Frigorífico Vangélio Mondelli Ltda., em Bauru, SP, foram utilizados no presente estudo. Os incisivos foram limpos com curetas periodontais para remover todo e qualquer resíduo de tecido gengival aderido à superfície e posteriormente armazenados em solução de timol a 0,1%, pH 7,0, no qual ficaram imersos durante todo o período de preparo dos espécimes de dentina. A solução foi trocada periodicamente e o período mínimo de imersão dos dentes foi de 30 dias.

Os dentes foram fixados com godiva termoativada (Kerr Corporation, EUA) no canto inferior direito de uma pequena placa de acrílico cristal (40 mm X 40 mm X 5 mm) para facilitar a adaptação na máquina de corte. A placa de acrílico foi acoplada em um aparelho de corte de precisão ISOMET Low Speed Saw (Bulher

Ltda., Lake Bluff, IL, EUA) e com o auxílio de dois discos diamantados dupla face – XLI 2205, “hight concentration”, 102 mm X 0,3 mm X 12,7 mm (Extec Corp., Enfield, CT, EUA / Ref: 12.205) e um espaçador de aço inoxidável (7 cm de diâmetro, 4 mm de espessura e orifício central de 1,3 cm) entre os discos com velocidade de 300 rpm, refrigerado com água deionizada, foram obtidos os espécimes de dentina 4 mm X 4 mm da porção mais plana da coroa (terço médio), através de uma secção dupla no sentido cérvico-incisal e outra no sentido mésio-distal (**Figuras 17 e 18**).

Figura 17 - Máquina de corte

Figura 18 - Obtenção dos espécimes

Por fim, estes blocos foram submetidos a uma planificação. Para tal, foram fixados com cera pegajosa em discos de acrílico de 30 mm de diâmetro por 8 mm de espessura, com a superfície da dentina mais externa voltada para baixo. A dentina mais interna foi planificada em uma Politriz Metalográfica com um sistema múltiplo capaz de realizar o polimento automático de 6 corpos de prova (APL 4, Arotec, Cotia, SP) com o uso de uma lixa de carbetto de silício de granulação 320 (Extec. Corp.), em baixa velocidade, durante período de até 15 s, apenas para planificação da dentina interna (**Figuras 19 e 20**).

Figura 19 - Politriz

Figura 20 – Planificação da dentina

Em seguida, os blocos foram retirados da placa e limpos com xilol (Farmácia Específica manipulação de fórmulas, Bauru, SP), para remover resíduos de cera. Os blocos novamente foram fixados, mas com a superfície do esmalte voltada para cima, com a finalidade de desgastar o esmalte até a exposição da dentina. Para isso, foi utilizada broca de diamante acoplada à caneta de alta rotação, irrigada com água deionizada por aproximadamente 5 min, até o início da exposição da dentina (**Figura 21**). A seguir, utilizaram-se lixas de carbeto de silício de granulação 320 para desgaste de todo esmalte remanescente na Politriz Metalográfica, em baixa velocidade. Para finalizar, foram utilizadas lixas 600 e 1200 (Extec. Corp.) em alta velocidade até a superfície apresentar aspecto vítreo, durante 30 e 60s, respectivamente (**Figura 22**). Entre as trocas de lixas, os discos contendo os blocos foram lavados em ultrassom T7 Thornton (Unique Ind. e Com. de produtos Eletrônicos Ltda., São Paulo, SP), durante 2 min, com água deionizada (200 mL), a fim de impedir interferência dos grãos na lisura do tecido.

Para o polimento final, utilizou-se um disco de feltro (Extec. Corp.) umedecido em solução de diamante de 1 μm (Buehler), durante 6 s. Após o último polimento, os blocos retornaram ao ultrassom durante 10 min. Metade da superfície da dentina foi protegida com esmalte de unha (Risque, Niasi, Taboão da Serra-SP), superfície esta que serve como lado controle (sem exposição à erosão superficial) e é importante para futura análise de desgaste.

4.2.3 Amostra e grupos experimentais

Para o estudo foram necessários 140 blocos de dentina, dentre os quais foram selecionados 120 blocos. Os mesmos foram padronizados a partir da média de microdureza de superfície, com uma variação permitida dentro de 10% da média. A microdureza superficial foi aferida pelo Microdurômetro (HMV 2000, Shimadzu Corporation, Japão) acoplado em um software, composto por um penetrador diamantado piramidal tipo KNOOP, com carga de 25 g aplicada por 5 s, por meio da realização de cinco endentações, realizadas em diferentes posições da dentina e com distância mínima entre elas de 200 μm (**Figuras 21 a 23**).

Figura 21 – Microdurômetro acoplado ao computador

Figura 22 – Penetração da ponta tipo Knoop para obtenção da endentação

Figura 23 – Imagem de uma endentação feita para avaliação da microdureza no bloco de dentina

Na sequência, os blocos foram aleatoriamente alocados para os grupos de acordo com o número de voluntários (n=10) e com o tipo de bochecho (chá verde ou água de abastecimento) e ocasião da escovação (imediate ou mediatamente após o bochecho). Cada grupo foi dividido em 3 subgrupos (ERO – só erosão, ERO+ABR imediata - erosão associada à abrasão imediatamente após o bochecho e ERO+ABR mediata – erosão associada à abrasão mediatamente, após 30 min do bochecho).

Figura 24 – Desenho esquemático do dispositivo palatino contendo os espécimes de dentina que foram submetidos à erosão (ERO), erosão associada à abrasão por escovação imediatamente após a erosão (ERO+ABR-I) ou após 30 min (ERO+ABR-30min).

4.2.4 Seleção dos voluntários

Foram selecionados dez adultos jovens, na faixa etária de 18 a 30 anos, residentes em área fluoretada, a partir de uma anamnese e uma avaliação de parâmetros salivares. Este trabalho foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOB – USP (processo nº 021/2007, **Anexo C**). Os voluntários só participaram da pesquisa, após explicação minuciosa de seus objetivos a partir de uma leitura da carta de esclarecimento ao voluntário e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Para a análise *in situ*, os voluntários tiveram seus arcos superiores moldados com alginato para a confecção do modelo de gesso pedra e do dispositivo intrabucal palatino em resina acrílica, no qual foram realizados 6 nichos (4x4x3 mm), 3 de cada lado (esquerdo e direito), para a fixação de 6 blocos de dentina com cera pegajosa, os quais ficaram na mesma altura da resina (**Figura 24**).

4.2.5 Protocolo *in situ*

O dispositivo foi instalado um dia antes do início da fase experimental, à noite, após a última higiene bucal, para permitir a formação da película adquirida. Durante todo o estudo e sete dias antes do experimento, os voluntários utilizaram dentifrício não fluoretado para a higiene bucal (Crest placebo, Proctor & Gamble, EUA). Os voluntários também foram instruídos a evitarem passar a língua sobre as amostras para evitar abrasão (GREGG et al., 2004). Além disso, receberam orientações por escrito e oral para não utilizarem quaisquer tipos de produtos fluoretados ou antibacterianos.

Durante os 5 dias do experimento, os voluntários só removeram o aparelho para a realização das refeições (café da manhã, almoço, jantar e antes de dormir), ocasião em que o dispositivo deveria permanecer envolvido em gaze umedecida por água de abastecimento. O intervalo máximo entre as refeições deveria ser de pelo menos 2 h. Após as refeições, a higiene bucal deveria ser realizada. Na sequência, o dispositivo deveria voltar à boca e após 5 min, o experimento era realizado.

Para provocar erosão, os voluntários imergiram o dispositivo em um copo contendo 150 mL de refrigerante (Coca-Cola®), por 5 min, à temperatura ambiente (SALES-PERES et al., 2007). O chá verde (Yamamotoyama, Midori Indústria de Chá Ltda, São Miguel Arcanjo-SP, **Figura 25**) foi preparado conforme instruções do fabricante (infusão de 2 g da erva em sachê durante 1 min, em 180 mL de água fervente), e o bochecho foi realizado com o aparelho posicionado na boca, utilizando-se 10 mL da solução, durante 1 min, após a erosão, associada ou não à abrasão imediata ou mediata por escovação. O chá preparado foi submetido a uma análise do conteúdo de EGCG através de HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), tendo sido encontrada uma concentração de 0,185 mg/mL (403,5 µmol/L). Também foi submetido a uma análise do conteúdo de flúor pelo método direto (Eletrodo Orion 9609), tendo sido encontrada uma concentração de 0,87 ppm. Como controle, os voluntários realizaram bochecho com água de abastecimento (0,6-0,8 ppm F), após a erosão, associada ou não à abrasão imediata e mediata. Para avaliação da erosão associada à abrasão, a abrasão foi promovida pela escovação de duas fileiras horizontais contendo 4 dos blocos com escova elétrica (Colgate Montions Multi-action, Brasil) por 30 s (166 oscilações/segundo) e 0,3 g de

dentifrício não fluoretado (Crest Proctor & Gamble, EUA) em cada bloco. Uma das fileiras horizontais foi escovada imediatamente após a erosão. A outra fileira horizontal recebeu escovação após 30 min do bochecho (escovação mediata).

Figura 25 – Chá verde em sachê utilizado para bochecho

4.2.6 Análise do desgaste

Ao final das fases experimentais, o esmalte cosmético de unha foi removido por deslocamento, utilizando-se cuidadosamente uma espátula. Na sequência, o desgaste da superfície da dentina foi avaliado na interface controle-erosão por perfilometria, utilizando um perfilômetro Hommel Tester T1000 basic (Hommelwerke GmbH ref. # 240851, Schwenningem, Alemanha) para análise do desgaste sofrido pela ação do refrigerante em relação ao lado controle. O aparelho foi conectado a um microcomputador que processa as informações com o auxílio de um software (Turbo Datawin-NT, Versão 1.34, Copyright® 2001). Os espécimes foram secos e o desgaste na dentina foi determinado em relação à superfície de referência (lado controle, protegido pelo esmalte de unha). Cinco leituras foram realizadas em cada bloco. Os traços perfilométricos foram tomados da superfície de referência (lado controle), atravessando a superfície exposta (lado experimental), percorrendo um total de 3 mm. A média da profundidade de desgaste foi obtida pela distância em micrometros entre a linha média do gráfico, correspondente à área protegida do espécime (superfície de referência) e o pico de desgaste (**Figuras 26 a 29**).

Figura 26 - Perfilômetro

Figura 27 – Ponta apalpadora realizando a leitura do desgaste

Figura 28 - Sentido da leitura para quantificação do desgaste (do lado controle para o lado experimental).

Figura 29 - Ilustração esquemática, mostrando o desgaste dos espécimes testados. (A) início da leitura feita pelo perfilômetro, (B) final da leitura feita pelo perfilômetro e (d) desgaste ocasionado (µm).

4.2.7 Análise estatística

Foi utilizado o *software* GraphPad Prism 4 versão 4.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Inicialmente foram cheçadas a normalidade e a homogeneidade dos dados, utilizando-se os testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, respectivamente. Estando estes parâmetros satisfeitos, os dados foram analisados por ANOVA a 2 critérios de medidas repetidas, e teste de Bonferroni para comparações individuais. O nível de significância adotado foi de 5%.

4.3 Subprojeto 3: Géis de aplicação tópica contendo inibidores de MMPs da matriz na prevenção contra erosão dentinária

Os manuscritos referentes a este subprojeto foram publicados nos periódicos Caries Research (**Anexo G**) e Journal of Dental Research (**Anexo H**).

4.3.1 Parte 1 - Determinação da inibição da MMP- 2 e -9 pelo sulfato ferroso

Com o objetivo de verificar o efeito do FeSO_4 sobre a atividade das MMP- 2 e -9, MMP-2 e -9 recombinantes humanas (PF037 e PF038, respectivamente Calbiochem, EMD, Biosciences Inc., La Jolla, Ca, EUA) foram aplicadas em gel, contendo 11% de poliacrilamida, como descrito no item **4.1.6.1.4** do Material e Métodos. Depois da eletroforese, os géis foram incubados em tampão I (Tris HCl a 50 mmol/L, Tween 80 a 2,5%, NaN_3 a 0,02% (p/v), pH 7,5 a 22°C) durante 30 min, posteriormente em tampão II (Tris HCl a 50 mmol/L, Tween 80 a 2,5%, NaN_3 a 0,2% (p/v), ZnCl_2 a 10 $\mu\text{mol/L}$ e CaCl_2 a 100 mmol/L) por mais 30 min. A seguir, os géis foram recortados em tiras de ~2 cm, e cada tira foi incubada a 37°C (Orion®; estufa de cultura 502; Fanem; Brasil) por exatamente 18 h em tampão III (Tris HCl a 50 mmol/L, NaN_3 a 0,2% (p/v), ZnCl_2 a 10 $\mu\text{mol/L}$ e CaCl_2 a 100 mmol/L), contendo FeSO_4 a 0,05, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0 ou 1,5 mmol/L. Depois do período de incubação, os géis foram extensivamente enxaguados em tampão I para remover os íons metálicos solúveis e foram então, reincubados em tampão III a 37°C por mais 18 h. Com o objetivo de se quantificar a relação de inibição das MMPs pelo FeSO_4 , as bandas eletroforéticas foram escaneadas (Image Scanner; modelo PowerLock 1120UDS; Amersham Biosciences; Suécia) e analisado em um densitômetro (Kodak Molecular Imaging, Rochester, EUA, software versão 4,5), para a quantificação das bandas (SORSA et al., 1994), como descrito no item Kodak Molecular Imaging, Rochester, EUA, software versão 4,5 como descrito no item **4.1.7** do Material e Métodos. Para se confirmar se as enzimas avaliadas eram MMPs, amostras representativas de MMPs foram incubadas com 1,10-fenantrolina a 3 mmol/L, que é um inibidor específico de MMP. A porcentagem de inibição da atividade enzimática foi analisada em função da concentração do metal. O efeito inibitório do FeSO_4 foi determinado em função da concentração do metal que inibia 50% da atividade da

enzima (IC_{50}). A porcentagem de inibição do $FeSO_4$ foi determinada comparando-se a atividade das MMPs com o seus controles (sem $FeSO_4$). Cada gel foi feito em triplicata (**Figura 30**).

Figura 30 – Desenho esquemático do protocolo do subprojeto 3, parte 1.

4.3.2 Parte 2 - Efeito de géis contendo inibidores de MMPs na prevenção da erosão dentinária *in situ*

4.3.2.1 Delineamento experimental

Dez voluntários ($n=10$) utilizaram dispositivo palatino contendo blocos de dentina ($n=10$ /grupo) tratados previamente com gel de aplicação tópica, contendo: EGCG a 10 (EGCG10) ou 400 μ M (EGCG400), clorexidina a 0,012%, $FeSO_4$ a 1 mM, F a 1,23% (NaF) ou sem nenhum princípio ativo (placebo) durante 1 min. A erosão foi realizada fora da boca em um copo contendo Coca-Cola® (5 min), 4X/dia durante 5 dias e a erosão analisada por meio do desgaste (μ m) (**Figura 31**).

Figura 31 – Desenho esquemático do protocolo do subprojeto 3, parte 2

4.3.2.2 Obtenção dos dentes e preparo dos blocos de dentina

Semelhante ao item 4.2.2 do Material e Métodos.

4.3.2.3 Amostra e grupos experimentais

Semelhante ao item 4.2.3 do Material e Métodos.

Na sequência, os blocos foram aleatoriamente alocados por sorteio para os grupos de acordo com o número de voluntários ($n=10$) e com o tipo de tratamento (gel contendo, EGCG a 10 e 400 µM, clorexidina a 0,012%, FeSO₄ a 1 mM, fluoreto de sódio a 1,23% e gel placebo, como controle negativo).

4.3.2.4 Seleção dos voluntários

Semelhante ao item **4.2.4** do Material e Métodos, sendo que foram selecionados dez adultos jovens, na faixa etária de 20 a 30 anos, residentes em área fluoretada (0,6-0,8 mg F/L), de acordo com os critérios de inclusão (RIOS et al., 2006b), a partir de uma anamnese e uma avaliação de parâmetros salivares. Este trabalho foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOB – USP (processo nº 119/2008, **Anexo D**).

4.3.2.5 Protocolo *in situ* e tratamento

Os participantes iniciaram o uso do dispositivo palatino 12 h antes do início dos desafios erosivos e para permitir a formação de película adquirida (HARA et al., 2006a). Os géis foram então aplicados em uma fina camada, utilizando um *microbrush* durante 1 min. A seguir, foram cuidadosamente removidos com cotonete. Todos os géis apresentavam a mesma composição (hidroxicelulose, propilenoglicol, metilparabeno, imidazolidinil ureia e água deionizada), exceto pela presença do princípio ativo: EGCG10 (EGCG 10 µM), EGCG400 (EGCG 400 µM), CHX (clorexidina a 0,012%), Fe (FeSO₄ 1 mM) NaF (1,23%). O gel placebo não continha nenhum princípio ativo (controle negativo) (**Figuras 32 e 33**).

Na fase intraoral, os voluntários foram instruídos a começarem os desafios erosivos 6 h depois do tratamento com o gel. Nos 5 dias seguintes, os desafios erosivos foram realizados extraoralmente 4 vezes por dia em horários predeterminados (8, 12, 16 e 20 h) após as principais refeições, ocasião em que o dispositivo deveria permanecer envolvido em gaze umedecida por água de abastecimento. O intervalo máximo entre as refeições deveria ser de 2 h. Após as refeições, a higiene bucal deveria ser realizada. Na sequência, o dispositivo deveria voltar à boca e após 5 min, a erosão era realizada.

Figura 32 - Géis formulados para aplicação tópica

Figura 33 – Utilização do *microbrush* para aplicação do gel

Para a erosão dos blocos de dentina, os voluntários foram instruídos a remover o dispositivo e imergi-lo em um copo contendo 150 mL de bebida à base de cola (pH= 2,6; Coca-Cola Company SpA, Porto Real, RJ, Brasil) durante 5 min, em temperatura ambiente. Depois do desafio erosivo, os voluntários deveriam tomar um gole da bebida e o dispositivo era então reinserido na boca.

Durante todo o estudo e sete dias antes do experimento, os voluntários utilizaram dentifrício não fluoretado para a higiene bucal (Crest placebo, Proctor & Gamble, EUA). Os voluntários também foram instruídos a evitarem passar a língua sobre as amostras para evitar abrasão (GREGG et al., 2004). Além disso, receberam orientações por escrito e falada para não utilizarem qualquer tipo de produto fluoretado ou antibacteriano.

4.3.2.6 Análise do desgaste

Semelhante ao item **4.2.6** do Material e Métodos.

4.3.2.7 Microscopia eletrônica de varredura

Dois blocos de dentina representando cada grupo foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram inicialmente imersas em solução fixadora de Karnovsky por 24 h e abundantemente enxaguadas com tampão cacodilato a 0,1 mol/L. Os blocos foram fraturados em duas partes para visualização da superfície, bem como da secção transversa da dentina

desmineralizada e sua matriz orgânica. As amostras foram então secas em temperatura ambiente por 24 h em dessecador e pulverizados com ouro (**Figuras 34 e 35**). As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV, Type XL30; Philips Electron Optics, Eindhoven, Holanda). A voltagem de aceleração foi de 25 kV e as magnificações utilizadas foram de 70, 2.000 e 8.000-vezes (**Figura 36**).

Figura 34 - Preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura

Figura 35 – Amostra metalizada com ouro

Figura 36 - Microscópio eletrônico de varredura acoplado ao computador
Universidade de São Paulo – São Carlos

4.3.2.8 Análise estatística

Foi utilizado o *software* GraphPad InStat versão 3.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Inicialmente foram checadas a normalidade e a homogeneidade dos dados, utilizando-se os testes de Kolmogorov-

Smirnov e Bartlett, respectivamente. Uma vez que estes parâmetros foram satisfeitos, os dados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas e pelo teste de Tukey para comparações individuais. O nível de significância adotado foi de 5%.

4.4 Subprojeto 4: Géis de aplicação tópica contendo inibidores de metaloproteinases da matriz na prevenção da erosão associada ou não à abrasão a longo prazo

4.4.1 Delineamento experimental

Treze voluntários (n=13) utilizaram um dispositivo palatino contendo blocos de dentina (n=26/grupo), durante uma fase total de 10 dias. As amostras de dentina foram previamente tratadas com gel de aplicação tópica, contendo 400 µM de EGCG (EGCG400), clorexidina a 0,012%, FeSO₄ a 1 mM, F a 1,23% (NaF), sem nenhum princípio ativo (placebo), durante 1 min, ou não receberam nenhum tipo de tratamento (controle negativo). A seguir, foram submetidas à erosão extraoral (4 vezes/dia, Coca-Cola[®], 5 min) ou erosão associada à abrasão extraoral (2 vezes/dia, dentífrício não fluoretado e escova elétrica, 15 s/amostra). O desgaste foi analisado por perfilometria (µm) após o quinto e o décimo dias dos desafios erosivos e/ou abrasivos (**Figura 37**).

[davison]

Figura 37 - Desenho esquemático do protocolo do Subprojeto 4

4.4.2 Obtenção dos dentes e preparo dos blocos de dentina

Aproximadamente 300 dentes incisivos bovinos extraídos de gado da raça Nelore com idade média de 36 meses, abatidos para consumo no Frigorífico Vangélio Mondelli Ltda., Bauru, SP, foram utilizados no presente estudo. Os incisivos foram limpos com curetas periodontais para remover todo e qualquer resíduo de tecido gengival aderido à superfície e posteriormente armazenados em solução de azida sódica a 0,02% e cloreto de sódio a 0,9%, pH 7,0, no qual ficaram imersos durante todo o período de preparo dos espécimes de dentina. A solução foi trocada periodicamente e o período mínimo de imersão dos dentes foi de 30 dias.

Os dentes foram fixados com godiva termoativada (Kerr Corporation, EUA) no canto inferior direito de uma pequena placa de acrílico cristal (40 X 40 X 5 mm) para facilitar a adaptação na máquina de corte. A placa de acrílico foi acoplada em um aparelho de corte de precisão ISOMET Low Speed Saw (Bulher Ltda., Lake Bluff, IL, EUA) e com o auxílio de dois discos diamantados dupla face – XLI 2205, “hight concentration”, 102 mm X 0,3 mm X 12,7 mm (Extec Corp., Enfield, CT, EUA / Ref: 12.205) e um espaçador de aço inoxidável (7 cm de diâmetro, 4 mm de espessura e orifício central de 1,3 cm) entre os discos com velocidade de 300 rpm, refrigerado com água deionizada, foram obtidos os espécimes de dentina 4 X 4mm da porção mais plana da coroa (terço médio), através de uma secção dupla no sentido cérvico-incisal e outra no sentido mésio-distal.

Por fim, estes blocos foram submetidos a uma planificação. Para tal, foram fixados com cera pegajosa em discos de acrílico de 30 mm de diâmetro por 8 mm de espessura, com a superfície da dentina mais externa voltada para baixo. A dentina mais interna foi planificada em uma Politriz Metalográfica com um sistema múltiplo capaz de realizar o polimento automático de 6 corpos de prova (APL 4, Arotec, Cotia, SP) com o uso de uma lixa de carbeto de silício de granulação 320 (Extec. Corp.), em baixa velocidade, durante período de até 15 s, apenas para planificação da dentina interna.

Em seguida, os blocos foram retirados da placa e limpos com xilol (Farmácia Específica manipulação de fórmulas, Bauru - SP), para remover resíduos de cera. Os blocos foram novamente fixados, mas com a superfície do esmalte voltada para cima, com a finalidade de desgastar o esmalte até a exposição da dentina. Para isso, foi utilizada broca de diamante acoplada à peça reta, irrigada com água deionizada por aproximadamente 5 min, até o início da exposição da dentina. A seguir, utilizaram-se lixas de carbeto de silício de granulação 320 para desgaste de todo esmalte remanescente na Politriz Metalográfica, em baixa velocidade. Para finalizar, foram utilizadas lixas 600 e 1200 (Extec. Corp.) em alta velocidade até a superfície apresentar aspecto vítreo, durante 30 e 60 s, respectivamente. Entre as trocas de lixas, os discos contendo os blocos foram lavados em ultrassom T7 Thornton (Unique Ind. e Com. de produtos Eletrônicos Ltda., São Paulo, SP), durante 2 min, com água deionizada (200 mL), a fim de impedir interferência dos grãos na lisura do tecido.

Para o polimento final, utilizou-se um disco de feltro (Extec. Corp.) umedecido em solução de diamante de 1 μm (Buehler), durante 60 s. Após o último polimento, os blocos retornaram ao ultrassom durante 10 min. Metade da superfície da dentina foi protegida com esmalte de unha (Risque, Niasi, Taboão da Serra-SP), superfície esta que serve como lado controle (sem exposição à erosão superficial) importante para futura análise de desgaste.

4.4.3 Amostra e grupos experimentais

Para o estudo foram necessários 200 blocos de dentina, dentre os quais foram selecionados 156 blocos. Os mesmos foram padronizados a partir da média de microdureza de superfície, com uma variação permitida dentro de 10% da média. A microdureza superficial foi aferida pelo Microdurômetro (HMV 2000, Shimadzu Corporation, Japão) acoplado em um software, composto por um penetrador diamantado piramidal tipo KNOOP, com carga de 25 g aplicada por 5 s, por meio da realização de cinco endentações, realizadas em diferentes posições da dentina e com distância mínima entre elas de 200 μm , como descrito no item **4.2.3** do Material e Métodos.

Na sequência, os blocos foram aleatoriamente alocados por sorteio para os grupos de acordo com o número de voluntários ($n=13$), com o tipo de tratamento (gel contendo, EGCG a 400 μM , clorexidina a 0,012%, FeSO_4 a 1 mM fluoreto de sódio a 1,23% e gel placebo e sem tratamento, como controles negativos) e com a condição experimental (erosão e erosão associada à abrasão).

4.4.4 Seleção dos voluntários

Foram selecionados treze adultos jovens, na faixa etária de 18 a 30 anos, residentes em área fluoretada (0,6-0,8 mg F/L), de acordo com os critérios de inclusão (RIOS et al., 2006b), a partir de uma anamnese e uma avaliação de parâmetros salivares. Este trabalho foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOB – USP (processo nº 019/2008, **Anexo D**). Os voluntários só participaram da pesquisa após explicação minuciosa de seus objetivos a partir de uma leitura da carta de esclarecimento ao voluntário e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Para a fase *in situ*, os voluntários tiveram seus arcos superiores moldados com alginato para a confecção do modelo de gesso pedra e do dispositivo intrabucal palatino em resina acrílica, no qual foram realizados 12 nichos (4x4x3 mm), 6 de cada lado (esquerdo e direito), para a fixação de 12 blocos de dentina com cera pegajosa, os quais ficaram na mesma altura da resina (**Figura 38**).

Figura 38 - Dispositivo palatino contendo 12 blocos de dentina. Vermelhos indicam blocos que foram submetidos à erosão e azuis foram submetidos à erosão associada à abrasão por escovação.

4.4.5 Protocolo *in situ* e tratamento

Os participantes iniciaram o uso do dispositivo palatino 12 h antes do início dos desafios erosivos, para permitir a formação de película adquirida (HARA et al., 2006a). Os géis foram então aplicados em uma fina camada, utilizando um *microbrush* durante 1 min. A seguir, foram cuidadosamente removidos com cotonete. Todos os géis apresentaram a mesma composição (hidroxicelulose, propilenoglicol, metilparabeno, imidazolidinil ureia e água deionizada), exceto pela presença do princípio ativo: EGCG (EGCG 400 μ M), CHX (clorexidina a 0,012%), Fe (FeSO₄ 1 mM) NaF (flúor a 1,23%). O gel placebo não conteve nenhum princípio ativo (P, controle negativo) e foi acrescentado um grupo que não recebeu nenhum tratamento (ST, controle negativo).

Na fase intraoral, os voluntários foram instruídos a começarem os desafios erosivos 6 h depois do tratamento com o gel. Nos 10 dias seguintes (tendo um intervalo no quinto dia), os desafios erosivos foram realizados extraoralmente 4 vezes por dia em horários predeterminados (8, 12, 16 e 20 h) após as principais refeições, ocasião em que o dispositivo deveria permanecer envolvido em gaze umedecida por água de abastecimento. O intervalo máximo entre as refeições deveria ser de 2 h. Após as refeições, a higiene bucal deveria ser realizada. Na sequência, o dispositivo deveria voltar à boca e após 5 min, a erosão deveria ser realizada.

Para a erosão dos blocos de dentina, os voluntários receberam um kit voluntário (**Figura 39**) e foram instruídos a remover o dispositivo e imergi-lo em um copo contendo 150 mL de bebida à base de cola (pH= 2,6; Coca-Cola Company Spal, Porto Real, RJ, Brasil) durante 5 min, em temperatura ambiente. Depois do desafio erosivo, os voluntários deveriam tomar um gole da bebida e o dispositivo então, reinserido na boca.

Duas vezes por dia, depois do primeiro e terceiro desafios erosivos, a abrasão foi realizada imediatamente em uma das fileiras. Cada amostra deveria ser escovada extraoralmente com uma escova elétrica (Colgate® Motions Multi-action, Brasil) por 15 s (166 oscilações/s), usando uma gota (cerca de 35 µL) de solução de dentífrico não fluoretado (Bitufo, SP, Brasil, proporção dentífrico:água = 1:3, pH 6,8).

Durante todo o estudo e sete dias antes do experimento, os voluntários utilizaram o dentífrico não fluoretado para a higiene bucal (Bitufo, SP, Brasil). Os voluntários também foram instruídos a evitarem passar a lingual sobre as amostras para evitar abrasão (GREGG et al., 2004). Além disso, receberam orientações por escrito e falada para não utilizarem qualquer tipo de produto fluoretado ou antibacteriano.

Figura 39 – Kit entregue ao voluntário, contendo uma bebida à base de cola por dia, copo para imersão do dispositivo palatino em bebida extraoralmente, caixa plástica para armazenamento do dispositivo durante os períodos de refeição, escova elétrica para escovação das amostras, escova de dentes, fio dental e dentífrico não fluoretado para uso do voluntário e solução de dentífrico para uso nas amostras.

4.4.6 Análise do desgaste

Ao final das fases experimentais e antes da avaliação de desgaste, o esmalte cosmético de unha foi removido cuidadosamente com uma espátula, evitando-se o contato com a superfície a ser analisada. O desgaste da superfície de dentina foi avaliado na interface controle-erosão-controlado por análise do gráfico topográfico, utilizando um Perfilômetro (MarSurf GD 25, Mahr, Göttingen, Alemanha) (**Figura 40**). Para tal, a ponta apalpadora foi colocada na parte controle e percorreu até a parte erodida até a segunda área controle, perfazendo-se um percurso de apalpe de aproximadamente 2,5 mm no eixo X e 5 mm no eixo Y (**Figura 41**). Por meio da utilização do software MarSurf XT 20 (Mahr, Göttingen, Alemanha), instalado em um computador ligado ao perfilômetro, obteve-se um gráfico topográfico da área total a ser analisada, o qual permitiu quantificar a diferença de altura (eixo Z) entre as faces controle-erosão-controlado (**Figura 42**). A partir da imagem topográfica, determinava-se um gráfico formado por 5 linhas, representando

cada leitura (**Figura 43**). Para cada linha, eram determinados 2 pontos, sendo um de cada lado controle, e outro na região de maior desgaste (erosão). Portanto, a média de desgaste por espécime representou a média de 10 leituras. O desgaste foi analisado no 5º e 10º dias após o início do estudo *in situ*.

Figura 40 – Perfilômetro acoplado ao computador **Figura 41** - Ponta apalpadora realizando a leitura do desgaste

Figura 42 – Imagem topográfica obtida pela leitura da superfície da dentina. As cores quentes representam área não desgastada (lado controle) e as cores frias representam a área desgastada pelo desafio erosivo

Figura 43 – Imagem topográfica convertida em gráfico formado por 5 linhas, representando cada leitura. Para cada linha, eram determinados 2 pontos, sendo um de cada lado controle, e outro na região de maior desgaste (erosão). A média de desgaste por espécime representou a média de 10 leituras.

4.4.7 Análise estatística

Foi utilizado o software Statistica for Windows versão 7.0 (Stat Soft Inc., Tulsa, EUA). Os dados passaram pelos testes de normalidade e homogeneidade. Foi adotada ANOVA de medidas repetidas a três critérios, a saber: condição (ERO ou ERO+ABR), tipo de tratamento (diferentes géis) e tempo (5 ou 10 dias). A seguir, foi aplicado teste de Tukey para comparações individuais. O nível de significância adotado foi de 5%.

4.5 Subprojeto 5: Estudo de prova de conceito – Efeito de inibidores de metaloproteinases da matriz sobre a preservação da matriz orgânica de dentina bovina submetida à erosão *in vitro*

Levando-se em consideração que a dentina desmineralizada resulta na exposição da matriz rica em colágeno, procurou-se explicar o mecanismo de ação dos inibidores de MMPs para comprovação do conceito de que a prevenção da erosão ocorre realmente pela preservação da camada de colágeno não degradada. Para tal, foi avaliada a liberação de hidroxiprolina de blocos de dentina bovina desmineralizada submetidos a tratamento prévio com géis contendo diferentes inibidores de MMPs e expostos à ação de uma collagenase bacteriana, num estudo *in vitro*.

4.5.1 Delineamento experimental

Duzentos e setenta dentes bovinos (n=9/grupo, repetido em quintuplicata) foram cortados ao longo eixo do dente, com espessura de 4 mm. A superfície foi polida (lixa 320, 600, 1200 e feltro). Para padronização do tamanho da superfície a ser submetida ao tratamento, foi colada fita adesiva (0,5 X 1 cm) sobre a face vestibular. O restante de toda a superfície do dente foi recoberta com esmalte de unhas. Em tubos J10 de 10 mL foram colocadas 3 amostras, as quais foram submetidas à desmineralização, adicionando-se 5 mL de ácido cítrico a 0,87 M, pH=2,3, durante 36 h, a 4°C. A seguir, as amostras foram retiradas do ácido, lavadas e enxugadas levemente com papel absorvente. Logo em seguida, foi realizado tratamento com aplicação tópica de gel, durante 1 min. Os grupos (n=45/grupo) foram divididos de acordo com o tipo de tratamento em: sem tratamento, gel placebo, gel contendo EGCG a 400 µM, gel contendo clorexidina (CHX) a 0,012%, gel contendo FeSO₄ a 1 mM e gel contendo NaF a 1,23%. Cada grupo foi submetido à degradação do colágeno desmineralizado pela ação da collagenase de *Clostridium histolyticum* (238,2 U/mL), adicionada em 5 mL de saliva artificial contendo inibidor de protease EDTA-free durante 5 dias, a 37°C. As amostras foram concentradas 1000 X e hidrolisadas com HCl 6 mol/L a 98°C durante 24 h. Foram liofilizadas novamente e ressuspensas em água (600 µL) para então ser realizada a dosagem da hidroxiprolina, em triplicata (**Figura 44**). As amostras de dentina foram também

analisadas por perfilometria (desgaste, μm) e submetidas à microscopia eletrônica de varredura com secagem em ponto crítico.

Figura 44 – Desenho esquemático do protocolo do subprojeto 5

4.5.2 Preparo das amostras de dentina e tratamento

Para cada análise ($n=5$), 45 espécimes de dentina foram preparados a partir de fatias da coroa de incisivos bovinos (*pool* de 9 espécimes para cada tipo de tratamento). O processo de seleção foi semelhante ao procedimento descrito no item 4.4.2 do Material e Métodos. Os dentes foram fixados com godiva termotivada (Kerr Corporation, EUA) no canto inferior direito de uma pequena placa de acrílico cristal (40 mm X 40 mm X 5 mm) para facilitar a adaptação na máquina de corte. A placa de acrílico foi acoplada em um aparelho de corte de precisão ISOMET Low Speed Saw (Bulher Ltda., Lake Bluff, IL, EUA) e inicialmente, foi separada a coroa da raiz. Cada amostra de dentina foi obtida, removendo-se o esmalte das superfícies vestibular e lingual. Para isso, com o auxílio de dois discos diamantados dupla face – XLI 2205, “high concentration”, 102 mm X 0,3 mm X 12,7 mm (Extect Corp., Enfield,

CT, EUA / Ref: 12.205) e um espaçador de aço inoxidável (7 cm de diâmetro, 4 mm de espessura e orifício central de 1,3 cm) entre os discos com velocidade de 300 rpm, refrigerado com água deionizada, foram obtidos os espécimes de dentina (4 mm de espessura), através de uma secção dupla ao longo do eixo do dente (**Figura 45**).

Por fim, estes blocos foram submetidos a uma planificação e polimento da superfície de dentina, semelhante ao procedimento descrito no item **4.2.2** do Material e Métodos.

Para padronização do tamanho da superfície a ser submetida ao tratamento, fita adesiva (0,5 X 1,0 cm) foi colada sobre a face vestibular. O restante de toda a superfície do dente foi recoberta com esmalte de unha (**Figura 48**). Em tubos J10 de 10 mL foram colocados 3 espécimes, os quais foram submetidos à desmineralização, adicionando-se 5 mL de ácido cítrico a 0,87 mol/L, pH=2,3, durante 36 h, a 4°C (**Figura 47**). A seguir, os espécimes foram enxaguados com água deionizada por 30 s e o excesso de água foi removido com papel absorvente. Imediatamente, os espécimes foram submetidos ao tratamento com gel de aplicação tópica, contendo diferentes tipos de inibidores de MMPs, durante 1 min (**Figura 48**). Os grupos (n=45/grupo) foram divididos de acordo com o tipo de tratamento em: sem tratamento, gel placebo, gel EGCG a 400 µM, gel clorexidina (CHX) a 0,012%, gel FeSO₄ a 1 mM e gel NaF a 1,23%. Cada grupo foi submetido à degradação do colágeno pela ação da collagenase de *Clostridium histolyticum* (238,2 U/mL, Collagenase, High-purity de *Clostridium histolyticum*, Sigma-Aldrich, EUA) adicionada em 5 mL de saliva artificial (CaCl₂ a 0,70 mmol/L, MgCl₂.6H₂O a 0,20 mmol/L, KH₂PO₄ a 4 mmol/L, KCl a 30 mmol/L, NaN₃ a 0,30 mmol/L, Tampão HEPES (ácido) a 20 mmol/L (PASHLEY et al., 2004) , contendo inibidor de protease EDTA-free (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA Free, Roche), sob incubação por 5 dias, a 37°C.

Figura 45 - Amostra de dentina obtida, removendo-se o esmalte das superfícies vestibular e lingual

Figura 46 – Proteção da superfície com esmalte de unha

Figura 47 – Desmineralização das amostras

Figura 48 – Amostra desmineralizada. Neste caso não foi tratada com o gel de aplicação (grupo não tratado).

Figura 49 - Concentrador de amostra

O pool obtido da saliva artificial de cada grupo (n=9) foi então concentrado (Concentrador Eppendorf AG; Concentrador plus; Alemanha) até a obtenção de 5 mL (1000 X) (**Figura 49**) e hidrolisada com HCl 6 mol/L a 98°C, durante 24 h. Na sequência a amostra foi liofilizada e ressuspensa em água (600 µL) para a dosagem da hidroxiprolina (em quintuplicata).

4.5.3 Determinação da hidroxiprolina

O colágeno é sintetizado intracelularmente em pequenas porções e exportado para fora da célula, onde, através da atuação de enzimas polimerizantes, é definido com a estrutura própria de colágeno, em hélice-tripla. Cada uma destas 3 "fitas" de proteínas são formadas quase inteiramente por glicina (que representa 1/3 da seqüência), prolina e lisina, como por mais dois aminoácidos que são modificados após serem colocados pelos ribossomos: a hidroxiprolina e a hidroxilisina (WIKIPÉDIA, 2011).

O conteúdo de hidroxiprolina pode ser determinado em procedimentos colorimétricos, nos quais a amostra é hidrolisada em ácido, filtrado e diluído. A hidroxiprolina é oxidada com cloramina-T. Depois da diluição com DAB (4-dimethylaminobenzaldehyde), uma coloração vermelho-púrpura é obtida, a qual pode ser mensurada colorimetricamente a (WOESSNER, 1961).

Portanto, com o objetivo de determinar a quantidade de colágeno degradado na dentina, foi mensurado o conteúdo de hidroxiprolina (JAMALL et al., 1981), conforme descrito abaixo:

a) *Tampão acetato-citrato*: O tampão foi preparado previamente, dissolvendo-se 57 g de acetato de sódio tri-hidratado, 37,5 g de citrato trissódico e 5,50 g de ácido cítrico monohidratado em 395 mL de isopropanol e completado para 1 L com água deionizada e destilada. O pH dessa solução foi 6,5 e foi ajustado para 6,0 pela adição de ácido clorídrico 12 M.

b) *Solução de Cloramina-T*: Uma solução de estocagem a 7% do sal de sódio de p-toluenesulfon-chloramide (Cloramina T, Sigma-Aldrich, EUA) foi preparada em água destilada e deionizada. A solução de trabalho de cloramina T foi preparada fresca, pela diluição com tampão acetato-citrato (Reagente A: 3,9 mL de Cloramina T com 1,1 mL de Tampão Acetato / Citrato).

c) *Reagente de Ehrlich*: Dez gramas de p-dimethylaminobenzaldehyde (DAB) foram dissolvidos em 11 mL de ácido perclórico 60% (p/v). Essa solução foi

estocada em frasco escuro por no máximo 2 semanas. Imediatamente antes de cada experimento, 3 mL dessa solução foram misturados com 8 mL de isopropanol (Reagente B).

d) *Solução de hidroxiprolina*: 1,0 mg de hidroxiprolina (Sigma-Aldrich, catalog H5, 440-9, EUA) diluída em isopropanol 50% para um volume final de 1 mL.

Todos os reagentes foram estocados sob refrigeração a 4°C e levados à temperatura ambiente antes do uso.

A seguir, o procedimento de análise foi realizado após a cuidadosa otimização de todos os parâmetros críticos. Isso incluiu: tempo de incubação, temperatura, pH, bem como a concentração oxidante em relação à quantidade de hidrólise presente e ausente na hidroxiprolina adicionada (**Figura 50**). As condições de formação de cromóforo, utilizando-se hidroxiprolina, foram otimizadas com o objetivo de se confirmarem as condições ótimas do experimento.

Padrões de hidroxiprolina: para obtenção da curva padrão de hidroxiprolina, foram preparados padrões contendo 1, 2, 4, 8 12 e 16 µL de hidroxiprolina da seguinte forma:

Blank- 2,000 mL Isopropanol 50%

P1- 1 µL hidroxiprolina + 1,199 mL Isopropanol 50%

P2 - 2 µL hidroxiprolina + 1,198 mL Isopropanol 50%

P3 - 4 µL hidroxiprolina + 1,196 mL Isopropanol 50%

P4 - 8 µL hidroxiprolina + 1,192 mL Isopropanol 50%

P5 - 12 µL hidroxiprolina + 1,188 mL Isopropanol 50%

P6 - 16 µL hidroxiprolina+ 1,184 mL Isopropanol 50%

4.5.3.1 Procedimento

Duzentos µL do reagente A foram adicionados às alíquotas da amostra, agitados e mantidos em temperatura ambiente por 10 min (**Figura 51**). A seguir, foi adicionado 1 mL do reagente B, feita agitação e aquecimento a 50°C em banho Maria (EVLAB; B.M./E.V. 015; Londrina; PR; Brasil) por 90 min (**Figuras 52 e 53**). A leitura da absorbância foi realizada com comprimento de onda de 558 nm em

cubetas de quartzo (Pharmacia Biotech; Ultrospec 2000; UV/ Visible Spectrophotometer; Cambridge; England). A curva de calibração foi estabelecida pela absorbância dos padrões de hidroxiprolina contra a quantidade de hidroxiprolina nestes padrões ($r^2 = 0,98$). Os dados da absorbância foram convertidos, utilizando-se a fórmula de conversão linear da curva padrão para obtenção da quantidade de hidroxiprolina da amostra, em μg . As análises de hidroxiprolina foram realizadas em triplicata, para cada experimento conduzido em quintuplicata (**Figura 54**).

4.5.5 Análise do desgaste

Semelhante ao item **4.4.6** do Material e Métodos do Subprojeto 4.

Figura 50 - Otimização de todos os parâmetros críticos e preparo prévio dos reagentes

Figura 51 – Adição do reagente A às amostras

Figura 52 – Adição do reagente B (*Erllich*)

Figura 53 – Banho Maria a 50°C por 90 min

Figura 54 – Amostras prontas para análise colorimétrica

4.5.6 Microscopia eletrônica de varredura

Dois blocos de dentina representando cada grupo foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram inicialmente imersas em solução fixadora de Karnovsky por 24 h e abundantemente enxaguadas com tampão cacodilato a 0,1 mol/L. Os blocos foram fraturados em duas partes para visualização da superfície. A seguir as amostras foram secas em ponto crítico e pulverizadas com ouro (**Figuras 55 a 57**). As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV, Leo 435VP Electron Microscopy Ltd, Clifton Road Cambridge CB1 3QH, Inglaterra) (**Figura 58**). A voltagem de aceleração foi de 25 kV e as magnificações utilizadas foram de 70, 2.000 e 8.000 vezes.

Figura 55 – Preparo das amostras para secagem em ponto crítico

Figura 56 – Equipamento de secagem em ponto crítico

Figura 57 – Metalização com ouro

Figura 58 – Microscópio eletrônico de varredura
Universidade de São Paulo – ESALQ/Piracicaba

4.5.7 Análise estatística

Para análise tanto da dosagem de hidroxiprolina quanto da perda de dentina, foi utilizado o software GraphPad Prism 4 versão 4.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Inicialmente foram checadas a normalidade e a homogeneidade. Sendo estes critérios satisfeitos, os dados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey para comparações individuais. Também foi avaliada a presença de correlação entre os resultados obtidos para a dosagem de hidroxiprolina e os dados de perda de dentina, através de regressão linear. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados

Para alcançar conhecimento adicione coisas todos os dias,
para alcançar sabedoria elimine coisas todos os dias.
(Leandro Mensa)

5 RESULTADOS

5.1 Subprojeto 1

Os dados de quantificação de proteína obtidos em absorbância foram tabulados em uma planilha de Excel (Microsoft Office 2007, EUA) para conversão linear, sendo transformados em mg/mL (Tabela 1). A concentração de proteínas obtida foi maior quando se fez apenas a extração, sem realização de precipitação ou diálise. Assim, esta condição foi escolhida para a realização do experimento (obtenção de amostra para realização de zimografia e determinação de atividade das MMP-2 e -9). Em adição, a concentração de proteínas foi similar para os 4 grupos (Tabela 2).

Tabela 2 – Quantificação proteica (mg/mL $\pm$ DP) para os diversos grupos, após extração por diferentes metodologias.

Grupos	Diálise ^a mg/mL	Com precipitação ^b mg/mL	Sem precipitação ^c mg/mL
Raiz bovina (RB)	0,083 $\pm$ 0,004	0,078 $\pm$ 0,000	0,109 $\pm$ 0,002
Raiz humana (RH)	0,087 $\pm$ 0,001	0,078 $\pm$ 0,000	0,108 $\pm$ 0,001
Coroa bovina (CB)	0,081 $\pm$ 0,000	0,077 $\pm$ 0,000	0,114 $\pm$ 0,002
Coroa humana (CH)	0,086 $\pm$ 0,000	0,077 $\pm$ 0,000	0,106 $\pm$ 0,001

^a Extração + precipitação com sulfato de sulfato de amônio a 85% + diálise.

^b Extração + precipitação com sulfato de sulfato de amônio a 85%

^c Extração apenas

O gel de zimografia representa a presença tanto das formas da pró-enzima, quanto da enzima ativa, de ambas as metaloproteinases testadas (MMP-2 e MMP-9) em todos os substratos testados (Figura 59).

Figura 59 - Atividade gelatinolítica das enzimas formas ativa e pró de MMP-2 e -9. Coluna 1 – MWM, padrão de peso molecular; Colunas 2 e 3 – Controle positivos de MMPs recombinantes humanas (MMP-2 e MMP-9, respectivamente); Colunas 4 a 7: amostras de MMPs extraídas de dentina da coroa bovina (CB), coroa humana (CH), raiz bovina e raiz humana (RH), respectivamente.

Foi examinada a presença e atividade de MMPs em dentina bovina e humana e foi possível identificar e quantificar duas das mais importantes MMPs presentes na dentina, as gelatinases A e B (MMP-2 e -9). A quantificação do perfil de atividade das MMP-2 e -9 depois da extração proteica dos diferentes substratos está apresentada na **Tabela 3**. “Endog” indica a atividade endógena das enzimas obtidas sem adição de APMA às amostras. A atividade total foi obtida pela adição de APMA às amostras. “Ativada” indica a pró enzima que foi ativada pelo APMA, obtida pela subtração da atividade endógena da atividade total.

Foi possível observar que a atividade de ambas as enzimas foi em geral similar para os substratos testados, especialmente para a MMP-9. Com relação à MMP-2, a atividade total foi 30% maior na dentina humana que na dentina bovina, tanto para raiz quanto para a coroa. Quando as amostras de coroa foram comparadas com as amostras de raízes, a atividade total da MMP-2 foi aproximadamente 20% maior em amostras de raízes.

Tabela 3 – Quantificação da atividade das MMP-2 e -9 (ng/mL $\pm$ DP) para os diferentes grupos.

Substratos	MMP-2 (ng/mL $\pm$ DP)	MMP-9 (ng/mL $\pm$ DP)
Blanck (tampão de extração)	0,14 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,00
RB Endog	3,42 $\pm$ 0,51	1,80 $\pm$ 0,02
RB Ativada	8,01 $\pm$ 1,91	13,11 $\pm$ 0,20
RB atividade total	11,43 $\pm$ 2,21	14,91 $\pm$ 2,02
RH Endog	5,59 $\pm$ 0,00	4,61 $\pm$ 0,02
RH Ativada	8,98 $\pm$ 2,01	10,73 $\pm$ 0,43
RH atividade total	14,57 $\pm$ 2,01	15,34 $\pm$ 1,31
CB Endog	5,06 $\pm$ 1,70	6,61 $\pm$ 0,06
CB Ativada	4,59 $\pm$ 0,54	8,75 $\pm$ 0,83
CB atividade total	9,65 $\pm$ 1,16	15,36 $\pm$ 1,32
CH Endog	10,57 $\pm$ 1,35	4,00 $\pm$ 0,05
CH Ativada	1,78 $\pm$ 0,60	11,46 $\pm$ 0,83
CH atividade total	12,35 $\pm$ 0,93	15,46 $\pm$ 1,32

* RB – Raiz bovina; RH – raiz humana; CB – coroa bovina; CH – coroa humana

“Endog” indica atividade endógena das enzimas. “Ativada” indica as pró enzimas que foram ativadas pelo APMA. Atividade total é a adição das duas condições previamente mencionadas.

5.2 Subprojeto 2

Foi encontrada diferença significativa entre as condições ($F=4,50$, $p=0,021$) e entre os tratamentos ($F=65,45$, $p<0,0001$). A interação entre esses fatores não foi significativa ($F=0,71$, $p=0,500$). A **Tabela 4** mostra que o chá verde reduziu significativamente o desgaste da dentina para todas as condições ($p<0,01$). Para ambos os tratamentos, o desgaste foi significativamente maior quando foi realizada abrasão imediatamente depois da erosão quando comparado à erosão sozinha. Somente quando o bochecho foi realizado com água (controle), seguido de abrasão é que houve um maior desgaste, quando comparado à condição de erosão sozinha ($p<0,05$). Nenhuma diferença significativa no desgaste foi observada quando as condições ERO+ABR-I e ERO+ABR-30-min foram comparadas, para ambos os tratamentos.

Tabela 4 - Desgaste (μm) das amostras de dentina submetidas à erosão ou erosão + abrasão (imediate ou depois de 30 min) tratadas com chá verde ou água. Média $\pm$ DP (IC 95%).

Tratamento	Condições			TOTAL
	Erosão	Erosão + abrasão imediata	Erosão + abrasão 30 min	
Água^A (Controle)	0,98 $\pm$ 0,13 ^a	1,23 $\pm$ 0,35 ^b	1,22 $\pm$ 0,23 ^b	1,14$\pm$0,52
Chá verde^B	0,59 $\pm$ 0,18 ^a	0,90 $\pm$ 0,32 ^b	0,74 $\pm$ 0,23 ^{ab}	0,74$\pm$0,52
TOTAL	0,79$\pm$0,50	1,06$\pm$0,60	0,98$\pm$0,58	

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos. Para cada linha, letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as condições (ANOVA a 2 critérios, $p<0,05$).

5.3 Subprojeto 3

A incubação em tampão contendo diferentes concentrações de FeSO_4 causou uma diminuição das atividades das gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9) de ambas as formas (pró e ativa) das MMP-2 e -9. O tampão contendo FeSO_4 a 1,5 mmol/L inibiu completamente a atividade, tanto da MMP-2 ($\text{IC}_{50}=0,75$ mmol/L), quanto da MMP-9 ($\text{IC}_{50}=0,50$ mmol/L), como mostrado nas **Figuras 60 e 61**.

A completa inibição pela 1,10 fenantrolina a 3 mmol/L nos géis de zimografia confirmou a natureza das atividades gelatinolíticas como sendo de MMP (dados não mostrados).

Figura 60 - Efeito do FeSO_4 sobre a atividade gelatinolítica das enzimas. Coluna 1 – MWM, padrão de peso molecular; Colunas 2 e 3 – Controle de MMPs recombinantes humanas de MMP-2 e MMP-9, respectivamente; Colunas 4 a 15: tiras do gel incubados em tampão contendo FeSO_4 a 0,05, 0,25, 0,50, 0,75, 1,0 e 1,5 mmol/L, respectivamente. Depois da incubação com FeSO_4 , a atividade de degradação da gelatina das formas pró e ativa de MMP-2 e -9 diminuiu significativamente, de maneira concentração-dependente. (Colunas 4 a 15).

Figura 61 - Dose-resposta de inibição das formas pró e ativa das MMPs -2 e -9 pela incubação em tampão contendo sulfato ferroso, como observado na zimografia. A escala representa a média ($\pm$ DP) da porcentagem de inibição quando comparados aos respectivos controles não tratados, mensurados como bandas eletroforéticas dos géis escaneados ($n=3$). As concentrações de FeSO_4 no tampão são mostradas abaixo de cada coluna.

Os resultados da análise perfilométrica (μm , média $\pm$ SD) estão mostrados na **Figura 62**. A ANOVA de medidas repetidas detectou diferenças significativas entre os grupos ($F=262,99$, $p<0,0001$). O teste de Tukey revelou que o gel contendo NaF (controle) reduziu o desgaste em cerca de 50% ($0,79\pm 0,35 \mu\text{m}$) quando comparado ao gel placebo (controle negativo, $1,77\pm 0,35 \mu\text{m}$), sendo esta diferença significativa. Os géis contendo inibidores de MMP inibiram completamente o desgaste ($0,05\pm 0,02$, $0,04\pm 0,02$, $0,05\pm 0,02$ e $0,05\pm 0,02 \mu\text{m}$ para EGCG a 10 e 400

μM , clorexidina (CHX) e FeSO_4 , respectivamente) e foram significativamente diferentes tanto do gel contendo NaF quanto do gel controle (ANOVA de medidas repetidas e teste de Tukey, $p < 0,05$).

Figura 62 - Desgaste (μm) dos blocos de dentina submetidos à erosão e previamente tratadas com gel placebo, gel fluoretado ou géis contendo inibidores de metaloproteinases. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos. (ANOVA de medidas repetidas e teste de Tukey, $p < 0,05$). $n=10$ por grupo.

Para os géis contendo inibidores de MMP, não foi possível identificar claramente um interface entre as áreas controle e erodida quando analisados na MEV, devido à ausência de desgaste (**Figura 63b, c, d**). Essa interface é visível para os géis placebo e contendo NaF (**Figura 63a, e, f**). A observação da superfície das áreas erodidas (**Figura 64**) sugere que os inibidores de MMP poderiam também ter possivelmente um efeito físico, causando uma obstrução dos túbulos da superfície da dentina (**Figura 64d, e, f, g, h, i, j, k, l**), o que não foi detectado no grupo placebo (**Figura 64a, b, c**). O mesmo ocorreu para o grupo do FeSO_4 . No bloco placebo- erodidos (B), a maioria dos túbulos dentinários estão expostos. No entanto, os blocos tratados com os gel de FeSO_4 demonstra claramente obstrução dos túbulos, como pode ser observado em (F), bem como no grupo tratado com NaF (D) (**Figura 65**).

Figura 63 - Imagens representativas, obtidas por microscopia eletrônica de varredura MEV), da interface entre a superfície controle e erodida dos blocos de dentina dos diferentes grupos, em menor aumento (70x) dos grupos: (a) placebo (b) EGCG a 10µM (EGCG10); (c) EGCG a 400µM (EGCG400); (d) CHX; (e) NaF; e em maior aumento (4000x): (f) NaF. Para os géis contendo inibidores de MMP (painéis b, c, d), não foi possível identificar claramente a interface entre áreas controle e erodida. Essa interface é claramente visível para os grupos placebo e NaF (painéis a, f, seta).

Figura 64 - Imagens representativas, obtidas por microscopia eletrônica de varredura MEV), da superfície da dentina dos diferentes grupos dos blocos controle e erodidos em menor (2000x) e maior aumento (8000x): (a-b-c) placebo (d-e-f) EGCG10; (g-h-i) EGCG400; (j-k-l) CHX;; (m-n-o) NaF. Nos blocos placebo- erodidos (b-c), a maioria dos túbulos dentinários estão expostos. No entanto, os blocos tratados com os géis experimentais demonstraram claramente obstrução dos túbulos, como pode ser observado em (d-o), bem como no grupo tratado com NaF (n-o).

Figura 65 - Imagens representativas, obtidas por microscopia eletrônica de varredura MEV), da superfície da dentina dos diferentes grupos dos blocos controle e erodidos (aumento (2000x): (A, B) placebo, (C, D) NaF. No bloco placebo- erodidos (B), a maioria dos túbulos dentinários estão expostos. No entanto, os blocos tratados com os gel de FeSO₄ demonstra claramente obstrução dos túbulos, como pode ser observado em (F), bem como no grupo tratado com NaF (D).

5.4 Subprojeto 4

A ANOVA a três critérios detectou diferenças entre os tratamentos ($F=245,4$, $p<0,001$), bem como entre as condições ($F=12,8$, $p<0,01$) e tempos ($F=46,1$, $p<0,001$). A interação entre estes 3 critérios foi também significativa ($F=3,0$, $p<0,05$).

Independentemente das condições ou dos tempos, o mesmo perfil foi obtido para todos os tratamentos. Os géis contendo EGCG, CHX ou FeSO_4 levaram a um desgaste significativamente menor quando comparados aos géis NaF, placebo e também ao grupo sem tratamento. O gel contendo NaF levou a um desgaste significativamente menor quando comparado com o gel placebo e o grupo sem tratamento, os quais apresentaram valores de desgaste similares (**Tabela 5**).

Para a condição erosão isolada, o fator tempo não foi importante, isto é, para todos os tratamentos, o desgaste encontrado depois de 5 dias não foi significativamente diferente daquele encontrado depois de 10 dias de desafio erosivo. Para a condição erosão mais abrasão, o mesmo perfil foi obtido para os géis contendo EGCG, CHX ou FeSO_4 . Entretanto, o desgaste foi significativamente maior depois de 10 dias de desafio erosivo mais abrasivo para o gel contendo NaF, gel placebo e grupo sem tratamento (**Tabela 5**).

A associação entre os desafios erosivos e abrasivos não foi capaz de aumentar significativamente o desgaste para qualquer um dos tratamentos depois de 5 dias, quando comparado com a condição erosão sozinha. Após 10 dias, o mesmo perfil foi obtido para os géis contendo EGCG, CHX ou FeSO_4 e para o gel placebo. Entretanto, para o gel contendo NaF e grupo sem tratamento, o desgaste foi significativamente maior quando a erosão foi associada com a abrasão (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Média de desgaste ($\pm$ DP, μ m) de amostras de dentina previamente tratadas com géis contendo diferentes inibidores de MMP e submetidas à erosão ou erosão mais abrasão após 5 ou 10 dias num protocolo *in situ/ex vivo*.

Tratamentos	Erosão 5 dias	Erosão 10 dias	Erosão + abrasão 5 dias	Erosão + abrasão 10 dias
EGCG a 400 μM	0,42 $\pm$ 0,09 ^a	0,66 $\pm$ 0,16 ^{abc}	0,68 $\pm$ 0,19 ^{abc}	0,71 $\pm$ 0,20 ^{bc}
CHX a 0,012%	0,45 $\pm$ 0,13 ^{ab}	0,63 $\pm$ 0,17 ^{abc}	0,63 $\pm$ 0,17 ^{abc}	0,76 $\pm$ 0,17 ^c
FeSO₄ a 1 mM	0,58 $\pm$ 0,10 ^{abc}	0,69 $\pm$ 0,16 ^{abc}	0,67 $\pm$ 0,19 ^{abc}	0,75 $\pm$ 0,14 ^c
NaF a 1,23%	1,27 $\pm$ 0,19 ^d	1,38 $\pm$ 0,20 ^d	1,37 $\pm$ 0,30 ^d	1,69 $\pm$ 0,40 ^e
Placebo	1,79 $\pm$ 0,24 ^e	1,87 $\pm$ 0,25 ^{ef}	1,83 $\pm$ 0,25 ^e	2,15 $\pm$ 0,60 ^{tg}
Sem tratamento	1,72 $\pm$ 0,22 ^e	1,84 $\pm$ 0,23 ^e	1,87 $\pm$ 0,16 ^{ef}	2,18 $\pm$ 0,60 ^g

Letras distintas indicam diferenças significativas (ANOVA a 3 critérios, $p < 0,05$). n=13.

5.5 Subprojeto 5

Houve uma concentração média de hidroxiprolina significativamente menor ($\pm$ DP, $\mu\text{g/mL}$, $n=5$) na saliva artificial derivada do tratamento com os géis contendo EGCG ($0,33\pm0,05^a$), CHX ($0,32\pm0,10^a$) e FeSO_4 ($0,34\pm0,06^a$) quando comparados com o gel de NaF ($0,56\pm0,02^b$), gel placebo ($0,96\pm0,02^c$) e grupo sem tratamento ($0,94\pm0,05^c$) (**Figura 66**). Similarmente, a média de perda de dentina superficial ($\pm$ DP, μm) foi significativamente reduzida para os géis contendo os inibidores de MMPs ($85,9\pm26,5^a$, $92,01\pm18,19^a$ e $85,9\pm23,6^a$ para o EGCG, CHX e FeSO_4 , respectivamente) quando comparados ao gel de NaF ($131,35\pm33,56^b$), gel placebo ($170,83\pm45,19^c$) ou grupo sem tratamento ($180,98\pm36,78^c$) (**Figura 67**). Foi observada uma correlação positiva significativa entre a concentração de hidroxiprolina e a perda de dentina ($r^2=0,63$, $p<0,0001$, **Figura 68**).

Figura 66 - Concentração de hidroxiprolina ($\mu\text{g/mL}$, média $\pm$ DP) liberada em saliva artificial por amostras de dentina desmineralizadas por ácido cítrico a 0,87 M, pH=2,3, durante 36 h e tratadas com géis contendo EGCG (400 μM), CHX (0,012%), NaF (1,23%), placebo (sem veículo ativo, controle negativo) ou não tratadas (ST), previamente à degradação por collagenase de *Clostridium histolyticum* (238,2 U/mL). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA e teste de Tukey's, $p<0,05$). "Pool" de 9 amostras analisadas em quintuplicata.

Figura 67 - Perda de dentina (μm, média ± DP) de amostras desmineralizadas por ácido cítrico a 0,87 M, pH=2,3, durante 36 h e tratadas com géis contendo EGCG (400 μM), CHX (0,012%), NaF (1,23%), placebo (sem veículo ativo, controle negativo) ou não tratadas (ST), e submetidas à degradação por collagenase de *Clostridium histolyticum* (200U/mL). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA e teste de Tukey's tests, $p<0,05$). $n=9$.

Figura 688 Desgaste médio dos blocos de dentina em função da concentração de hidroxiprolina liberada na saliva

A **Figura 69** mostra imagens de MEV com secagem no ponto crítico representativas de dentina tratada com géis de EGCG (400 μ M), clorexidina (0,012%), flúor (NaF a 1,23%), gel placebo (sem ingrediente ativo, controle negativo) ou não tratado (sem tratamento) previamente à desmineralização com ácido cítrico e degradação com collagenase bacteriana. Pode-se observar preservação das fibrilas colágenas nos grupos tratados com géis contendo inibidores de MMPs (**Figuras 69d, 69e, 69f, 70d, 70e, 70f**). O mesmo não foi observado para o grupo que recebeu tratamento com gel placebo (**Figuras 69b e 70b**) ou que não foi tratado (**Figuras 69 e 70a**), enquanto que uma preservação parcial das fibrilas foi vista no grupo tratado com gel de NaF (**Figuras 69c e 70c**).

Figura 699 - MEVs representativas de dentina desmineralizada (**a**- sem tratamento) ou **b**- tratada com gel placebo (sem veículo ativo, controle negativo) ou contendo como princípio ativo o **c**- flúor (NaF a 1,23%), **d**- EGCG (400 μM), **e**- clorexidina (0,012%) ou **f**- sulfato ferroso (FeSO₄), antes da submissão à colagenase bacteriana. Aumento 7000x.

Figura 7070 - MEVs representativas de dentina desmineralizada em área de trinca natural formada durante processo de secagem em ponto crítico. **a-** sem tratamento, **b-** tratada com gel placebo (sem veículo ativo, controle negativo) ou contendo como princípio ativo o **c-** flúor (NaF a 1,23%), **d-** EGCG (400 µM), **e-** clorexidina (0,012%) ou **f-** sulfato ferroso (FeSO₄), antes da submissão à colagenase bacteriana. Aumento 7000x.

Discussão

A sabedoria é saber o que se deve fazer; a virtude é fazê-lo.
(David Starr Jordan)

6 DISCUSSÃO

As MMP-2, -3, -8 e -9 tinham sido detectadas em dentina de coroa humana (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; MAZZONI et al., 2007; SULKALA et al., 2007; MAZZONI et al., 2009; MAZZONI et al., 2011) e em dentina de raiz humana (SANTOS et al., 2009). Embora a presença de MMPs na dentina coronária e radicular humana tenha sido confirmada, nenhum desses estudos havia estabelecido o perfil de atividade destas enzimas, bem como, não havia registro anterior de determinação destas enzimas em dentina coronária e radicular bovina.

No **Subprojeto 1** foi investigada a presença de MMP-2 e -9 na dentina coronária e radicular de dentes bovinos, bem como, o perfil de atividade destas enzimas, em dentinas humana e bovina. Como pode ser observado, as atividades das MMP-2 e -9 foram similares quando comparadas a dentina da coroa bovina (CB) com a da coroa humana (CH), bem como a da raiz bovina (RB) com a da raiz humana (RH), mostrando que existe a presença tanto da forma pró-enzima quanto da forma ativa.

Embora a MMP-8 tenha sido descrita como a maior collagenase na dentina humana, ela parece estar primariamente envolvida na organização da matriz orgânica da dentina antes da mineralização e outras gelatinases ficariam incorporadas ou vinculadas com mais eficiência à matriz da dentina (SULKALA et al., 2007). Por essa razão, somente as MMPs -2 e -9 foram incluídas na presente investigação. Os resultados do presente estudo corroboram com achados prévios e fortemente indicam que as gelatinases embebidas na matriz da dentina podem estar parcialmente na forma ativa. A ativação parcial, por exemplo, pelas cisteinil-catepsinas da dentina (TERSARIOL et al., 2010) durante o processo de extração não poderia ser totalmente descartada. No entanto, como as extrações proteicas foram realizadas utilizando coquetel contendo inibidores de protease como o inibidor E-64 da cisteinil-catepsina, um inibidor efetivo de cisteína proteases, a ativação das gelatinases durante a extração é pouco provável. Uma vez que as MMPs estariam incorporadas à dentina mineralizada anos antes da extração, a presença de gelatinases ativas na dentina mineralizada enfatiza a grande estabilidade destas enzimas quando incorporadas em dentina mineralizada. Isso é suportado pela

habilidade demonstrada previamente das gelatinases dentinárias em suportar o calor excessivo sem perda de atividade (SULKALA et al., 2007).

Apesar das evidências substanciais sobre a relação potencial entre MMPs derivadas do hospedeiro e a progressão da cárie (TJÄDERHANE et al., 1998), algumas das questões fundamentais sobre as MMPs dentinárias, tais como a sua localização e sua associação com a matriz de colágeno, não são ainda totalmente compreendidas. Tem sido demonstrado através de imunohistoquímica que a MMP-2 está concentrada na pré-dentina e na área interna da dentina adjacente à pré-dentina (BOUSHELL et al., 2008). Isto é consistente com a hipótese de que a MMP-2 está ativamente envolvida na organização da formação da matriz pré mineralizada, bem como a sua posterior mineralização e regulação da formação da dentina peritubular (BOUSHELL et al., 2008). No entanto, as MMPs -2 e -9 são componentes intrínsecos da rede fibrilar da matriz orgânica de dentina humana (MAZZONI et al., 2009), reforçando assim, a hipótese de que essas enzimas podem desempenhar um papel importante na degradação da matriz orgânica em lesões de cárie em dentina (TJÄDERHANE et al., 1998; SULKALA et al., 2002), durante a erosão (KATO et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2009a; KATO et al., 2010a; KATO et al., 2010b) e na degradação da camada híbrida de compostos adesivos (PASHLEY et al., 2004; TAY; PASHLEY, 2004; CARRILHO et al., 2005; HEBLING et al., 2005; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b)..

A análise de proteínas em substratos mineralizados somente é possível utilizando-se protocolos de extração para libertá-las do tecido. Os procedimentos de extração envolvendo desmineralização com ácido cítrico (MAZZONI et al., 2007) são menos trabalhosos e permitem maior recuperação de proteína. Enquanto este protocolo promove a extração de todas as proteínas ao mesmo tempo, permite apenas a análise de enzimas que no final do processo de extração mantiveram-se ligadas à matriz extracelular de dentina. O protocolo utilizando HCl/EDTA em pH neutro (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000), por outro lado, permite a determinação de gelatinases na fração proteica vagamente ligada/não acoplada e extração sequencial em diferentes etapas, incluindo as proteínas extraídas antes e durante a desmineralização (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; SULKALA et al., 2007; SANTOS et al., 2009). Quando são realizados esses processos distintos para expor e extrair as enzimas de dentina mineralizada não se podem fazer

comparações diretas entre o desempenho dos mesmos. A investigação da atividade de MMPs salivares humanas tem demonstrado que a exposição das MMPs -2 e -9 em baixo pH (entre 2,3 e 4,5) seguida pela neutralização (isto é, uma sequência que tipicamente ocorre no biofilme dentário depois da ingestão de açúcar) causa um aumento de quatro vezes na atividade gelatinolítica dessas enzimas (TJÄDERHANE et al., 1998). Adicionalmente, depois da ativação ácida, foi observado na análise zimográfica uma mudança gradual com relação tempo-dependência da MMP-9 de 92 kDa para uma forma de menor peso molecular (82 kDa) (TJÄDERHANE et al., 1998), a qual corresponde funcionalmente à forma ativa da MMP-9 (OGATA et al., 1992). Portanto, parece ser razoável considerar que um protocolo ácido poderia melhorar as condições das MMPs em exibir seu potencial gelatinolítico.

Para a MMP-2, a atividade na coroa e raiz dentinária humana foi em torno de 30% maior que o seu correspondente em dentina bovina. Para a MMP-9, entretanto, o total de atividade foi similar para todos os substratos testados. Esses achados indicam que os substratos de ambas as origens podem ser utilizados em experimentos onde a atividade de MMP-2 e MMP-9 é, por qualquer razão, investigada, como em protocolos envolvendo erosão (KATO et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2009a; KATO et al., 2010a; KATO et al., 2010b), cárie (SULKALA et al., 2001; CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006) e restaurações adesivas (CARRILHO et al., 2005; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b).

Este trabalho é de fundamental importância, já que foi o primeiro a conseguir a quantificação e fazer a comparação da atividade dessas enzimas nas dentinas humana e bovina. A análise comparativa entre dentina humana e bovina confirmou que a dentina bovina é similar à dentina humana em relação ao perfil de MMP-2 e -9. Desde que a dentina bovina é amplamente utilizada em estudos de erosão, cárie e sistemas adesivos, e levando-se em consideração o papel e função das gelatinases nas condições acima mencionadas, os resultados obtidos justificam a utilização de dentina bovina nos experimentos subsequentes.

Num segundo estudo, foi testado o efeito do chá verde no desgaste da dentina ocasionado por processos erosivos e abrasivos (**Subprojeto 2**). O chá verde reduziu significativamente o desgaste da dentina sob condições de erosão e abrasão. Apesar de termos usado um perfilômetro de contato, que pode em alguma extensão penetrar no material orgânico e fornecer valores de desgaste mais altos

que aqueles que seriam esperados com um perfilômetro óptico (GANSS et al., 2007), a quantidade de desgaste obtido (0,98 μm depois de 100 min de desafio erosivo) no presente estudo foi menor quando comparado a estudos prévios de nosso grupo (3,6 μm de perda depois de 28 min de erosão) (MAGALHÃES et al., 2008). Isso pode ser explicado pela diferença de sensibilidade do equipamento e do software utilizados em ambos estudos.

O efeito protetor do chá verde não poderia ser atribuído ao seu conteúdo de flúor, já que este teor foi similar àquele do controle negativo (água do abastecimento público, dados não mostrados). Na verdade, em adição à ausência de efeitos colaterais indesejáveis nas condições adotadas no presente estudo, o chá verde foi escolhido por conta dos seus efeitos já reportados na inibição das MMPs (DEMEULE et al., 2000; GARBISA et al., 2001), o que poderia ser esperado reduzir a progressão do desgaste da dentina.

O modelo *in situ* usado neste estudo seguiu a formação da película adquirida salivar, a qual poderia exercer um importante papel durante o desafio erosivo (HARA et al., 2006a). Considerando-se a possibilidade de que o chá verde poderia inibir a atividade das MMPs e em consequência permitir a manutenção de uma camada orgânica sobre a dentina erodida, este modelo permitiria que não só as MMPs da dentina, mas também as da saliva influenciassem no desgaste da dentina. É sabido que as MMPs oriundas da saliva poderiam estar envolvidas na destruição da matriz orgânica (TJÄDERHANE et al., 1998; VAN STRIJP, 2003) e que a MMP-8 presente na saliva poderia influenciar negativamente na remineralização e desmineralização da dentina (NORDBØ et al., 2003).

A erosão foi produzida pela Coca-Cola® por ser uma das bebidas mais amplamente consumidas e por exibir potencial erosivo (RIOS et al., 2006b; MAGALHÃES et al., 2007). A erosão foi provocada pela imersão extraoral na bebida por 5 min com a intenção de produzir a desmineralização. É também provável que o baixo pH da bebida tenha induzido a ativação de MMPs derivadas da dentina e da saliva, quando os voluntários ingeriram um gole da bebida. Entretanto, acredita-se que as MMPs não tenham capacidade de degradar a matriz orgânica da dentina em pH ácido (TJÄDERHANE et al., 1998). No nosso protocolo, o intervalo entre cada desafio erosivo (> 2 h) permitiria a remineralização e também uma neutralização do pH (TJÄDERHANE et al., 1998), o que é essencial para aumentar a atividade de degradação da matriz orgânica pelas MMPs.

O desgaste dentário é uma condição multifatorial causada por processos químicos (erosão) e mecânicos (abrasão e atrição), já que a camada amolecida pelo desafio erosivo é mais susceptível às forças mecânicas, como a abrasão (JAEGGI; LUSSI, 1999; ATTIN et al., 2004; RIOS et al., 2006a). Então, estudos que consideram o desgaste dentário devem considerar ambas as condições (química e mecânica), a fim de simular uma situação clínica. Esse aspecto é especialmente importante na dentina erodida, na qual a matriz orgânica exposta atua como camada protetora contra a desmineralização e a escovação excessiva poderia remover essa matriz protetora. Entretanto, um trabalho recente sugeriu que a camada orgânica desmineralizada desenvolvida depois de desafios erosivos não foi afetada pela escovação (GANSS et al., 2007). Para simular as condições de abrasão, as quais poderiam ocorrer durante a higiene oral, abrasão pela escovação de cada espécime foi realizada por 30 s em cada ciclo. Em relação ao desgaste abrasivo da dentina erodida, os presentes achados confirmam estudos prévios que mostraram que a abrasão subsequente a um desafio erosivo pode aumentar o desgaste de superfícies amolecidas por ácidos (ATTIN et al., 1998; PONDURI et al., 2005). Entretanto, a espera de 30 min para a abrasão não foi capaz de reduzir o desgaste da dentina quando comparado à escovação imediatamente após a erosão, o que também foi demonstrado em estudos prévios (HARA et al., 2003; ATTIN et al., 2004). Portanto, na situação clínica, a espera de 30 min para a escovação após um desafio erosivo pode não ser efetiva para reduzir o desgaste da dentina.

Em relação ao tratamento, o bochecho com chá verde reduziu significativamente o desgaste da dentina provocado pela erosão e erosão associada à abrasão tardia, em aproximadamente 40%. O chá verde também reduziu significativamente o desgaste da dentina na condição erosão + abrasão imediata, mas em menor extensão (~27% de redução). Pode-se especular que a escovação imediatamente depois da erosão não forneceria tempo suficiente ao chá verde para influenciar a inibição das MMPs. Portanto, mesmo quando a postergação da escovação não é importante para reduzir o desgaste da dentina por si só, pode ser relevante para a ação inibitória do chá verde sobre as MMPs. Trinta minutos de espera poderia ser tempo suficiente para o chá verde agir inibindo as MMPs, o que poderia explicar os valores similares de desgaste quando comparados à erosão sozinha.

Entretanto, deve ser considerado que o protocolo adotado no presente estudo não permite a conclusão que o efeito do chá verde na redução do desgaste da dentina foi devido ao seu efeito inibitório da atividade das MMPs, já que isso não foi testado diretamente. Estudos adicionais focando na determinação da atividade das MMPs na camada orgânica sobre a dentina erodida depois de desafio erosivo poderiam resolver este problema. A verificação do material orgânico na superfície da dentina por microscopia eletrônica de varredura poderia trazer informações adicionais. Se for confirmado que o chá verde realmente inibe as MMPs dentinárias, reduzindo a progressão da erosão, seria importante determinar qual o principal princípio ativo responsável por isso. Os polifenóis do chá verde, em especial o epigallocatechin-3-gallate (EGCG), têm sido relatados como potentes inibidores das MMPs em testes de cultivo celular (DEMEULE et al., 2000; GARBISA et al., 2001). O EGCG parece exibir uma ligação por pontes de hidrogênio e interação hidrofóbica com as collagenases, o que seria responsável por alteração na estrutura secundária das mesmas e consequentemente inibição (MADHAN et al., 2007). Então, em adição à utilização do chá verde, pode ser especulado que esses polifenóis poderiam ser incorporados em produtos tópicos de uso diário, como dentifrícios e soluções para bochechos, visando à prevenção do desgaste dentário, o que foi em parte testado em estudo subsequente. Neste, testou-se se a utilização de uma solução contendo o princípio ativo do chá verde na inibição das MMPs, bem como de um outro reconhecido inibidor de MMPs (clorexidina) poderia ter um efeito maior na redução da erosão dentinária que o chá verde puro. Foi conduzido outro estudo *in situ*, cujos resultados demonstraram que ambas as soluções, clorexidina e extrato de chá verde reduziram a erosão da dentina sob condições clínicas e foram tão efetivas quanto a solução convencional de 250 ppm de flúor (MAGALHÃES et al., 2009a). Embora a degradação de colágeno pelas MMPs também não tenha podido ser mensurada diretamente por esse protocolo, os resultados reforçaram que a inibição das MMPs pela clorexidina e solução de extrato de chá verde poderia ser um possível mecanismo de ação, levando à redução da perda dentinária. Tanto a clorexidina quanto o extrato de chá verde foram administrados em uma dose excedente à dose inibitória reportada para MMP-2, -8 e -9 (GENDRON et al., 1999; DEMEULE et al., 2000). Assim, a clorexidina foi aplicada na forma comercial disponível para bochecho, enquanto que a solução de extrato de chá verde foi utilizada numa concentração que objetivou simular o conteúdo de EGCG

normalmente encontrado no chá verde (KATO et al., 2009). Diferentes estudos mostram que a quantidade de catequina nas soluções de chá verde (1 g de erva/100 mL de água), varia de 20-130 mg (LIN et al., 2003; LEE et al., 2004).

As doses inibitórias de diferentes polifenóis do chá verde sobre MMPs já foram testadas. Dessa forma, a CI_{50} para a MMP-2 foi de 6 μ M (EGCG) e 95 μ M (EGC), e para a MMP-9 foi 0,8 μ M (EGCG) e 28 μ M (EGC) (DEMEULE et al., 2000). A clorexidina produziu uma completa inibição das MMP-2 e -9 nas concentrações de 0,03% e de 0,02-0,01% para a MMP-8 (GENDRON et al., 1999).

Por outro lado, vale a pena mencionar que no estudo de Magalhães et al. (2009a), as soluções foram aplicadas em doses excluindo efeitos colaterais. A administração dietética de preparo de EGCG em alta concentração (90%) para ratos durante 13 semanas não foi tóxica para doses até 500 mg/kg/dia (ISBRUCKER et al., 2006). Em indivíduos saudáveis, polifenóis do chá verde em quantidades equivalentes ao conteúdo de EGCG em 8-16 copos de chá verde/dia por um período de tempo de 4 semanas induziram apenas efeitos colaterais transitórios, sendo considerados seguros (CHOW et al., 2003).

A DL_{50} para administração oral de clorexidina em ratos foi de 1800 mg/kg de peso corporal (FOULKES, 1973). Em adição, aplicações diárias de clorexidina a 2% por até 12 semanas não induziram mudanças histológicas ou enzimáticas em mucosa oral de hamsters (LINDHE et al., 1970). Além de alguns efeitos colaterais reversíveis (descoloração, irritação da mucosa, distúrbios no paladar), a clorexidina na higiene bucal é considerada segura (FOULKES, 1973).

O efeito inibitório da clorexidina sobre as MMPs (endopeptidases zinco-ativadas e cálcio-dependentes) é atribuído a um mecanismo de quelação, já que a inibição de MMP-2 e MMP-9 poderia ser prevenida pela adição de cloreto de cálcio, ligando-se à clorexidina. Foi também discutido que a clorexidina poderia afetar o grupo sulfidril e/ou cisteína presente no sítio ativo das MMPs (GENDRON et al., 1999). Nas concentrações salivares acima de 0,2%, a ação inibitória da clorexidina poderia estar também relacionada à desnaturação da proteína (HJELJORD et al., 1973).

Diferentes mecanismos também são discutidos para a eficácia inibitória dos polifenóis do chá verde, especialmente do EGCG, sobre a expressão e a atividade das MMPs. Pela ligação ao hidrogênio e pelas interações hidrofóbicas com a colagenase, o EGCG poderia levar a mudanças conformacionais ou ao

mascamamento da região catalítica da MMP-2 (CHENG et al., 2003; MADHAN et al., 2007). O EGCG também poderia inibir a ativação da MMP-8 (BAE et al., 2008), além de ter sido relatado que afeta a remineralização de dentina artificialmente desmineralizada (NORDBØ et al., 2003).

A clorexidina e a solução de extrato de chá verde utilizadas como bochecho foram tão efetivas quanto a solução de 250 ppm F (MAGALHÃES et al., 2009a), cuja eficácia para reduzir desmineralização de dentina erodida foi demonstrada previamente (SCHLUETER et al., 2007; WIEGAND et al., 2007). Entretanto, a eficácia do flúor para inibir a erosão da dentina parece ser altamente dependente da matriz orgânica. Ganss et al. (2004) retaram que a camada de matriz orgânica de dentina desmineralizada exibe uma capacidade tampão que poderia prevenir desmineralização em áreas de dentina mais profunda na presença de alta quantidade de flúor. Portanto, seria interessante avaliar o efeito combinado do flúor e inibidores de MMP na desmineralização da dentina em estudos futuros, já que tem sido mostrado que o flúor poderia alterar a atividade da MMP-20 no esmalte (DENBESTEN et al., 2002).

Para simular as condições clínicas, as amostras foram escovadas duas vezes diariamente depois do tratamento erosivo. É sabido que a dentina erodida exibe uma alta susceptibilidade à abrasão *in situ* (ATTIN et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2008), o que foi também confirmado no presente estudo. Entretanto, a matriz orgânica da dentina não somente impede a difusão iônica durante a desmineralização, mas poderia também reduzir o estresse mecânico na dentina desmineralizada. Além disso, foi mostrado que uma camada de dentina orgânica desmineralizada erosivamente com espessura de cerca de 50 µm não poderia ser removida pela escovação (GANSS et al., 2007). Então, poderia ser especulado que a inibição das MMPs afeta indiretamente também a abrasão da dentina erodida pela redução da degradação da dentina.

Pensou-se em testar ainda um terceiro componente na inibição das metaloproteinases da matriz, ou seja, o íon metálico ferro, já que tem sido demonstrado que bochecho com solução de 10 mmol/L de sulfato ferroso (FeSO₄) depois de um desafio erosivo pode reduzir significativamente a dureza do esmalte e o desgaste de dentina (SALES-PERES et al., 2007). Adicionalmente, a suplementação da Coca-Cola® com 10 mmol/L de FeSO₄ pode reduzir

significativamente a dissolução de esmalte dentário bovino *in vitro* (KATO et al., 2007a; KATO et al., 2007b).

No esmalte, o efeito protetor do ferro contra a erosão tem sido atribuído à formação de uma superfície ácido-resistente, a qual estaria sendo estabelecida pela precipitação de fosfatos férricos sobre a superfície do esmalte (TORELL, 1988). O efeito benéfico do ferro sobre a dentina parece ser mais complexo. A influência significativa da camada de colágeno sobre o desgaste da dentina poderia estar associada com o efeito inerente das metaloproteinases da matriz (MMPs), presentes na dentina (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; SULKALA et al., 2007) e saliva (INGMAN et al., 1994).

As MMPs são conhecidas por serem inibidas pelo zinco e outros metais bivalentes (SOUZA et al., 2000) e por alguns íons presente na liga de amálgama utilizada em restaurações odontológicas (SOUZA et al., 2001). Esse mesmo raciocínio poderia ser utilizado para o FeSO_4 . Embora o FeSO_4 demonstrou exercer um efeito protetor sobre esmalte e dentina humana (SALES-PERES et al., 2007) e sobre esmalte bovino (KATO et al., 2007a; KATO et al., 2007b) submetidos a desafios erosivos, seu efeito sobre a atividade das MMPs nunca tinha sido testado. Foi hipotetizado então que a incubação de MMPs com tampão contendo FeSO_4 levaria à inibição das mesmas, o que de fato ocorreu.

O mecanismo de inativação da enzima pelos metais ainda não está completamente entendido. Aceita-se que os íons metálicos podem se ligar aos sítios específicos, causando mudança conformacional que inativa a função catalítica das enzimas. Uma vez que a enzima esteja na forma desnaturada, sendo incubada com tampão contendo FeSO_4 poderia haver troca com os íons Ca^{+2} e Zn^{+2} presentes na estrutura da MMP (MMP-2 possui dois íons Ca^{2+} e Zn^{2+} e a MMP-9 possui três íons Ca^{+2} e dois íons Zn^{+2}) (MASKOS, 2005). Esses íons são mais reativos que o Fe^{+2} do tampão com FeSO_4 . Portanto, a enzima poderia ter sua estrutura alterada devido à ausência dos íons Ca^{+2} e Zn^{+2} (reação: $\text{FeSO}_4 + \text{Ca}^{+2}$ e/ou $\text{Zn}^{+2} = \text{CaSO}_4$ e/ou $\text{ZnSO}_4 + \text{Fe}$). Foi demonstrado que solução de ZnSO_4 poderia inibir MMPs (principalmente MMP-2) (SOUZA et al., 2000). Neste mesmo estudo, foi também demonstrado que CuSO_4 e HgSO_4 causaram menores inibições, uma vez que esses compostos são constituídos pelos metais (Cu e Hg ligados ao SO_4), os quais são menos reativos que o Ca^{+2} . As atividades das MMP-2 e MMP-9 foram completamente inibidas pelo ZnSO_4 a 3 mM (SOUZA et al., 2000) e também pelos

íons metálicos presentes em restaurações de amálgama (SOUZA et al., 2001). A série de reatividade desses metais determina a reatividade dos metais do mais para o menos reativo. Os metais que são mais reativos que o hidrogênio (K, Na, Ca, Mg, Al, Zn, Fe, Sn e Pb) podem substituí-lo em água ou ácidos diluídos. Os metais que são menos reativos que o hidrogênio (Cu, Hg, Ag) não o substituem.

No presente estudo, conforme demonstrado no **Subprojeto 3**, ocorreu inibição da atividades das MMPs -2 e -9 em baixas concentrações de FeSO_4 . Com 1,5 mmol/L, as atividades das MMPs -2 e -9 foi completamente inibida. Por esse motivo, decidiu-se testar o efeito do gel de aplicação tópica contendo 1 mmol/L de FeSO_4 sobre a redução do desgaste da dentina. O bochecho com solução de ferro demonstrado previamente, demonstrou reduzir a erosão de dentina *in situ* (SALES-PERES et al., 2007), mas o mecanismo de ação do ferro não foi avaliado. Adicionalmente, o bochecho com alta concentração de ferro (FeSO_4 10 mmol/L) realizado repetidamente após cada desafio erosivo, provocou pigmentação dos blocos de dentina e também dos dentes dos voluntários. Esse manchamento não foi observado no presente estudo, uma vez que a concentração do FeSO_4 foi relativamente baixa (1 mmol/L) e o gel foi aplicado apenas uma vez. Além disso, uma única aplicação do gel contendo ferro foi capaz de inibir completamente o desgaste dos blocos de dentina submetidos a alto desafio erosivo. Nos estudos prévios (**Subprojeto 2** e MAGALHÃES et al., 2009a), testando-se outros inibidores de MMP (clorexidina e chá verde) utilizados na forma de soluções para bochecho foi observado um efeito protetor contra a erosão da dentina (KATO et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2009a), mas a redução no desgaste foi ao redor de 40-50% somente. A potente inibição do desgaste observado no presente subprojeto deve estar relacionada ao veículo de escolha para aplicação FeSO_4 , EGCG e CHX sobre a dentina. O uso dos géis levou a um aumento no tempo de contato com a dentina, o que possivelmente poderia ter promovido mais efetividade e maior duração do efeito inibitório dos agentes ativos sobre as MMPs. Entretanto, não se pode excluir a possibilidade de uma mistura do mecanismo de ação do gel contendo FeSO_4 (**Figura 65**). A aplicação por 1 min poderia ter levado à formação de um depósito na superfície (provavelmente fosfato férrico, o qual poderia ter agido como uma barreira mecânica aos desafios erosivos subseqüentes. Também foi visível oclusão dos túbulos dentinários para o gel de flúor. Entretanto, a oclusão tubular não explica completamente a diferença no desgaste entre os géis de NaF e FeSO_4 , uma vez que

o efeito protetor do gel de FeSO_4 foi mais pronunciado quando comparado àquele observado para o gel de NaF (**Figura 65**). Esta diferença poderia ser explicada pela inibição das MMPs dentinárias ou salivares pelos íons Fe^{+2} durante os desafios erosivos subsequentes. Durante estes desafios erosivos, os íons Fe^{+2} liberados da camada protetora poderiam inibir as MMPs dentinárias, desta maneira evitando que estas enzimas hidrolisassem as fibrilas colágenas expostas pela ação do ácido do refrigerante (**Figura 71**). Tem sido relatado que a preservação desta camada de colágeno é capaz de reduzir a velocidade de progressão da erosão (KLONT; TEN CATE, 1991; GANSS et al., 2001; GANSS et al., 2004). A habilidade do FeSO_4 em inibir MMPs explicaria o maior potencial deste agente em reduzir as alterações erosivas na dentina, quando comparada ao esmalte (KATO et al., 2007b; SALES-PERES et al., 2007). Uma vez que o esmalte não contém matriz orgânica, a preservação da matriz dentinária pela inibição das MMPs é uma possível explicação para as diferenças observadas.

Figura 71 - Possível mecanismo do efeito do FeSO_4 sobre a erosão da dentina. Esquematização da dentina (**A**). Depois do desafio erosivo, a superfície da dentina está desmineralizada (**B**) causando a exposição das fibrilas de colágeno (**C**). Quando não estão protegidas pelo FeSO_4 , as fibrilas de colágeno ficam expostas à ação do ácido das bebidas e as fibrilas de colágeno são hidrolisadas (**C-D**). A aplicação do gel contendo ferro por 1 minuto pode ter levado à formação de depósitos sobre a superfície (provavelmente fosfato férrico) sobre a dentina, o qual pode ter agido como barreira mecânica aos desafios erosivos subsequentes (**B'**). Pela inibição das MMPs presente na dentina e/ou saliva pela ions de ferro durante os desafios erosivo subsequentes (**C'**), a camada protetora poderia ter prevenido que essas enzimas hidrolisassem as fibrilas de colágeno exposto pela ação do ácido das bebidas, preservando, então, a camada de colágeno (**D'**), o que resultou em diminuição significativa do desgaste erosivo. Círculos amarelos representam as MP's inativas e as estrelas azuis representam as MMP's ativadas.

A única aplicação de géis contendo outros inibidores de MMPs (EGCG e clorexidina) também protegeu contra a erosão da dentina (**Subprojeto 3**). No estudo *in situ*, derivado do **Subprojeto 2**, foi mostrado que o chá verde pôde reduzir o desgaste da dentina sobre desafios erosivos. Foi sugerido que este efeito poderia ser possivelmente ocasionado pela inibição de MMP pela presença de EGCG (~400 µM), um reconhecido inibidor de MMP (DEMEULE et al., 2000), no chá verde. Então, decidiu-se analisar o efeito do princípio ativo isolado do chá verde (EGCG) na prevenção da erosão da dentina. A clorexidina foi também incluída com um inibidor de MMP. O veículo escolhido para conter esses componentes foi um gel, com o objetivo de aumentar o tempo de contato com dentina, por causa da substantividade e também para tornar mais fácil a aplicação clínica, já que o chá verde foi utilizado quatro vezes por dia no estudo mencionado anteriormente, o que não seria prático do ponto de vista clínico (KATO et al., 2009). O flúor foi utilizado como agente comercialmente aceito no tratamento ou prevenção da erosão, pois, embora não exista um protocolo padrão que pudesse ser recomendado para a prevenção do desgaste erosivo em dentina, o flúor é um dos métodos mais estudados (SCHLUETER et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2008; WIEGAND et al., 2008). Desde que todos os géis testados possuíam essencialmente a mesma formulação, qualquer efeito preventivo na erosão poderia ser atribuída ao princípio ativo adicionado.

Os géis contendo inibidores de MMP mostraram claramente um desempenho superior quando comparados ao gel contendo flúor, com uma completa inibição da erosão da dentina, à semelhança do gel de FeSO₄. As imagens da microscopia eletrônica de varredura (**Figura 65**) confirmaram a ausência de desgaste nos grupos nos quais os géis contendo inibidores de MMP foram aplicados e adicionalmente, mostraram que houve deposição de partículas dentro dos túbulos, levando a uma completa obstrução dos mesmos, o que sugeriria também um efeito físico dos géis contendo os princípios ativos. É sabido que a clorexidina e polifenóis podem interagir com íons metálicos (GENDRON et al., 1999; GARBISA et al., 2001), o que poderia permitir a observação de partículas depositadas dentro dos túbulos por causa da ligação ao cálcio da apatita. Essa interação poderia ter influenciado o processo de des/remineralização na dentina, contribuindo então para a redução da progressão da erosão.

As doses de EGCG e clorexidina utilizadas no presente estudo são conhecidas por inibirem a atividade das MMPs. A habilidade da clorexidina em interferir na degradação de MMPs é dose-dependente. A concentração mínima que induz a completa inibição de MMP-9 é 0,002%, enquanto que para a MMP-2 é 0,0001% (GENDRON et al., 1999). Não obstante, poderia ser enfatizado que nesse experimento, a clorexidina foi diretamente incubada com MMPs por 30 min em temperatura ambiente. Então, seria esperado que a concentração necessária de clorexidina para a inibição de MMP da dentina em situações clínicas pudesse ser maior. Por essa razão, uma concentração intermediária de clorexidina foi utilizada neste estudo, que foi de 0,012%. Essa dose poderia ser prescrita para ser utilizada continuamente por pacientes com erosão, já que é cerca de 10 vezes menor que a aquela encontrada em soluções comerciais para bochecho (0,12%). Para o EGCG, a IC₅₀ para inibição de MMP-2 e MMP-9 é 6,0 e 0,8 µM, respectivamente (DEMEULE et al., 2000). Portanto, a dose mais baixa empregada no presente estudo (10 µM) foi suficiente para diminuir a atividade de ambas as gelatinases. Foi testada também uma dose mais alta (400 µM), que foi a concentração de EGCG encontrada no chá verde (KATO et al., 2009).

Os desafios erosivos foram realizados extraoralmente pela imersão em Coca-Cola® por 5 min. É provável que o pH baixo dessa bebida possa ter ativado as MMPs da dentina e da saliva quando os participantes ingeriram um gole da bebida. Entretanto, as MMPs não podem degradar matriz orgânica dentinária em pH ácido, já que são proteases funcionantes somente em pHs neutros. Os períodos alternados entre a desmineralização da dentina em pH abaixo de 5,5 e os períodos de pH neutro, devido à capacidade tampão da saliva, promovem a sequência de exposição da fibrilas da matriz orgânica da dentina primeiramente, seguida pela degradação pelas MMPs (TJÄDERHANE et al., 1998). Neste protocolo, o intervalo entre cada desafio erosivo (> 2 h), permitiria a remineralização e também a neutralização do pH, o que é essencial para a degradação da matriz orgânica pelas MMPs acontecer.

No **Subprojeto 3**, a aplicação única de géis contendo inibidores de MMPs foi capaz de prevenir completamente a erosão dentinária em situação de alto desafio erosivo (desafios por imersão dos dispositivos acrílicos contendo os blocos de dentina em Coca-Cola® por 5 min, 4 vezes ao dia, por 5 dias). Assim, observou-se a necessidade de se testar a longevidade do efeito da redução do desgaste. Outrossim, vislumbrou-se a importância de ser realizado um estudo empregando

também desafios abrasivos associados aos erosivos, na tentativa de se avaliar a performance dos géis nestas situações (**Subprojeto 4**).

Assim, foi testado o efeito de géis contendo inibidores de MMPs no desgaste por um tempo maior da dentina ocasionado por processos erosivos e abrasivos. Os resultados obtidos foram semelhantes àqueles descritos para o **Subprojeto 3**, quando o desafio foi erosivo somente e conduzido por 5 dias apenas, mostrando que a proteção conferida pelo tratamento pelos géis contendo inibidores de MMPs é duradoura e resiste também a desafios abrasivos. Convém ressaltar que enquanto no **Subprojeto 3**, os géis contendo inibidores de MMPs foram capazes de prevenir completamente a erosão dentinária, no **Subprojeto 4** foi observado um nível de desgaste maior. Isto pôde ser devido à utilização do perfilômetro recentemente adquirido através do presente projeto de pesquisa, que é bem mais sensível que o utilizado no **Subprojeto 3**. A resistência a desafios abrasivos já era esperada, uma vez que foi sugerido que a camada orgânica desmineralizada desenvolvida depois de desafios erosivos não é afetada pela escovação (GANSS et al., 2007). Para simular as condições de abrasão, as quais poderiam ocorrer durante a higiene oral, a abrasão pela escovação de cada espécime foi realizada por 15 s depois do primeiro e último desafios erosivos. Em relação ao desgaste abrasivo da dentina erodida, os presentes achados confirmam estudos prévios que mostraram que a abrasão subsequente a um desafio erosivo pode aumentar o desgaste de superfícies amolecidas por ácidos (ATTIN et al., 1998; PONDURI et al., 2005). Entretanto, para os géis contendo inibidores de MMPs, este aumento foi pequeno e não significativo para todos os tratamentos aos 5 dias, enquanto que aos 10 dias foi significativo apenas para o grupo não tratado em relação à condição desafio erosivo apenas.

Apesar das evidências de que tradicionais inibidores de MMPs, especialmente quando aplicados sobre um substrato dentinário na forma de gel, foram capazes de reduzir significativamente o desgaste dentinário e que esta redução foi duradoura e resistente a desafios abrasivos, os protocolos adotados nos estudos *in situ* (**Subprojetos 2, 3 e 4**) não permitiam a conclusão que o efeito dos géis era devido ao seu efeito de preservação da camada orgânica, já que isso não havia sido testado diretamente. Para se comprovar este conceito foi conduzido o **Subprojeto 5**. O protocolo consistiu em desmineralizar amostras de dentina, a fim de expor uma camada de matriz orgânica desmineralizada. Esta foi então tratada

com géis contendo os inibidores de MMPs antes de ser submetida à degradação por colagenase bacteriana. Caso os géis fossem capazes de inibir as MMPs dentinárias ou mesmo a colagenase bacteriana, a camada orgânica seria preservada da degradação, resultando em uma menor concentração de hidroxiprolina em solução, o que realmente foi observado. Mais que isto, foi observada uma correlação positiva significativa entre a concentração de hidroxiprolina em solução e a perda da camada superficial de dentina avaliada por perfilometria. Isto reforça que a inibição de MMPs, sejam elas de origem dentinária ou presentes em solução (saliva) ou ambas é capaz de reduzir o desgaste dentinário.

É interessante notar que os géis contendo flúor, nos **Subprojetos 4 e 5** apresentaram resultados intermediários em relação àqueles contendo inibidores de MMPs e os grupos que receberam gel placebo ou não foram tratados. Isto foi confirmado por diferentes variáveis de resposta (perfilometria, MEV e análise de hidroxiprolina). Assim, apesar de no momento não haver nenhum estudo mostrando que o flúor exerça alguma atividade inibitória sobre MMPs, é possível que isto aconteça. Nosso grupo está trabalhando com esta hipótese, avaliando o efeito de diferentes concentrações de flúor na inibição de MMPs -2 e -9 através de zimografia. Ganss et al. (2004) relataram que a camada de matriz orgânica de dentina desmineralizada exibe uma capacidade tampão que poderia prevenir desmineralização em áreas de dentina mais profunda na presença de alta quantidade de flúor (GANSS et al., 2004). Portanto, seria interessante avaliar o efeito combinado do flúor e inibidores de MMP na desmineralização da dentina em estudos futuros, já que tem sido mostrado que o flúor poderia alterar a atividade da MMP-20 no esmalte (DENBESTEN et al., 2002). Isto se torna particularmente interessante quando se especula que a camada de matriz orgânica desmineralizada preservada possa ser passível de remineralização, o que certamente seria facilitado pela ação do flúor.

Entretanto, é necessário ainda estabelecer protocolos clínicos de utilização dos produtos e para isto é necessário conduzir estudos clínicos randomizados. A avaliação clínica da erosão é um dos grandes entraves à realização de estudos clínicos. Recentemente nosso laboratório foi contemplado com o equipamento QLF (Quantitative Light-induced Fluorescence), que tem sido sugerido como uma ferramenta sensível para avaliação clínica da erosão dentária, de modo que estamos planejando estudos clínicos para um futuro próximo.

Outrossim, como mencionado acima, intentamos avaliar se o flúor também age como um inibidor de MMPs e se sua utilização conjunta com outros inibidores pode aumentar a proteção contra o desgaste dentinário, pela possibilidade de remineralizar a camada orgânica desmineralizada. A adição de flúor e inibidores de MMPs a veículos de uso diário, como dentifrício, também é bastante atrativa e está sendo investigada pelo nosso grupo.

Conclusões

Sorte é aquilo que acontece quando a preparação
encontra a oportunidade.
(Elmer Letterman)

7 CONCLUSÕES

Todas as hipóteses nulas testadas podem ser rejeitadas, uma vez que:

- 1) A dentina bovina pode ser utilizada como substituta de dentina humana em estudos envolvendo perfil de atividade de MMPs;
- 2) O bochecho com chá verde, depois do consumo de uma bebida ácida, é capaz de diminuir o seu efeito sobre a erosão e a erosão associada à abrasão imediata ou mediata da dentina bovina *in situ*;
- 3) O sulfato de ferro é um inibidor de MMPs;
- 4) O uso de diferentes inibidores de MMPs na forma de gel em uma única aplicação tópica antes do consumo de uma bebida ácida, é capaz de diminuir o seu efeito sobre a erosão de dentina bovina *in situ*;
- 5) O uso de diferentes inibidores de MMPs na forma de gel de uma única aplicação tópica antes do consumo de uma bebida ácida, é capaz de diminuir o seu efeito sobre a erosão associada ou não à abrasão de dentina bovina a longo prazo *in situ*;
- 6) Géis contendo inibidores de MMPs são capazes de preservar a matriz orgânica de dentina bovina submetida à erosão *in vitro*.

Portanto, pode-se concluir que a utilização de inibidores de MMPs, particularmente na forma de géis de aplicação tópica, tem grande potencial para ser aplicada na prática clínica odontológica, visando à prevenção da erosão dentinária, associada ou não à abrasão. Estudos clínicos randomizados são necessários para definir os protocolos de uso clínico.

Referências

Se conhecimento pode trazer problemas,
não é sendo ignorante que poderemos solucioná-los.
(Issac Assimov)

REFERÊNCIAS

- Asher C, Read MJ. Early enamel erosion in children associated with the excessive consumption of citric acid. *Br Dent J* 1987;162:384-387.
- 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;38:62-66.
- Attin T, Zirkel C, Hellwig E. Brushing abrasion of eroded dentin after application of sodium fluoride solutions. *Caries Res* 1998;32:344-350.
- Bae JY, Choi JS, Choi YJ, Shin SY, Kang SW, Han SJ, et al. Epigallocatechin gallate hampers collagen destruction and collagenase activation in ultraviolet-B-irradiated human dermal fibroblasts: involvement of mitogen-activated protein kinase. *Food Chem Toxicol* 2008;46:1298-1307.
- Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002;115:3719-3727.
- 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;83:909-913.
- Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:728-735.
- BoukpeSSI T, Menashi S, Camoin L, Tencate JM, Goldberg M, Chaussain-Miller C. The effect of stromelysin-1 (MMP-3) on non-collagenous extracellular matrix proteins of demineralized dentin and the adhesive properties of restorative resins. *Biomaterials* 2008;29:4367-4373.
- Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Bagnell R, Yamauchi M. Immunohistochemical localization of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin. *Arch Oral Biol* 2008;53:109-116.
- Bowen WH, Pearson SK. Residual effects of fluoride on a severe cariogenic challenge in rats. *Caries Res* 1994;28:246-250.

Brookes SJ, Robinson C, Shore RC, Kirkham J. Inhibitory effect of metal ions on acid demineralization. *Caries Res* 2004;38 (abstract 132):1.

Butler WT, Brunn JC, Qin C. Dentin extracellular matrix (ECM) proteins: comparison to bone ECM and contribution to dynamics of dentinogenesis. *Connect Tissue Res* 2003;44 Suppl 1:171-178.

Buzalaf MA, Hannas AR, Magalhães AC, Rios D, Honório HM, Delbem AC. pH-cycling models for in vitro evaluation of the efficacy of fluoridated dentifrices for caries control: strengths and limitations. *J Appl Oral Sci* 2010;18:316-334.

Buzalaf MA, Italiani FM, Kato MT, Martinhon CC, Magalhães AC. Effect of iron on inhibition of acid demineralisation of bovine dental enamel in vitro. *Arch Oral Biol* 2006;51:844-848.

Carrilho MR, Carvalho RM, Goes MF, Hipolito V, Geraldeli S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res* 2007a;86:90-94.

Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res* 2007b;86:529-533.

Carrilho MR, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L, Carvalho RM. Mechanical stability of resin-dentin bond components. *Dent Mater* 2005;21:232-241.

Caterina J, Shi J, Sun X, Qian Q, Yamada S, Liu Y, et al. Cloning, characterization, and expression analysis of mouse enamelysin. *J Dent Res* 2000;79:1697-1703.

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

Chen HP, Chang CH, Liu JK, Chuang SF, Yang JY. Effect of fluoride containing bleaching agents on enamel surface properties. *J Dent* 2008;36:718-725.

Cheng XW, Kuzuya M, Kanda S, Maeda K, Sasaki T, Wang QL, et al. Epigallocatechin-3-gallate binding to MMP-2 inhibits gelatinolytic activity without influencing the attachment to extracellular matrix proteins but enhances MMP-2 binding to TIMP-2. *Arch Biochem Biophys* 2003;415:126-132.

- Chow HH, Cai Y, Hakim IA, Crowell JA, Shahi F, Brooks CA, et al. Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res* 2003;9:3312-3319.
- Demeule M, Brossard M, Pagé M, Gingras D, Béliveau R. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochim Biophys Acta* 2000;1478:51-60.
- DenBesten PK, Yan Y, Featherstone JD, Hilton JF, Smith CE, Li W. Effects of fluoride on rat dental enamel matrix proteinases. *Arch Oral Biol* 2002;47:763-770.
- Devulapalle KS, Mooser G. Glucosyltransferase inactivation reduces dental caries. *J Dent Res* 2001;80:466-469.
- Dunning JC, Ma Y, Marquis RE. Anaerobic killing of oral streptococci by reduced, transition metal cations. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:27-33.
- Eccles JD, Jenkins WG. Dental erosion and diet. *J Dent* 1974;2:153-159.
- Embery G, Hall R, Waddington R, Septier D, Goldberg M. Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001;12:331-349.
- Foulkes DM. Some toxicological observations on chlorhexidine. *Journal of Periodontal Research* 1973;12:55-60.
- Ganss C, Klimek J, Schaffer U, Spall T. Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in vitro. *Caries Res* 2001;35:325-330.
- Ganss C, Klimek J, Starck C. Quantitative analysis of the impact of the organic matrix on the fluoride effect on erosion progression in human dentine using longitudinal microradiography. *Arch Oral Biol* 2004;49:931-935.
- Ganss C, Lussi A, Sommer N, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of fluoride compounds and stannous chloride as erosion inhibitors in dentine. *Caries Res* 2010;44:248-252.
- Ganss C, Schlueter N, Hardt M, von Hinckeldey J, Klimek J. Effects of toothbrushing on eroded dentine. *Eur J Oral Sci* 2007;115:390-396.

Garbisa S, Sartor L, Biggin S, Salvato B, Benelli R, Albini A. Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. . Cancer 2001;91:822-832.

Garcia-Godoy F, Tay FR, Pashley DH, Feilzer A, Tjäderhane L, Pashley EL. Degradation of resin-bonded human dentin after 3 years of storage. Am J Dent 2007;20:109-113.

Geiger SB, Harper E. The inhibition of human gingival collagenase by an inhibitor extracted from human teeth. J Periodontal Res 1981;16:8-12.

Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. Clin Diagn Lab Immunol 1999;6:437-439.

Goldberg M, Smith AJ. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. Crit Rev Oral Biol Med 2004;15:13-27.

Gregg T, Mace S, West NX, Addy M. A study in vitro of the abrasive effect of the tongue on enamel and dentine softened by acid erosion. Caries Res 2004;38:557-560.

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;110:353-357.

Hall R, Septier D, Embery G, Goldberg M. Stromelysin-1 (MMP-3) in forming enamel and predentine in rat incisor-coordinated distribution with proteoglycans suggests a functional role. Histochem J 1999;31:761-770.

Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 1980;44:331-384.

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

-
- Hara AT, Ando M, Cury JA, Serra MC, González-Cabezas C, Zero DT. Influence of the organic matrix on root dentine erosion by citric acid. *Caries Res* 2005;39:134-138.
- Hara AT, Ando M, González-Cabezas C, Cury JA, Serra MC, Zero DT. Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ. *J Dent Res* 2006a;85:612-616.
- Hara AT, Lussi A, Zero DT. Biological factors. *Monogr Oral Sci* 2006b;20:88-99.
- Hara AT, Turssi CP, Teixeira EC, Serra MC, Cury JA. Abrasive wear on eroded root dentine after different periods of exposure to saliva in situ. *Eur J Oral Sci* 2003;111:423-427.
- Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res* 2005;84:741-746.
- Hjelljord LG, Rolla G, Bonesvoll P. Chlorhexidine-protein interactions. *Journal of Periodontal Research* 1973;12:11-16.
- Imfeld T. Dental erosion. Definition, classification and links. *Eur J Oral Sci* 1996;104:151-155.
- Ingman T, Sorsa T, Lindy O, Koski H, Kontinen YTI. Multiple forms of gelatinases/type IV collagenases in saliva and gingival crevicular fluid of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1994;21:26-31.
- Isbrucker RA, Edwards JA, Wolz E, Davidovich A, Bausch J. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 2: dermal, acute and short-term toxicity studies. *Food Chem Toxicol* 2006;44:636-650.
- Jaeggi T, Lussi A. Toothbrush abrasion of erosively altered enamel after intraoral exposure to saliva: an in situ study. *Caries Res* 1999;33:455-461.
- Jamall IS, Finelli VN, Que Hee SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem* 1981;112:70-75.

Kato MT. Avaliação in vitro e in situ do efeito dos íons ferro na erosão da superfície dentária bovina e humana [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2007, p 176.

Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MA. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. *J Dent Res* 2010a;89:468-472.

Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Oliveira RC, Pereira JC, Tjäderhane L, et al. Effect of iron on matrix metalloproteinase inhibition and on the prevention of dentine erosion. *Caries Res* 2010b;44:309-316.

Kato MT, Magalhães AC, Rios D, Hannas AR, Attin T, Buzalaf MA. Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. *J Appl Oral Sci* 2009;17:560-564.

Kato MT, Maria AG, Sales-Peres SHC, Buzalaf MA. Effect of iron on the dissolution of bovine enamel powder in vitro by carbonated beverages. *Arch Oral Biol* 2007a;52:614-617.

Kato MT, Sales-Peres SH, Buzalaf MA. Effect of iron on acid demineralisation of bovine enamel blocks by a soft drink. *Arch Oral Biol* 2007b;52:1109-1111.

Kinney JH, Balooch M, Haupt DL, Jr., Marshall SJ, Marshall GW, Jr. Mineral distribution and dimensional changes in human dentin during demineralization. *J Dent Res* 1995;74:1179-1184.

Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994;218:325-329.

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;73:1523-1529.

Klont B, ten Cate JM. Remineralization of bovine incisor root lesions in vitro: the role of the collagenous matrix. *Caries Res* 1991;25:39-45.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.

-
- Lee MJ, Lambert JD, Prabhu S, Meng X, Lu H, Maliakal P, et al. Delivery of tea polyphenols to the oral cavity by green tea leaves and black tea extract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:132-137.
- Lin YS, Tsai YJ, Tsay JS, Lin JK. Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves. *J Agric Food Chem* 2003;51:1864-1873.
- Linde A, Goldberg M: Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:679-728.
- Lindhe J, Hamp SE, Loe H, Schiott CR. Influence of topical application of chlorhexidine on chronic gingivitis and gingival wound healing in the dog. *Scandinavia Journal of Dental Research* 1970;78:471-478.
- Litonjua LA, Andreana S, Bush PJ, Cohen RE. Tooth wear: attrition, erosion, and abrasion. *Quintessence Int* 2003;34:435-446.
- Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986;50:353-380.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
- Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res* 2004;38 Suppl 1:34-44.
- Madhan B, Krishnamoorthy G, Rao JR, Nair BU. Role of green tea polyphenols in the inhibition of collagenolytic activity by collagenase. *Int J Biol Macromol* 2007;41:16-22.
- Magalhães AC, Rios D, Delbem AC, Buzalaf MA, Machado MA. Influence of fluoride dentifrice on brushing abrasion of eroded human enamel: an in situ/ex vivo study. *Caries Res* 2007;41:77-79.
- Magalhães AC, Rios D, Moino AL, Wiegand A, Attin T, Buzalaf MAR. Effect of different concentrations of fluoride in dentifrices on dentin erosion subjected or not to abrasion in situ/ex vivo. *Caries Res* 2008;42:112-116.

- Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MA. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. *J Dent* 2009a;37:994-998.
- Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Honório HM, Buzalaf MA. Insights into preventive measures for dental erosion. *J Appl Oral Sci* 2009b;17:75-86.
- 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;73:1397-1406.
- Marshall GW, Jr., Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent* 1997;25:441-458.
- Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol* 2000;45:757-765.
- Martinhon CC, Italiani FM, Padilha PM, Bijella MF, Delbem AC, Buzalaf MA. Effect of iron on bovine enamel and on the composition of the dental biofilm formed in situ. *Arch Oral Biol* 2006;51:471-475.
- Maskos K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie* 2005;87:249-263.
- Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GA, Papa S, Mazzotti G, et al. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res* 2007;86:436-440.
- Mazzoni A, Papa V, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L, Ruggeri A, Jr., et al. Immunohistochemical and biochemical assay of MMP-3 in human dentine. *J Dent* 2011;*in press*.
- Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri A, Jr. et al. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis. *J Biomed Mater Res A* 2009;88:697-703.
- Meurman JH, Drysdale T, Frank RM. Experimental erosion of dentin. *Scand J Dent Res* 1991;99:457-462.

-
- Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Effects of frequency of exposure to iron-sucrose on the incidence of dental caries in desalivated rats. *Caries Res* 1997a;31:238-243.
- Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Effects of iron salts in sucrose on dental caries and plaque in rats. *Arch Oral Biol* 1997b;42:377-383.
- Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Influence of iron alone or with fluoride on caries development in desalivated and intact rats. *Caries Res* 1997c;31:244-248.
- Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491-21494.
- Nordbø 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;1:267-272.
- Nunn JH. Prevalence of dental erosion and the implications for oral health. *Eur J Oral Sci* 1996;104:156-161.
- Nuttall RK, Sampieri CL, Pennington CJ, Gill SE, Schultz GA, Edwards DR. Expression analysis of the entire MMP and TIMP gene families during mouse tissue development. *FEBS Lett* 2004;563:129-134.
- Ogaard B, Rolla G, Arends J. In vivo progress of enamel and root surface lesions under plaque as a function of time. *Caries Res* 1988;22:302-305.
- Oppermann RV, Rolla G. Effect of some polyvalent cations on the acidogenicity of dental plaque in vivo. *Caries Res* 1980;14:422-427.
- 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;83:216-221.
- Pecharki GD, Cury JA, Paes Leme AF, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, et al. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization in situ. *Caries Res* 2005;39:123-129.
- Petersson GH, Bratthall D. The caries decline: a review of reviews. *Eur J Oral Sci* 1996;104:436-443.

Ponduri S, Macdonald E, Addy M. A study in vitro of the combined effects of soft drinks and tooth brushing with fluoride toothpaste on the wear of dentine. *Int J Dent Hyg* 2005;3:7-12.

Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Buzalaf MA, Palma-Dibb RG, Machado MA, et al. Influence of toothbrushing on enamel softening and abrasive wear of eroded bovine enamel: an in situ study. *Braz Oral Res* 2006a;20:148-154.

Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Delbem AC, Machado MA, Silva SM, et al. Effect of salivary stimulation on erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: an in situ/ex vivo study. *Caries Res* 2006b;40:218-223.

Rosalen PL, Pearson SK, Bowen WH. Effects of copper, iron and fluoride co-crystallized with sugar on caries development and acid formation in deslivated rats. *Arch Oral Biol* 1996;41:1003-1010.

Rytomaa I, Meurman JH, Koskinen J, Laakso T, Gharazi L, Turunen R. In vitro erosion of bovine enamel caused by acidic drinks and other foodstuffs. *Scand J Dent Res* 1988;96:324-333.

Sales-Peres SH, Pessan JP, Buzalaf MA. Effect of an iron mouthrinse on enamel and dentine erosion subjected or not to abrasion: an in situ/ex vivo study. *Arch Oral Biol* 2007;52:128-132.

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;258:3058-3063.

Santos J, Carrilho M, Tervahartiala T, Sorsa T, Breschi L, Mazzoni A, et al. Determination of matrix metalloproteinases in human radicular dentin. *J Endod* 2009;35:686-689.

Sartor L, Pezzato E, Dell'Aica I, Caniato R, Biggin S, Garbisa S. Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochem Pharmacol* 2002;64:229-237.

-
- Scheutzel P. Etiology of dental erosion--intrinsic factors. *Eur J Oral Sci* 1996;104:178-190.
- Schlueter N, Ganss C, Hardt M, Schegietz D, Klimek J. Effect of pepsin on erosive tissue loss and the efficacy of fluoridation measures in dentine in vitro. *Acta Odontol Scand* 2007;65:298-305.
- Snoek-Van Beurden PA, von Den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques* 2005;38:73-83.
- 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;732:112-131.
- Sorsa T, Tjäderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med* 2006;38:306-321.
- Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis* 2004;10:311-318.
- Sorsa T, Uitto VJ, Suomalainen K. Characteristics of human salivary collagenase and its relationship to periodontal diseases. *Matrix Suppl* 1992;1:406-407.
- Souza AP, Gerlach RF, Line SR. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dent Mater* 2000;16:103-108.
- Souza AP, Gerlach RF, Line SR. Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam. *Biomaterials* 2001;22:2025-2030.
- Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516.
- Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res* 2002;81:603-607.

- Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol* 2007;52:121-127.
- Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, et al. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *J Dent Res* 2001;80:1545-1549.
- Tay FR, Pashley DH. Dentin bonding. Is there a future? *J Adhes Dent* 2004;6:263.
- Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Paakkonen V, Martins MT, et al. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *J Endod* 2010;36:475-481.
- Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res* 1998;77:1622-1629.
- Tjäderhane 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;15:55-58.
- Torell P. Iron and dental caries. *Swed Dent J* 1988;12:113-124.
- van Strijp AJ, Jansen DC, DeGroot J, ten Cate JM, Everts V. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. *Caries Res* 2003;37:58-65.
- Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827-839.
- 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;31:329-338.
- Wahlgren J, Salo T, Teronen O, Luoto H, Sorsa T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpal and periapical inflammation and periapical root-canal exudates. *Int Endod J* 2002;35:897-904.

Wiegand A, Meier W, Sutter E, Magalhães AC, Becker K, Roos M, et al. Protective effect of different tetrafluorides on erosion of pellicle-free and pellicle-covered enamel and dentine. *Caries Res* 2008;42:247-254.

Wiegand A, Stock A, Attin R, Werner C, Attin T. Impact of the acid flow rate on dentin erosion. *J Dent* 2007;35:21-27.

Wikipédia: Colágeno; in: Wikipédia. A enciclopédia livre, 2011.

Woessner JF, Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 1961;93:440-447.

Yip KH, Smales RJ, Kaidonis JA. The diagnosis and control of extrinsic acid erosion of tooth substance. *Gen Dent* 2003;51:350-353.

Anexos

Diz-me, e eu esquecerei; ensina-me e eu lembrar-me-ei;
envolve-me, e eu aprenderei.
(Autor desconhecido)

ANEXO A – Comitê de Ética em Pesquisa referente à unificação dos títulos

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 (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Of.nº CEP/04 2011/FOB

Bauru, 8 de junho de 2011.

Senhora Professora,

Em atenção à solicitação de Vossa Senhoria para a **unificação dos títulos das pesquisas** *Avaliação do efeito do chá verde, inibidor natural da matriz de metaloproteinase sobre a erosão associada ou não à abrasão da dentina: um estudo in situ*, de autoria de Melissa Thiemi Kato; *Efeito de um gel experimental na inibição da erosão da dentina provocada por um refrigerante in situ/ex vivo*, de autoria de Melissa Thiemi Kato e colaboração de Aline de Lima Leite e Angélica Reis Hannas e *Perfil de expressão e atividade das metaloproteinases da matriz em dentina bovina*, de autoria de Bruno Lara Zarella, sob sua orientação, **para** INIBIÇÃO DAS METALOPROTEINASES DA MATRIZ COMO NOVA ESTRATÉGIA PARA PREVENÇÃO DA EROSÃO DENTINÁRIA, de autoria de Melissa Thiemi Kato, informamos a autorização deste Comitê de Ética em Pesquisa, considerando não haver impedimentos éticos.

Lembramos aos pesquisadores que, ao término da pesquisa, seja enviado relatório final para novo parecer o qual será utilizado para publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa referente ao Subprojeto 1 **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 (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Processo nº 128/2008

Bauru, 30 de outubro de 2008.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado "Comparação da atividade das MMPs 2 e 9 presentes em dentina humana e bovina", de autoria de Bruno Lara Zarella, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 29 de outubro de 2008 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,

Profª Drª Maria Teresa Atta
Coordenadora

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO C – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa referente ao Subprojeto 2 **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)3223-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (3235-8356)
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Of. nº CEP/27 2007/FOB

Proc. CEP nº 021/2007

Bauru, 16 de agosto de 2007.

Senhora Professora,

Encaminhamos a Vossa Senhoria PARECER Nº 542/2007 emitido pela CONEP referente ao trabalho de pesquisa **"Avaliação do efeito do chá verde, inibidor natural da matriz de metaloproteinase sobre a erosão associada ou não à abrasão da dentina: um estudo *in situ*"** de autoria de Melissa Thiemí Kato, sob sua orientação, tendo sido considerado **APROVADO COM RECOMENDAÇÃO**.

Após efetuadas as devidas alterações no TCLE, gentileza enviar para nova análise deste CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Henrique Rubo
Coordenador

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO D – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa referentes aos**Subprojetos 3 e 4** **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 (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Processo nº 119/2008

Bauru, 30 de outubro de 2008.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado **"Efeito de um gel experimental na inibição da erosão da dentina provocada por um refrigerante in situ/ex vivo"**, de autoria de Melissa Thiemi Kato e colaboração de Aline de Lima Leite e Angélica Reis Hannas, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 29 de outubro de 2008 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,

Profª Drª Maria Teresa Atta
Coordenadora

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO E – Manuscrito aprovado para publicação na Caries Research
referente ao Subprojeto 1

Activity of matrix metalloproteinases in bovine *versus* human dentine

M.T. Kato^a, A.R. Hannas^a, A.L. Leite^a, A. Bolanho^a, B.L. Zarella^a, J. Santos^b, M. Carrilho^c, L. Tjäderhane^d, M.A.R. Buzalaf^{a*}

^aDepartment of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, USP - University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil

^bDepartment of Restorative Dentistry, Endodontics Area, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil.

^cGEO/UNIBAN, Bandeirante, University of São Paulo, School of Dentistry, São Paulo, SP, Brazil

^dInstitute of Dentistry, University of Oulu; and Oulu University Hospital, Finland.

Short title: Activity of MMPs in bovine and human dentine

Key Words: Dentine; MMP; Bovine tooth; Human tooth; Gelatinase

* Corresponding Author: Marília Afonso Rabelo Buzalaf - Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, SP. Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 Bauru-SP, 17012-901 Brazil. Tel. + 55 14 32358346; Fax + 55 14 32271486; E-mail: mbuzalaf@fob.usp.br

Declaration of interests: The authors declare that there are no conflicts of interest involving this manuscript.

Abstract

Metalloproteinases (MMPs) have been implicated with metabolism of collagen in physiological and pathological processes in human dentine. As bovine teeth have been used as substitute of human teeth in laboratorial analysis, this study evaluated the activity of MMP-2 and -9 in bovine *versus* human dentine. Bovine and human dentine fragments, from crowns and roots, were powderised. Protein extraction was performed by two protocols: a neutral extraction with guanidine-HCl/EDTA (pH 7.4) and an acidic extraction with citric acid (pH 2.3). Gelatinolytic activities of extracts were revealed by zymography. MMP-2 and -9 were detected in crown and root dentine from bovine (BC, BR) and human (HC, HR) teeth. Total activities of MMP-2 were 11.4 ± 2.2 , 14.6 ± 2.0 , 9.7 ± 1.2 and 12.4 ± 0.9 ng/mL for BR, HR, BC and HC, respectively. Corresponding activities for MMP-9 were 14.9 ± 2.0 , 15.3 ± 1.3 , 15.4 ± 1.3 and 15.5 ± 1.3 ng/mL, respectively. Bovine dentine showed to be a reliable substrate for studies involving the activity of MMPs -2 and -9.

Introduction

Matrix metalloproteinases (MMPs), collectively known as matrixins, form a multigene family of endopeptidases that mediate the degradation of practically all extracellular matrix (ECM) molecules, including native and denatured collagen [Sorsa et al., 2004; Visse and Nagase, 2003]. MMPs are widely active in biological processes and can contribute to both normal and pathological events [Hannas et al., 2007].

MMP-2, -8 and -9 have been identified in human dentine [Martin-De Las Heras et al., 2000; Santos et al., 2009; Sulkala et al., 2007]. They are also present in carious dentine both in the latent pro- and active forms [Tjäderhane et al., 1998; van Strijp et al., 2003]. In addition, MMP-20 was shown to be present at least in dentinal fluid [Sulkala et al., 2002].

Due to the increasing difficulty to obtain human teeth, bovine teeth have been frequently used in *in vitro* and *in situ* studies to simulate the behavior of human tooth [Francisconi et al., 2008; Rios et al., 2006; Vieira et al., 2006]. Although a number of comparisons have been performed in order to characterise similarities or distinctions in morphology [Fonseca et al., 2008; Reis et al., 2004; Schilke et al., 2000], physiology [Schmalz et al., 2001] and mechanical structure [Hara et al., 2003; Wegehaupt et al., 2008] between bovine and human dentine, very few studies have dedicated considerable attention to disclose how similar or distinct is the biochemical behavior of organic components present in human *versus* bovine dentine matrix. For instance, only a few studies have compared the profile of MMPs in human and bovine enamel matrix [Caterina et al., 2000; DenBesten et al., 1989; Zhu et al., 2008], with non-conclusive findings.

A series of recent studies using MMP inhibitors demonstrate the reduction of the progression of erosion in dentine [Kato et al., 2010a; Kato et al., 2010b; Kato et al., 2009; Magalhães et al., 2009], indicating the presence of collagenolytic/gelatinolytic MMPs in bovine dentine. If similarities in the profiles of MMPs in bovine and human teeth really exist, then bovine dentine can be adequately used as substitute for human dentine in all kinds of studies involving the activity of these enzymes.

Therefore, the aim of the present study was to evaluate the profile and activity of MMP-2 and -9 in human and bovine dentine. The null hypothesis tested was that there are no differences in the profile and activity of MMP-2 and -9 in human and bovine dentine, both from crown and root.

Materials and Methods

Specimen Selection and Preparation

Human third molars (n=30) were obtained from young patients, aged from 18 to 25 years, after approval of the Institutional Review Board of Bauru Dental School, University of São Paulo, Brazil (Proc. 128/2008). Likewise, bovine incisors (n=40), with complete root formation, were taken from slaughtered young animals (24 to 36 months). Teeth extracted from young patients or animals were used in order to minimise the possible variation in the activity of MMPs in dentine due to aging, since it was shown that the activity of MMP-2 in human dentine is reduced in older people [Martin-De Las Heras et al., 2000]. Human molars and bovine incisors were chosen because they are largely employed in in situ and in vitro studies due to the fact that human molars are easier to obtain than human incisors. On the other hand, it is much easier to cut specimens from bovine incisors when compared to bovine molars. Samples were stored in 0.9% NaCl solution containing 0.02% sodium azide at 4°C. After removal of organic debris, calculus and pulp tissue, crowns were separated from the roots at the cementum-enamel junction. Dentine was exposed by a diamond bur operated in a high-speed hand piece under copious water irrigation. Crown and root dentine samples were separately cut into smaller fragments (2x2 mm), frozen in liquid nitrogen and powderised in a mixer mill (Model MM301, Retsch, Haan, Germany).

Dentine proteins extraction

Protocol I: Neutral Extraction

Pooled bovine or human dentine powder from crown and root samples separately was divided into 2 g aliquots. Extraction of dentine proteins was performed using the protocol described by Martin-De Las Heras et al. [Martin-De Las

Heras et al., 2000]. Crown or root dentine powder was treated with 4 M guanidine-HCl in 65 mM Tris-HCl and loosely bound proteins were extracted using centrifugation (G extract). Dentine demineralisation was then performed by 0.5 M ethylene diamine tetracetic acid (EDTA) in four cycles to extract mineral-associated proteins (E extracts).

Since MMP-9 was not detected in bovine root dentine neither in human dentine (both crown and root) using this protocol, we decided to test another extraction protocol involving demineralisation with citric acid for further analysis of all substrates.

Protocol II: Acidic Extraction

One-gram aliquots of bovine and human dentine powder, from crown and root samples, were demineralised in 10 mL of 0.87 M citric acid, pH 2.3 at 4°C for 24 hours [Mazzoni et al., 2007]. Briefly, after demineralisation the citric acid was discarded and dentine powder was suspended in 10 mL extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.0, containing 5 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.1% NONIDET P-40, 0.1 mM ZnCl_2 , 0.02% NaN_3) and EDTA-free protease inhibitor cocktail. Samples were ultra-sonicated (Branson Sonic Power Co. and Smithkline Co., Sonifier Cell Disruptor, Danbury, EUA) at 30-40 W output for 3 bursts of 20 s each at 4°C and centrifuged at 19,900 X g for 30 min at 4°C. The supernatants were collected and concentrated 4 times in a refrigerated protein concentrator (Savant Speedvac System, UVS400A, Arizona, EUA). It was observed higher protein concentration when the extracts were not precipitated with ammonium sulphate and dialysed (Table 1). Thus, the steps involving precipitation with ammonium sulphate followed by dialysis that were originally described in Mazzoni's protocol [Mazzoni et al., 2007] were not employed in the present study.

Protein Content Determinations

The protein concentration in all extracts, obtained using both protocols of extraction, was measured in triplicates using a commercial kit (DC protein assay reagent kit, Amersham-Pharmacia, Milan, Italy) that is based on the Lowry's method

[Lowry et al., 1951]. Aliquots (60 µg) were prepared and lyophilised for zymography analysis.

Gelatin Zymography

Aliquots of dentine powder (2:1 sample:sample buffer) were dissolved in non-reduced sample buffer (0.1 M Tris HCl/SDS pH 6.8) at room temperature and separated in 11% gelatin-containing polyacrylamide gels at 110 V for approximately 2 h and 15 min [Sulkala et al., 2007]. In order to confirm if the enzymes under study were MMPs, a representative gel loaded with MMPs was incubated in 3 mM 1,10 phenantroline, which is a specific MMP inhibitor. Molecular weight markers consisted of pre-stained low-range SDS-PAGE standards (Bio-Rad, Hercules, EUA). Purified commercial MMP-2 (Chemicon International, Temecula, EUA) and MMP-9 (Invitek GmbH, Berlin, Germany) were loaded onto the gel using 0.5 ng of each MMP, as positive controls. After electrophoresis, the gels were washed for 30 min in 50 mM Tris-HCl, 1% Tween 80 and 0.02% (w/v) NaN₃, pH 7.5, and then for 30 min in the same buffer supplemented with 5 mM CaCl₂ and 1 µM ZnCl₂ for removal of SDS. Finally, the gels were incubated in activation solution (50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, 1 µM ZnCl₂, 0.02% NaN₃, pH 7.5) at 37°C. Proteolytic activity was monitored under long-wave UV light until judged to be in linear range. The gels were stained in 0.2% Coomassie Brilliant Blue R-250 and de-stained in an aqueous solution of 10% acetic acid and 10% methanol. Zymography assay of dentine proteins was performed in triplicates and repeated three times.

Activity profile of MMP-2 and -9

For enzymes extracted with the acidic protocol, total MMP-2 and -9 activities were determined in dentine extracts (2 µg) with the use of immunoassay kits (MMP Activity Assay Biotrak™ System, GE Healthcare, UK, #RPN2631 and #RPN2634 for MMP-2 and MMP-9, respectively). Detection limits were determined at 0.5 and 0.25 µg/mL for MMP-2 and -9, respectively and the calibration curves had $r^2 > 0.95$. Detection of enzyme activity was performed with or without the addition of APMA (4-aminophenylmercuric acetate), an activator of MMP, according to the manufacturer's instructions.

Results

Protocol I: Neutral Extraction

Zymography analysis revealed gelatinolytic activity for root and crown bovine (Figure 1A) and human (Figure 1B) dentine extracts. G extracts from bovine crown dentine yielded 68 and 92 kDa bands corresponding likely to MMP-2 and MMP-9, respectively (Fig. 1A). Bovine root dentine proteins from G extracts yielded 68 kDa bands (Fig. 1A) with virtual absence of gelatinolytic bands co-migrating with MMP-9 positive control. EDTA extracts revealed mainly 68/72 kDa bands corresponding to active and latent MMP-2 in crown and root dentine samples (Fig. 1A). All extracts exhibited markedly higher intensity for bands at 68 kDa, indicating MMP-2 as the predominant gelatinase form. Gelatinolytic activity was also detected at lower molecular weight range (40-20 kDa), probably corresponding to truncated forms of enzymes (Fig. 1A).

Root human dentine extracts yielded stronger bands than crown human dentine samples (Fig. 1B). Guanidine-HCl extracts (G) for human dentine exhibited markedly higher intensity for bands at 68/72 kDa indicating MMP-2 as the predominant gelatinase form. Gelatinolytic activity was also detected at lower molecular weight range (40-20 kDa) for human root dentine extracts (Fig. 1B).

Protocol II: Acidic Extraction

Zymography analysis showed the presence of both pro and active enzyme forms for both gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in all tested substrates (Figure 2).

Quantification of the activity profiles of MMP-2 and -9 after protein extraction for the different substrates is presented in Table 2. “Endog” indicates endogenous activity of the enzymes, obtained without addition of APMA to the samples. Total activity was obtained by addition of APMA to the samples. “Activated” indicates the pro enzymes that were activated by APMA, obtained by subtracting the endogenous activity from the total activity. It was possible to observe that the activity of both enzymes was in general similar for the tested substrates, especially for MMP-9. Regarding MMP-2, the total activity was 30% higher in human than in bovine dentine,

both for root and crown samples. When crown samples were compared with root samples, the total activity of MMP-2 was around 20% higher in root samples.

Discussion

MMP-2, -8 and -9 have been detected in human crown [Martin-De Las Heras et al., 2000; Mazzoni et al., 2007; Sulkala et al., 2007] and root dentine [Santos et al., 2009]. Despite MMP-8 has been described as the major collagenase in human dentine, it might be primarily involved in the organisation of the dentine organic matrix before mineralisation and gelatinases other than MMP-8 are incorporated or more efficiently bound to the mineralised dentine matrix [Sulkala et al., 2007]. For this reason, only MMPs -2 and -9 were included in the present investigation. Results of the present study corroborate previous findings and strongly indicate that gelatinases embedded in the dentine matrix can be partially in active form. Partial activation e.g. by dentine cysteine cathepsins [Tersariol et al., 2010] during extraction could not be absolutely ruled out. However, as protein extractions were performed with protease inhibitor cocktail containing cysteine cathepsin inhibitor E-64 (an effective irreversible inhibitor of cysteine proteases), the activation of gelatinases during extraction is less likely. Since the MMPs have been embedded into the mineralised dentine even years before the extraction, the presence of active gelatinases in mineralised dentine emphasizes the incredible stability of these enzymes when embedded in mineralised dentine. This is supported by the previously demonstrated ability of dentinal gelatinases to withstand excessive heat without loss of activity [Sulkala et al., 2007].

Protein analysis in mineralised substrates is only possible by using extraction protocols to release them from the tissue. The extraction procedures involving citric acid demineralisation [Mazzoni et al., 2007] are less labor-intensive and are claimed to enhance higher protein recovery. While this protocol promotes extraction of all proteins at once, it permits only the analysis of enzymes that at the end of the extraction process remained bound to the dentine extracellular matrix. The neutral HCl/EDTA protocol [Martin-De Las Heras et al., 2000], conversely, allows determination of gelatinases in loosely bound/unbound protein fraction and sequential extraction in different steps, including the proteins extracted prior to and during demineralisation [Martin-De Las Heras et al., 2000; Santos et al., 2009; Sulkala et al., 2007]. Having such different processes to expose and extract enzymes from mineralised dentine, direct comparisons between the performances of one

protocol over the other would not be realistic. However, it is interesting to reflect on the fact that only the acidic protocol was able to reveal the activity of MMP-9 in bovine root dentine and in human crown and root dentine. Although we can only speculate on this issue, it is possible to consider two aspects: 1) the residual presence of EDTA (used in the neutral protocol), a well-known MMP-inhibitor, may have affected preferentially the activity of MMP-9; 2) the acidic environment provided when running the acidic protocol may have stimulated the activity of MMP-9. Actually, by investigating the activity of human salivary MMPs, it was demonstrated that the exposure of MMP-2 and -9 to low pH (between 2.3 to 4.5) followed by neutralisation (i.e. a sequence typical in dental plaque after the ingestion of sugars), caused a greater than four-fold increase in the gelatinolytic activity of those enzymes, being it perceptually more significant for MMP-9 [Tjäderhane et al., 1998]. Additionally, after acidic activation, it was also observed by zymography a gradual time-dependent shift of MMP-9 from 92 kDa to a lower molecular mass of about 82 kDa [Tjäderhane et al., 1998], which corresponds to the functionally active form of MMP-9 [Ogata et al., 1992]. Thus, it seems reasonable to consider that the acidic protocol may provide better conditions for MMPs to exhibit their gelatinolytic potential.

To the best of our knowledge, this was the first study wherein comparisons of the profile and activity of MMPs in bovine *versus* human dentine were performed at once. For MMP-2, the activities in crown and root human dentine were around 30% higher than in their respective counterparts in bovine dentine. For MMP-9, however, the total activities were similar for all the substrates tested. Despite the results are descriptive and no statistical analysis was conducted, these findings indicate that substrates from both origins can be used in experiments where the activity of MMP-2 and MMP-9 is for any reason investigated, such as protocols involving erosion, caries and dental restorations.

Acknowledgements: This study was supported by FAPESP (Proc. 07/08389-3, 07/04209-0, 08/09857-3 and 07/54618-4) and CNPq (300615/2007-8). The authors thank Ms. Andrieli Silva for the technical assistance.

References

Caterina J, Shi J, Sun X, Qian Q, Yamada S, Liu Y, Krakora S, Bartlett JD, Yamada Y, Engler JA, Birkedal-Hansen H, Simmer JP: Cloning, characterization, and expression analysis of mouse enamelysin. *J Dent Res* 2000;79:1697-1703.

DenBesten PK, Heffernan LM, Treadwell BV, Awbrey BJ: The presence and possible functions of the matrix metalloproteinase collagenase activator protein in developing enamel matrix. *Biochem J* 1989;264:917-920.

Fonseca RB, Haiter-Neto F, Carlo HL, Soares CJ, Sinhoreti MA, Puppim-Rontani RM, Correr-Sobrinho L: Radiodensity and hardness of enamel and dentin of human and bovine teeth, varying bovine teeth age. *Arch Oral Biol* 2008;53:1023-1029.

Francisconi LF, Honório HM, Rios D, Magalhães AC, Machado MA, Buzalaf MA: Effect of erosive pH cycling on different restorative materials and on enamel restored with these materials. *Oper Dent* 2008;33:203-208.

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

Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA: Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. *Caries Res* 2003;37:339-344.

Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MA: Gels containing mmp inhibitors prevent dental erosion in situ. *J Dent Res* 2010a;89:468-472.

Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Oliveira RC, Pereira JC, Tjäderhane L, Buzalaf MA: Effect of iron on matrix metalloproteinase inhibition and on the prevention of dentine erosion. *Caries Res* 2010b;44:309-316.

Kato MT, Magalhães AC, Rios D, Hannas AR, Attin T, Buzalaf MA: Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. *J Appl Oral Sci* 2009;17:560-564.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.

Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MA: Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. *J Dent* 2009;37:994-998.

Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM: The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol* 2000;45:757-765.

Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GA, Papa S, Mazzotti G, Di Lenarda R, Pashley DH, Breschi L: Zymographic analysis and characterization of mmp-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res* 2007;86:436-440.

Reis AF, Giannini M, Kavaguchi A, Soares CJ, Line SR: Comparison of microtensile bond strength to enamel and dentin of human, bovine, and porcine teeth. *J Adhes Dent* 2004;6:117-121.

Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Delbem AC, Machado MA, Silva SM, Buzalaf MA: Effect of salivary stimulation on erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: An in situ/ex vivo study. *Caries Res* 2006;40:218-223.

Santos J, Carrilho M, Tervahartiala T, Sorsa T, Breschi L, Mazzoni A, Pashley D, Tay F, Ferraz C, Tjaderhane L: Determination of matrix metalloproteinases in human radicular dentin. *J Endod* 2009;35:686-689.

Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtsen W: Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol* 2000;45:355-361.

Schmalz G, Hiller KA, Nunez LJ, Stoll J, Weis K: Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *J Endod* 2001;27:23-30.

Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T: Matrix metalloproteinases (mmps) in oral diseases. *Oral Dis* 2004;10:311-318.

Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L: The localization of matrix metalloproteinase-20 (mmp-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res* 2002;81:603-607.

Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L: Matrix metalloproteinase-8 (mmp-8) is the major collagenase in human dentin. Arch Oral Biol 2007;52:121-127.

Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Paakkonen V, Martins MT, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, Salo T, Tjäderhane L: Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. J Endod 2010;36:475-481.

Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto V-J, Larmas M, Salo T: The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. J Dent Res 1998;77:1622-1629.

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

Vieira A, Lugtenborg M, Ruben JL, Huysmans MC: Brushing abrasion of eroded bovine enamel pretreated with topical fluorides. . Caries Res 2006;40:224-230.

Visse R, Nagase H: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. Circ Res 2003;92:827-839.

Wegehaupt F, Gries D, Wiegand A, Attin T: Is bovine dentine an appropriate substitute for human dentine in erosion/abrasion tests? J Oral Rehabil 2008;35:390-394.

Zhu L, Tanimoto K, Robinsin S, Chen J, Witkowska E, Hall S, Le T, Denbesten PK, Li W: Comparative properties of recombinant human and bovine matrix metalloproteinase-20. Arch Oral Biol 2008;53:785-790.

Legends

Table 1 - Total protein quantification (mg/mL $\pm$ SD) for the different substrates after different protein extraction protocols

Table 2 - Activity quantification of MMP-2 and -9 for the different substrates (ng/mL $\pm$ SD)

Figure 1A - Gelatinolytic activities observed for proteins extracted with guanidine-HCL (G) before demineralisation. Distinct bands corresponding to MMP-2, as well as fainter lower molecular weight bands corresponding to truncated forms, are present both in crown and root bovine dentine samples. In crown samples, also faint but clear bands corresponding to MMP-9 can be seen. Respective gelatinolytic activities are also present in EDTA (E) extracts of mineralised dentine.

Figure 1B - Crown and root human dentine samples obtained after EDTA extraction (E) and after the second guanidine extraction (G). Stronger bands can be observed at 68 kDa range in root dentine samples in both extracts, corresponding to the active form of MMP-2.

Figure 2 - Gelatinolytic proteinases of both pro and active forms of MMP-2 and -9. Lane 1 – MWM, molecular weight markers; Lanes 2 and 3 – Positive controls (human recombinant MMP-2 and -9, respectively); Lanes 4 to 7: samples extracted from bovine dentine crown (BC), human crown (HC), bovine root (BR) and human root (HR) dentine, respectively.

Table 1

Substrates	Dialysis ^a	With precipitation ^b	Without precipitation ^c
Bovine root (BR)	0.083±0.004	0.078±0.000	0.109±0.002
Human root (HR)	0.087±0.001	0.078±0.000	0.108±0.001
Bovine crown (BC)	0.081±0.000	0.077±0.000	0.114±0.002
Human crown (HC)	0.086±0.000	0.077±0.000	0.106±0.001

^a Extraction + precipitation with 85% ammonium sulphate + dialysis.

^b Extraction + precipitation with 85% ammonium sulphate

^c Extraction only

Table 2

Substrates	MMP-2 (ng/mL±SD)	MMP-9 (ng/mL±SD)
<i>Blanck (extraction buffer)</i>	0.14±0.00	0.05±0.00
<i>BR Endog</i>	3.42±0.51	1.80±0.02
<i>BR Activated</i>	8.01±1.91	13.11±0.20
<i>BR Total activity</i>	11.43±2.21	14.91±2.02
<i>HR Endog</i>	5.59±0.00	4.61±0.02
<i>HR Activated</i>	8.98±2.01	10.73±0.43
<i>HR Total activity</i>	14.57±2.01	15.34±1.31
<i>BC Endog</i>	5.06±1.70	6.61±0.06
<i>BC Activated</i>	4.59±0.54	8.75±0.83
<i>BC Total activity</i>	9.65±1.16	15.36±1.32
<i>HC Endog</i>	10.57±1.35	4.00±0.05
<i>HC Activated</i>	1.78±0.60	11.46±0.83
<i>HC Total activity</i>	12.35±0.93	15.46±1.32

*Samples: BR – Bovine root; HR – Human root; BC – Bovine crown; HC – Human crown

“Endog” indicates endogenous activity of the enzymes. “Activated” indicates the pro enzymes that were activated by APMA. Total activity is the addition of the two previously mentioned conditions.

Figure 1A

Figure 1B

Figure 2

ANEXO F – Artigo publicado no Journal of Applied Oral Science referente ao Subprojeto 2

www.fob.usp.br/jaos or www.scielo.br/jaos

J Appl Oral Sci. 2009;17(6):560-4

PROTECTIVE EFFECT OF GREEN TEA ON DENTIN EROSION AND ABRASION

Melissa Thiemi KATO¹, Ana Carolina MAGALHÃES², Daniela RIOS³, Angélica Reis HANNAS⁴, Thomas ATTIN⁵, Marília Afonso Rabelo BUZALAF⁶

1- DDS, MSc, Master's degree in Public Health, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil.

2- DDS, MSc, PhD, Professor, Discipline of Biochemistry, Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil.

3- DDS, MSc, PhD, Professor, Department of Pediatric Dentistry, Orthodontics and Community Health, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil.

4- DDS, MSc, PhD, Post-doctoral fellow, Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil.

5- DDS, MSc, PhD, Professor of Clinic for Preventive Dentistry, Periodontology and Cariology, University of Zürich, Switzerland.

6- DDS, MSc, PhD, Full Professor, Discipline of Biochemistry, Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil.

Corresponding address: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf - Departamento de Ciências Biológicas - Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo - Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 - Bauru, SP - 17012-901 - Brasil - Phone: + 55 14-3235-8346 - Fax +55-14-3226-2076 - e-mail: mbuzalaf@fob.usp.br

Received: December 12, 2008 - Modification: February 17, 2009 - Accepted: February 27, 2009

ABSTRACT

Objective: This *in situ* study evaluated the protective effect of green tea on dentin erosion (ERO) and erosion-abrasion (ABR). Material and methods: Ten volunteers wore intraoral palatal appliances with bovine dentin specimens subjected to ERO or ERO + toothbrushing abrasion performed immediately (ERO+I-ABR) or 30 min after erosion (ERO+30-min-ABR). During 2 experimental 5-day crossover phases, the volunteers rinsed with green tea or water (control, 1 min) between each erosive (5 min, cola drink) and abrasive challenge (30 s, toothbrushing), 4x/day. Dentin wear was measured by profilometry. Results: The green tea reduced the dentin wear significantly for all conditions compared to control. ERO+I-ABR led to significantly higher wear than ERO, but it was not significantly different from ERO+30-min-ABR. ERO+30-min-ABR provoked significant higher wear than ERO, only for the placebo treatment. Conclusions: From the results of the present study, it may be concluded that green tea reduces the dentin wear under erosive/abrasive conditions.

Key words: Dentin. Green tea. Tooth erosion. Tooth abrasion.

INTRODUCTION

Severe dental erosion is accompanied by dentin exposure, which might be associated with painful hypersensitivity and is accompanied by an increased risk for further dentin wear by different chemical and physical processes, such as erosion and abrasion³².

In dentin, the erosive demineralization results in the exposure of an outer layer of fully demineralized organic matrix followed by a partly demineralized zone until the sound inner dentin is reached¹⁶. The degradation of the dentin matrix occurs after it has become accessible by the removal of mineral, i.e., the dentin matrix cannot be degraded unless it is demineralized¹⁸. The dentin demineralization rate decreases when the amount of degradable collagen increases, whereby the demineralized matrix is attributed to hamper ionic diffusion into and out of the demineralizing area^{17,18}.

However, the organic matrix can be degraded mechanically and chemically, which can contribute to an enhanced progression of dentin wear^{8,9,12}.

Among the proteases that can chemically degrade the organic matrix of dentin are matrix metalloproteinases (MMPs) present in dentin and saliva³¹. MMPs are responsible for hydrolyzing the components of the extracellular matrix (ECM) during remodeling and degradation processes in the oral environment. MMPs related to the degradation of the collagen matrix of dentin are especially MMPs 2, 8, and 9^{21,30,31}. MMPs get activated when the pH drops in the presence of acids from cariogenic challenges. The subsequent neutralization by salivary buffer systems enhances the degrading activity of the organic matrix³¹. In addition, phosphorylated proteins released during the demineralization of the organic matrix can interact with inhibited host MMPs within the lesion and reactivate

them, thus enhancing the degrading activity. The activation of MMPs seems to be important for the progression of dentin caries, since they have a crucial role in the collagen breakdown in caries lesions. Individuals with a high concentration of MMPs in saliva present an increased susceptibility to dental caries⁵. Despite the lack of studies investigating the role of MMPs in dental erosion, processes similar to those occurring for caries could be speculated to occur for erosive lesions. In this sense, the maintenance of the organic matrix on eroded dentin would be likely to postpone further erosion progression, which could be achieved by the use of MMP inhibitors. This strategy has been successfully employed, by using chlorhexidine as an MMP inhibitor, for reduction of the degradation of the dentin hybrid layer both *in vivo*¹⁵ and *in vitro*⁴.

Due to the above-mentioned considerations, it might be interesting to find MMP inhibitors³ that could play a role on the reduction of dental erosion. Green tea polyphenols, especially epigallocatechin-3-gallate (EGCG), were found to have distinct inhibitory activity against MMPs^{5,7,10,28}. Thus, the aim of this *in situ* study was to test the protective effect of green tea on dentin erosion (ERO). Considering that the softened zone by erosive challenge seems to be more susceptible to mechanical forces, such as abrasion^{1,20}, the protective effect of green tea on erosion associated to immediate abrasion (ERO+I-ABR) or abrasion 30 min after the erosive challenge (ERO+30-mim-ABR) was investigated as well.

MATERIAL AND METHODS

Specimen preparation

One hundred and twelve crown dentin specimens (4 x 4 x 3 mm) were prepared from extracted bovine incisors, which had been stored in 0.1% thymol solution (pH 7.0) at 4°C for 30 days. One specimen was obtained from the labial surface of each crown. For preparation of dentin specimens, enamel was completely removed until dentin was just exposed. The exposed dentin was ground flat with water-cooled carborundum discs and polished with felt paper wet with 1 µm diamond spray (Buehler, Lake Bluff, IL, USA), resulting in a removal of about 100 µm of the outermost layer. For allocation of the specimens to the groups, the surface microhardness was determined by performing five indentations in different regions of the specimens (Knoop diamond, 10 g, 5 s, HMV-2000; Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan). The overall range of microhardness was 55-75 KHN. Specimens were allocated to groups by stratified randomization according to the mean surface microhardness. All groups presented similar mean microhardness (around 65 KHN).

In order to maintain reference surfaces for lesion depth determination by profilometry, two layers of nail varnish were applied on half of the surface of each specimen. Individual acrylic palatal appliances with 6 palatal cavities were used for intraoral exposure of the specimens. In three rows, each two specimens were arranged on the left and right

sides of the appliance.

Ethical aspects

This study was approved by the Institutional Review Board of Bauru Dental School, University of São Paulo, Brazil (Process 021/2007) and volunteers participated after signing an informed consent form. Ten healthy adult volunteers (aged 20-30 years) residing in a fluoridated area (0.6-0.8 mg F/L)²⁴, who fulfilled the inclusion criteria described below, took part in this study. They presented normal salivary parameters, such as adequate stimulated and non-stimulated salivary flows (>1.0 and 0.5 mL/min, respectively) and salivary pH (=6.8). The subjects were free from erosive lesions, untreated carious cavities or periodontitis. The number of volunteers in the present study was defined according to previous studies^{19,25,35}.

Intraoral phase

This *in situ* study involved 10 volunteers and was performed in two crossover 5-day phases, with a washout period of 7 days. In the first 12 h of each intraoral phase, specimens were not subjected to erosive and abrasive treatments to allow the formation of a salivary pellicle¹³. On the following 5 days, erosive and abrasive challenges were made extraorally 4 times a day at predetermined times (8, 12, 16 and 20 h) after the principal meals.

For erosion of the dentin specimens, the volunteers were instructed to remove the appliance and immerse it in a cup containing 150 mL of regular Coke (pH 2.6; Coca-cola Company SpA, Porto Real, RJ, Brazil) for 5 min at room temperature. During this period, the volunteers were instructed to prepare the green tea, according to manufacturers' instructions (Yamamotoyama; Midori Indústria de Chá Ltda, São Miguel Arcanjo, SP, Brazil): infusion of 2 g of the herb (*Camellia sinensis* leaves exposed to steam and presented as a sachet) into 180 mL of boiled water (100°C) for 1 min. The tea was cooled off for 4 min at room temperature. The fluoride content of the tea was 0.87 mg fluoride/L and its pH, 7.0. The concentration of EGCG in the green tea was 0.185 mg/mL (400 µM), as measured by high-performance liquid chromatography, according to Saito, et al.²⁶ The same procedure (including previous heating and cooling off) was performed with water from the public supply (0.6-0.8 mg fluoride/L), which was used as control. The temperature of the green tea and water immediately before the rinse was around 50°C.

After the 5 min of erosive challenge, the volunteers took one sip of the beverage. Thus, the appliances were re-inserted into the mouth and the volunteers rinsed with 10 mL of green tea or water for 1 min. Subsequently, the appliance was removed for abrasion treatment. While one row remained unbrushed (ERO), the other row was brushed *ex vivo* using a soft end-rounded electric toothbrush (Colgate Montions Multi-action; Colgate-Palmolive Ind. and Com. Ltda., SP, Brazil) with ~0.3 g of non-fluoridated dentifrice (Procter and Gamble Co, Cincinnati, USA) for 30 s (166 oscillations/s) each specimen (ERO+I-ABR). The appliances were replaced into the mouth and the volunteers rinsed with water

KATO M T, MAGALHÃES A C, RIOS D, HANNAS A R, ATTIN T, BUZALAF M A R

TABLE 1- Wear (μm) of dentin specimens subjected to erosion or erosion + abrasion (immediate or after 30 min) treated with green tea or water. Mean $\pm$ SD (95% CI)

Treatment	Conditions		
	Erosion	Erosion + immediate abrasion	Erosion + 30-min-abrasion
Water ^A	0.98 $\pm$ 0.13 ^a	1.23 $\pm$ 0.35 ^b	1.22 $\pm$ 0.23 ^b
(Control)	(0.89-1.07)	(0.98-1.48)	(1.05-1.38)
Green tea ^B	0.59 $\pm$ 0.18 ^a	0.90 $\pm$ 0.32 ^b	0.74 $\pm$ 0.23 ^{ab}
	(0.46-0.72)	(0.67-1.13)	(0.57-0.91)

Different uppercase letters in the columns indicate statistically significant differences between the treatments. Different lowercase letters in the rows indicate statistically significant differences among the conditions (2-way repeated-measures ANOVA, $p < 0.05$).

(10 mL, 5 s). After 30 min of erosion, the abrasive treatment was repeated for the 3rd row (ERO+30-min-ABR). The rows for the 3 experimental conditions were randomly allocated for each volunteer.

The volunteers received instructions to wear the appliances continuously for 24 h but to remove them during meals (4 times/day), when the appliance was stored in wet gauze. Seven days prior to the beginning and throughout the experimental phase, the volunteers brushed their teeth with a non-fluoridated dentifrice (Procter and Gamble Co, Cincinnati, OH, USA). They were also instructed to avoid licking of the specimens with the tongue to avoid abrasion¹¹. The volunteers received oral and written information to refrain from using any fluoridated or antibacterial product.

Wear analysis

After the *in situ* phase, the specimens were removed from the appliances and kept moistened (gauze soaked in water) up to the wear analysis in order to avoid shrinkage of the dentin organic material. The nail varnish over the reference surfaces was carefully removed²⁰. The dentin wear was determined in relation to the reference surfaces by contact profilometry (Hommel Tester T 1000, Hommelwerke, VS, Schwenningen, Germany). Five readings were performed on each specimen by scanning from the reference to the exposed surface. The mean values of five readings for each group were averaged.

Statistical Analysis

The assumptions of equality of variances and normal distribution of errors were checked for all the variables tested, using the Bartlett and Kolmogorov-Smirnov tests, respectively. Since the assumption was satisfied, two-way repeated measures ANOVA and Bonferroni *post hoc* test were used. The factors evaluated were treatment (green tea or water) as the dependent variable and condition (ERO, ERO+I-ABR and ERO+30-min-ABR) as the independent variable. The significance level was set at 5%. The software GraphPad Prism 4 version 4.0 for Windows (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) was used.

RESULTS

There was statistically significant difference among the conditions ($F=4.50$, $p=0.021$) and between the treatments ($F=65.45$, $p<0.0001$). Table 1 shows that the green tea reduced significantly the dentin wear for all conditions ($p<0.01$). For both treatments, the wear was significantly higher when abrasion was performed immediately after erosion (ERO+I-ABR) when compared to erosion alone (ERO). Regarding delayed abrasion (ERO+30-min-ABR), when rinsing was performed with water (control), a significantly higher wear was observed when compared to erosion alone (ERO). This, however, did not happen for the green tea rinse, which led to wear values that did not differ significantly from those of ERO. No significant differences in wear were observed when the conditions ERO+I-ABR and ERO+30-min-ABR were compared, for both treatments (Table 1).

DISCUSSION

The present study tested the effect of green tea on dentin wear by erosive/abrasive processes. Despite our protocol did not require the volunteers to drink the green tea, if this had to be done there would be no toxicological problems. It has been shown that tea polyphenol products in amounts equivalent to the EGCG content in 8-16 cup of green tea once a day is safe⁶. The response variable chosen to assess this effect was contact profilometry, which is widely used for this purpose^{20,23,33,34,36}. For this methodology to be used, it is essential to keep the specimens moistened before and during analysis, as done in the present study, in order to avoid shrinkage of collagen fibrils, which could interfere with the results. The green tea reduced significantly dentin wear under erosive/abrasive conditions. Despite using a mechanical stylus, which is expected to cave into the organic material to some extent and give higher values than obtained with an optical device⁹, the amount of wear (0.98 μm loss after 100 min of erosive challenge) obtained in the present study was low when compared to a previous study from our research group (3.6 μm loss after 28 min of erosive

challenge)²⁰. This can be explained by the different sensitivities of the equipments and the software used in both studies.

The protective effect of green tea could not be attributed to its fluoride content, since it was quite similar to that present in the negative control (water from the public supply). Additionally, its protective effect could not be attributed either to the temperature of the rinse, since the water rinse had the same temperature. One possible mechanism of action of green on the reduction of dentin erosion could be the inhibition of MMPs. If it is true, the main responsible for this effect may be the polyphenols. Green tea polyphenols, especially epigallocatechin-3-gallate (EGCG), were found to have potent and distinct inhibitory activity against MMPs in cell culture tests^{7,28}. EGCG seems to exhibit a hydrogen bonding and hydrophobic interaction with collagenases, which is responsible for the change in the secondary structure of collagenases and consequently for their inhibition²². The EGCG concentration in the green tea used in the present study was 0.185 mg/mL, which is quite above the reported IC₅₀ values for the inhibition of MMP-2 and MMP-9, which were 10 and 0.6 µg/mL of EGCG, respectively⁷.

The *in situ* model used in this study allowed the formation of an acquired salivary pellicle, which might play an important role during the erosive challenge¹³. Considering the possibility that green tea would inhibit MMP activity and would, in turn, allow the maintenance of an organic layer on the eroded dentin, this model could also allow the MMPs from dentin as well as from saliva to influence the dentin wear. It is known that the saliva-derived MMPs could be involved in the destruction of the organic matrix^{29,31} and that the MMP-8 present in saliva may influence negatively the remineralization of demineralized dentin²².

Erosion was produced by a cola drink, as it is one of the most widely consumed soft drinks and exhibits erosive potential^{19,25,27}. Erosion was performed by extraoral immersion in cola for 5 min, in order to produce the demineralization. It is also probable that the low pH of the drink has induced the activation of dentin-derived MMPs and saliva-derived MMPs, when the volunteers drank one sip of the beverage³¹. However, it is generally regarded that MMPs, although activated, cannot degrade the organic matrix of dentin at acidic pH³¹. In this protocol, the interval between each erosive challenge (>2 h), could allow for remineralization and also pH neutralization, which is essential for enhancing the degrading activity of the organic matrix by MMPs. However, it must be acknowledged that the protocol employed in the present study does not allow the conclusion that the effect of green tea on reducing the wear of dentin specimens was due to its inhibitory effects on MMPs activity, since we did not test this directly. Further studies focusing on the determination of the activity of MMPs in the organic layer overlying the eroded dentin after an erosive challenge could be instructive on this matter. The verification of the organic material on dentin surface by SEM could also bring additional useful information.

Tooth wear is a multifactorial condition caused by chemical (erosion) and mechanical (abrasion and attrition)

processes, since the softened zone by erosive challenge is more susceptible to mechanical forces, such as abrasion^{1,20}. Thus, studies regarding tooth wear have to consider both chemical and mechanical challenges to simulate the clinical situation. This aspect is especially important in eroded dentin, where the exposed organic matrix acts as a protective layer against further demineralization, and excessive toothbrushing could impair this matrix. However, a recent report suggested that the demineralized organic layer developed after erosive challenges was unaffected by brushing⁹. To simulate abrasive conditions which might occur during oral hygiene treatment, brushing abrasion of each specimen was performed for 30 s each cycle.

Regarding the abrasive wear of eroded dentin, the present results confirm previous studies showing that abrasion subsequently after an erosive attack can increase wear of acid-softened tooth surfaces^{2,23}. However, 30 min delay of abrasion was not able to reduce dentin wear compared to brushing immediately after erosion, which was also shown in previous studies^{1,14}. Thus, under clinical conditions, the delay of 30 min in toothbrushing after erosion might be ineffective on the reduction of dentin wear.

CONCLUSION

From the results of the present study, it may be concluded that the green tea reduces the dentin wear under erosive/abrasive conditions, but additional studies are required to confirm its mechanism of action on this process. If it is confirmed that the mechanism of action of green tea on the reduction of dentin wear occurs via MMP inhibition, this will open a new perspective for the prevention/treatment of these lesions, by the design of new products containing MMP inhibitors.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge FAPESP (grant #07/04209-0) for financial support and Prof. Dr. Rafael Mondelli for the use of the profilometer.

REFERENCES

- 1- 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.
- 2- Attin T, Zirkel C, Hellwig E. Brushing abrasion of eroded dentin after application of sodium fluoride solutions. *Caries Res.* 1998;32(5):344-50.
- 3- Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 19):3719-27.
- 4- Carrilho MR, Geraldini S, Tay F, Goes MF, Carvalho RM, Tjaderhane L, et al. *In vivo* preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res.* 2007;86(6):529-33.

KATO MT, MAGALHÃES AC, RIOS D, HANNAS AR, ATTIN T, BUZALAF MA R

- 5- Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res*. 2006;85(1):22-32.
- 6- Chow S, Cai Y, Hakim IA, Crowell JA, Shahi F, Brooks CA, et al. Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res*. 2003;9:3312-9.
- 7- Demeule M, Brossard M, Page M, Gingras D, Beliveau R. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1478(1):51-60.
- 8- Ganss C, Klimek J, Starck C. Quantitative analysis of the impact of the organic matrix on the fluoride effect on erosion progression in human dentine using longitudinal microradiography. *Arch Oral Biol*. 2004;49(11):931-5.
- 9- Ganss C, Schlueter N, Hardt M, von Hinckeldey J, Klimek J. Effects of toothbrushing on eroded dentine. *Eur J Oral Sci*. 2007;115(5):390-6.
- 10- Garbisa S, Sartor L, Biggin S, Salvato B, Benelli R, Albini A. Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. *Cancer*. 2001;91(4):822-32.
- 11- Gregg T, Mace S, West NX, Addy M. A study in vitro of the abrasive effect of the tongue on enamel and dentine softened by acid erosion. *Caries Res*. 2004;38(6):557-60.
- 12- 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.
- 13- Hara AT, Ando M, Gonzalez-Cabezas C, Cury JA, Serra MC, Zero DT. Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ. *J Dent Res*. 2006;85(7):612-6.
- 14- Hara AT, Turssi CP, Teixeira EC, Serra MC, Cury JA. Abrasive wear on eroded root dentine after different periods of exposure to saliva in situ. *Eur J Oral Sci*. 2003;111(5):423-7.
- 15- Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res*. 2005;84(8):741-6.
- 16- Kinney JH, Balooch M, Haupt DL Jr, Marshall SJ, Marshall GW Jr. Mineral distribution and dimensional changes in human dentin during demineralization. *J Dent Res*. 1995;74(5):1179-84.
- 17- Kleter GA, Damen JJ, Everts V, Nichof 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.
- 18- 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.
- 19- Magalhães AC, Rios D, Delbem AC, Buzalaf MA, Machado MA. Influence of fluoride dentifrice on brushing abrasion of eroded human enamel: an in situ/ex vivo study. *Caries Res*. 2007;41(1):77-9.
- 20- Magalhães AC, Rios D, Moino AL, Wiegand A, Attin T, Buzalaf MA. Effect of different concentrations of fluoride in dentifrices on dentin erosion subjected or not to abrasion in situ/ex vivo. *Caries Res*. 2008;42(2):112-6.
- 21- Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GA, Papa S, Mazzotti G, et al. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res*. 2007;86(5):436-40.
- 22- 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.
- 23- Ponduri S, Macdonald E, Addy M. A study in vitro of the combined effects of soft drinks and tooth brushing with fluoride toothpaste on the wear of dentine. *Int J Dent Hyg*. 2005;3(1):7-12.
- 24- Ramires I, Maia LP, Rigolizzo dos Santos D, Lauris JR, Buzalaf MA. [External control over the fluoridation of the public water supply in Bauru, SP, Brazil]. *Rev Saude Pública*. 2006;40(5):883-9.
- 25- Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Delbem AC, Machado MA, Silva SM, et al. Effect of salivary stimulation on erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: an in situ/ex vivo study. *Caries Res*. 2006;40(3):218-23.
- 26- Saito ST, Welzel A, Suyenaga ES, Bueno F. A method for fast determination of epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), catechin (C) and caffeine (CAF) in green tea using HPLC. *Ciência Tecnol Aliment*. 2006;26(2):394-400.
- 27- Sales-Peres SH, Pessan JP, Buzalaf MA. Effect of an iron mouthrinse on enamel and dentine erosion subjected or not to abrasion: an in situ/ex vivo study. *Arch Oral Biol*. 2007;52(2):128-2.
- 28- Sartor L, Pezzato E, Dell'Aica I, Caniato R, Biggin S, Garbisa S. Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(2):229-37.
- 29- Strijp AJ van, Jansen DC, DeGroot J, ten Cate JM, Everts V. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. *Caries Res*. 2003;37(1):58-65.
- 30- Sulkala M, Tervahartala 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.
- 31- 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.
- 32- West NX. Dentine hypersensitivity. *Monogr Oral Sci*. 2006;20:173-89.
- 33- Wiegand A, Eger S, Attin T. Toothbrushing before or after an acidic challenge to minimize tooth wear? An in situ/ex vivo study. *Am J Dent*. 2008;21(1):13-6.
- 34- Wiegand A, Gutsch M, Attin T. Effect of olive oil and an olive-oil-containing fluoridated mouthrinse on enamel and dentin erosion in vitro. *Acta Odontol Scand*. 2007;65(6):357-61.
- 35- Wiegand A, Laabs KA, Gressmann G, Roos M, Magalhães AC, Attin T. Protection of short-time enamel erosion by different tetrafluoride compounds. *Arch Oral Biol*. 2008;53(6):497-502.
- 36- Wiegand A, Stock A, Attin R, Werner C, Attin T. Impact of the acid flow rate on dentin erosion. *J Dent*. 2007;35(1):21-7.

ANEXO G – Artigo publicado na Caries Research referente ao Subprojeto 3

Original Paper

Caries Research

Caries Res 2010;44:309–316
DOI: [10.1159/000315932](https://doi.org/10.1159/000315932)

Received: February 25, 2010
Accepted after revision: April 15, 2010
Published online: June 10, 2010

Effect of Iron on Matrix Metalloproteinase Inhibition and on the Prevention of Dentine Erosion

M.T. Kato^a A.L. Leite^a A.R. Hannas^a R.C. Oliveira^a J.C. Pereira^b
L. Tjäderhane^c M.A.R. Buzalaf^a

Departments of ^aBiological Sciences and ^bOperative Dentistry, Endodontics and Dental Materials, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, Brazil; ^cInstitute of Dentistry, University of Oulu, and Oulu University Hospital, Oulu, Finland

Key Words

Dental erosion · Dentine · Iron · Matrix metalloproteinase

Abstract

It is known that some metal salts can inhibit matrix metalloproteinase (MMP) activity, but the effect of iron has not been tested yet. On the other hand, it has recently been suggested that MMP inhibition might influence dentine erosion. Based on this, the aims of this study were: (1) to test in vitro the effect of FeSO₄ on MMP-2 and -9 activity, and (2) to evaluate in situ the effect of FeSO₄ gel on dentine erosion. MMP-2 and -9 activities were analysed zymographically in buffers containing FeSO₄ in concentrations ranging between 0.05 and 1.5 mmol/l or not. Volunteers (n = 10) wore devices containing bovine dentine blocks (n = 60) previously treated with the following gel treatments: FeSO₄ (1 mmol/l FeSO₄), F (NaF 1.23%; positive control) and placebo (negative control). The gels were applied once and removed after 1 min. Erosion was performed extraorally with Coca-Cola 4 times per day for 5 min over 5 days. Dentine wear was evaluated by profilometry. The data were analysed by Kruskal-Wallis and Dunn's tests (p < 0.05). FeSO₄ inhibited both MMP-2 (IC₅₀ = 0.75 mmol/l) and MMP-9 (IC₅₀ = 0.50 mmol/l) activities. In the in

situ experiment, the mean wear (± SD) found for the F gel (0.79 ± 0.08 μm) was significantly reduced in more than 50% when compared to the placebo gel (1.77 ± 0.33 μm), but the FeSO₄ gel completely inhibited the wear (0.05 ± 0.02 μm). Since FeSO₄ was able to inhibit MMP in vitro, it is possible that the prevention of dentine wear by the FeSO₄ gel in situ might be due to MMP inhibition, which should be investigated in further studies.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

It has been shown that a rinse with a 10 mmol/l ferrous sulphate (FeSO₄) solution after an erosive attack can significantly reduce dentine wear [Sales-Peres et al., 2007]. However, the mechanism of action of iron for inhibiting dentine erosion has not been investigated so far.

Dentine-erosive demineralisation results in the exposure of an outer layer of fully demineralised organic matrix followed by a partly demineralised zone until the sound inner dentine is reached [Kinney et al., 1995]. Degradation of the dentine matrix occurs after it has become accessible by the removal of mineral, i.e. the dentine matrix cannot be degraded unless it is demineralised [Kleter et al., 1994]. Removal of the completely demineralised

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2010 S. Karger AG, Basel
0008-6568/10/0443-0309\$26.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/cre

Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry
University of São Paulo, Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75
Bauru, SP 17012-901 (Brazil)
Tel. +55 14 3235 8346, Fax +55 14 3227 1486, E-Mail mbuzalaf@fob.usp.br

collagen layer by collagenase results in an increased mineral loss in demineralised bovine root dentine [Kleter et al., 1994].

The significant influence of the collagen layer on dentine wear may be associated with the effect of inherent matrix metalloproteinases (MMPs) present in dentine [Martin-De Las Heras et al., 2000; Sulkala et al., 2007] and saliva [Ingman et al., 1996]. MMPs, especially MMP-2, -8 and -9, are able to degrade dentine organic matrix [Tjäderhane et al., 1998; Sulkala et al., 2007; Mazzoni et al., 2009], and their activation seems to be important for the progression of dentine caries [Sulkala et al., 2001] since they have a crucial role in the collagen breakdown in caries lesions [Tjäderhane et al., 1998]. Recently, it has been reported that MMP inhibitors such as chlorhexidine and compounds present in green tea when included in mouthrinses [Kato et al., 2009; Magalhães et al., 2009] or gels [Kato et al., 2010] can reduce dentine wear, which opens a new perspective on the prevention of erosion.

Additionally, MMPs are known to be inhibited by zinc and other divalent metals [Souza et al., 2000] and by dispersed-phase amalgam-conditioned buffers [Souza et al., 2001]. The same rationale could be used for FeSO₄. Although FeSO₄ has been shown to exert a protective effect on human enamel and dentine [Sales-Peres et al., 2007] and on bovine enamel [Kato et al., 2007a, b] submitted to erosive challenges, its effect on MMP activity has not been tested yet. We speculated that the incubation of MMPs in FeSO₄ buffer would lead to MMP inhibition. This, in turn, could prevent denatured collagen from being digested, resulting in a protective layer in subsequent erosive challenges. Thus, the null hypotheses tested were: (a) there are no differences in the activities of MMP-2 and -9 in the presence of FeSO₄ and, as a consequence, (b) a gel containing FeSO₄ is not able to reduce the wear of dentine submitted to an erosive challenge in situ/ex vivo.

Material and Methods

Zymography Analysis

In order to assess the effect of FeSO₄ on MMP-2 and -9 activities, human recombinant MMP-2 and -9 (PF037 and PF038; Calbiochem, EMD, Biosciences Inc., La Jolla, Calif., USA) were loaded on 11%-gelatin-containing polyacrylamide gels. After electrophoresis, the gels were incubated for 30 min in buffer I (50 mmol/l Tris-HCl; 2.5% Tween 80; 0.02% w/v NaN₃; pH 7.5 at 22°C) and buffer II (50 mmol/l Tris-HCl; 2.5% Tween 80; 0.02% w/v NaN₃; 1 µmol/l ZnCl₂; 5 mmol/l CaCl₂). Next, the gels were cut into strips of 2 cm, and each strip was incubated at 37°C for 18 h in

buffer III (50 mmol/l Tris-HCl; 5 mmol/l CaCl₂; 1 µmol/l ZnCl₂; 0.02% w/v NaN₃) containing FeSO₄ at 0.05, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0 or 1.5 mmol/l. After incubation, the gels were extensively washed in buffer I, to remove soluble metal ions, and reincubated in buffer III at 37°C for 18 h. In order to quantify the relative inhibition of MMPs by FeSO₄, electrophoretic bands were scanned and analysed by the Kodak Molecular Imaging software version 4.5 (Kodak, Rochester, N.Y., USA). In order to confirm if the enzymes under study were MMPs, a representative gel loaded with MMPs was incubated in 3 mmol/l 1,10-phenanthroline, which is a specific MMP inhibitor. The percent inhibition of enzyme activity was plotted against the metal concentration. The FeSO₄ inhibitory effect was determined from the metal concentration that inhibited 50% of the enzyme activity (IC₅₀). The percentage inhibition of FeSO₄ was determined by comparing the activity of MMPs with control reactions. The gels were run in triplicate.

In situ Phase

Ethical Aspects and Volunteer Selection

This study was approved by the Institutional Review Board of Bauru Dental School, University of São Paulo, Brazil (process 119/2008) and volunteers participated after signing informed consent. Ten healthy adult volunteers (aged 20–30 years) residing in a fluoridated area (0.6–0.8 mg F/l) [Ramires et al., 2006] who fulfilled the inclusion criteria described below took part in this study. They presented normal salivary parameters such as adequate stimulated and unstimulated salivary flows (>1.0 and 0.50 ml/min, respectively) and salivary pH (≥6.8). Clinically, the subjects did not present erosive lesions, untreated carious cavities or periodontitis. The number of volunteers in the present study was defined according to previous studies [Rios et al., 2006; Magalhães et al., 2007; Wiegand et al., 2008].

Sample Preparation

Sixty coronal dentine blocks (4 × 4 × 3 mm) were prepared from freshly extracted bovine incisors which had been stored in 0.1% thymol solution (pH 7.0) at 4°C for a maximum of 1 week before use. One block was obtained from the labial surface of each crown. Enamel was completely removed, dentine ground flat with water-cooled carborundum discs and polished with felt paper soaked with 1 µm diamond spray (Extect Corp, Enfield, Conn., USA). The specimens were ultrasonically cleaned (2 × 10 min) in order to remove the smear layer.

In order to maintain reference surfaces for lesion depth determination by profilometry, 2 layers of nail varnish were applied on half of the surface of each sample. The specimens were then randomly allocated to the groups.

Intraoral Phase and Treatment

The participants started wearing the acrylic palatal appliances 12 h before the erosive challenges, allowing salivary pellicle to form [Hara et al., 2006]. In each appliance, 6 dentine blocks (2 for each treatment) were disposed in 3 rows in the regions corresponding to premolars and molars. The position of the blocks from the different study groups in the appliance was randomised in order to avoid site-specific protective effects of saliva. The blocks were treated extraorally only once with a thin layer of each gel (placebo, fluoride and iron-containing gel) using a micro-brush for 1 min, and then carefully removed with the aid of a cotton slab, taking care to avoid touching the dentine surface. No

Table 1. Wear of dentine blocks subjected to erosion and treated with fluoride, FeSO₄ and placebo gel (μm)

	Placebo	NaF	FeSO ₄
Dentine wear	1.77 (± 0.33) ^a	0.79 (± 0.08) ^b	0.05 (± 0.02) ^c

Values denote means with SD in parentheses. Distinct lower-case letters indicate significant differences between the treatments (Kruskal-Wallis and Dunn's tests, $p < 0.0001$; $n = 10$).

residues of gel were visible after removal, but the dentine surface remained wet. All gel formulations presented essentially the same basic composition: Natrosol (hydroxyethylcellulose), propylene glycol, methylparaben, imidazolidinyl urea and deionised water (Biopharmacy, Bauru, Brazil). Their pH was around 7.0. They were assigned to the following groups, according to the active component: F (1.23% NaF; positive control), Fe (1 mmol/l FeSO₄·7H₂O) and P (placebo gel, no active component; negative control). The gels had the same appearance and were placed in similar vials in order to allow a double-blind design.

In the intraoral phase, the volunteers were instructed to start the erosive challenges 6 h after the gel treatment, and on the following 5 days, erosive challenges were performed extraorally 4 times a day at predetermined times (8, 12, 16 and 20 h) after the main meals. For erosion of the dentine samples, the participants were instructed to remove the appliance and immerse it into a cup containing 150 ml of regular Coke (pH 2.6; Coca-Cola Company SpA, Porto Real, Brazil) for 5 min at room temperature. After the erosive challenge, the volunteers took one sip of the beverage and the appliances were reinserted into the mouth.

The volunteers received instructions to wear the appliances continuously for 24 h and to remove them only during the main meals (4 times/day), when the appliance should be stored in wet gauze. Seven days prior to the beginning and throughout the experimental phase, the participants brushed their teeth with a non-fluoridated dentifrice (Crest; Procter & Gamble, Cincinnati, Ohio, USA). They were also instructed to avoid touching the samples with their tongue in order to avoid abrasion [Gregg et al., 2004]. The volunteers received oral and written information to refrain from using any fluoridated or antibacterial products.

Wear Analysis

After the *in situ* phase, the samples were removed from the appliances and kept moist up to the wear analysis in order to avoid shrinkage of the dentine organic material. The nail varnish over the reference surfaces was carefully removed using a scalpel blade, taking care to avoid touching the dentine surface. Dentine wear was determined in relation to the reference surfaces by contact profilometry (Hommel Tester T 1000; Hommelwerke, Villingen-Schwenningen, Germany). The diamond stylus moved from the reference to the exposed area (3.0 mm). The differences in height between reference and exposed areas were quantified in microns. Five readings were performed in the centre of each specimen and averaged. The final figure for each volunteer and treatment was obtained after averaging the results obtained for each of the 2

blocks in order that the volunteer would be considered as the experimental unit.

Scanning Electron Microscopy

Two dentine blocks representative of each group were fixated in Karnovsky's fixative for 24 h and extensively washed in 0.1 mol/l cacodylate buffer. The specimens were dried at room temperature for 24 h in desiccators and lightly gold sputtered. Samples were analyzed by scanning electron microscopy (Type XL30; Philips Electron Optics, Eindhoven, The Netherlands). The acceleration voltage was set to 25 kV. The magnifications used were ×70, ×500 and ×2,000.

Statistical Analysis

The assumptions of equality of variances and normal distribution of errors were checked, using the Bartlett and Kolmogorov-Smirnov tests, respectively. The data passed normality test, but the differences among the SD were significant even after logarithmic transformation. Thus, they were analysed by Kruskal-Wallis and Dunn's post hoc test. The significance level was set at 5%. The software GraphPad InStat, version 3.0 for Windows, GraphPad Software (San Diego, Calif., USA) was used.

Results

Zymography

The incubation in buffer containing FeSO₄ with different concentrations caused a decrease in the activities of gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) of both pro- and active MMP-2 and -9 forms. The buffer containing FeSO₄ at 1.5 mmol/l completely inhibited both MMP-2 (IC₅₀ = 0.75 mmol/l) and MMP-9 (IC₅₀ = 0.50 mmol/l) activity, as shown in figure 1a by the absence of white bands, and in figure 1b and c by the percentage of FeSO₄ inhibition.

Complete inhibition by 3 mmol/l 1,10-phenanthroline confirmed the MMP nature of the gelatinolytic activities observed by zymography (data not shown).

In situ/ex vivo Phase

Table 1 shows the wear (means ± SD). The F gel (positive control) significantly reduced the dentine wear by more than 50% (0.79 ± 0.08 μm) when compared to the negative control (placebo gel: 1.77 ± 0.33 μm; $p < 0.05$). The FeSO₄ gel completely inhibited the wear (0.05 ± 0.02 μm) and was significantly different from the other groups ($p < 0.001$).

The observation of eroded areas (fig. 2) indicates that F and FeSO₄ gels might have some physical effect by tubule occlusion of the dentine surface (fig. 2d, f), which was not detected in the placebo group (fig. 2b).

Fig. 1. a Effect of FeSO₄ on gelatinolytic enzyme activities expressed in kD. Lane 1: molecular weight marker (MWM); lanes 2 and 3: human recombinant MMP-2 and -9 controls, respectively; lanes 4–15: gel strips incubated in 0.05, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0 and 1.5 mmol/l FeSO₄ buffer, respectively. After incubation with FeSO₄, the gelatin-degrading activity of pro- (Pro) and active (Act) forms of MMP-2 or -9 decreased significantly and in a concentration-dependent manner (lanes 4–15). **b** Dose response of active human recombinant MMP-2 and -9 inhibition by incubation in buffer containing ferrous sulphate, as observed by gelatin

zymography. The scale represents the mean ($\pm$ SD) inhibition percentage when compared to untreated controls, when measured as electrophoretic bands of scanned gels ($n = 3$). FeSO₄ concentrations in buffer are shown below bars. **c** Dose response of Pro human recombinant MMP-2 and -9 inhibition by incubation in buffer containing ferrous sulphate, as observed by gelatin zymography. The scale represents the mean ($\pm$ SD) inhibition percentage when compared to untreated controls, when measured as electrophoretic bands of scanned gels ($n = 3$). FeSO₄ concentrations in buffer are shown below bars.

Fig. 2. Representative scanning electron micrographs of dental surface in different groups of control specimens (left) and of eroded specimens (right). $\times 2,000$. **a, b** Placebo (negative control). **c, d** NaF-treated (positive control). **e, f** FeSO_4 . In the eroded placebo specimen (**b**), most of the dentinal tubules are exposed. The specimens treated with NaF (**d**) and especially with FeSO_4 gel (**f**) clearly demonstrate tubule occlusion.

Discussion

To our knowledge, this is the first study to show an inhibition of MMP-2 and -9 activities by low FeSO_4 concentrations. At 1.5 mmol/l, the activities of MMP-2 and -9 were fully inhibited. Increased MMP activities are associated with a variety of oral diseases [Hannas et al., 2007], which makes their inhibition by potent and selective synthetic inhibitors a desirable goal. Because of the crucial role of zinc in the activity of the enzyme, the design of inhibitors is usually based upon a so-called 'zinc-binding group'.

The mechanism of enzyme inactivation by metals is not completely understood. It is assumed that metal ions bind to specific sites, causing conformational changes that inactivate the catalytic function of enzymes. Once the enzyme is in its denatured form, when incubated in FeSO_4 buffer there may have happened a metal exchange with Ca^{2+} and Zn^{2+} ions present in the MMP structure (MMP-2 has 2 Ca^{2+} and Zn^{2+} ions, and MMP-9 has 3 Ca^{2+} and 2 Zn^{2+} ions) [Maskos, 2005]. These ions are more reactive than Fe^{2+} from the buffer with FeSO_4 . Thus, the enzyme would have its structure altered due to the absence of Ca^{2+} and Zn^{2+} ions (reaction: $\text{FeSO}_4 + \text{Ca}^{2+}$ and/or $\text{Zn}^{2+} = \text{CaSO}_4$ and/or $\text{ZnSO}_4 + \text{Fe}$). The study by Souza et al.

Fig. 3. Proposed mechanism of action of FeSO_4 on dentine erosion. Spheres: inactive MMP. Asterisk shapes: active MMP. **a** Sound dentine. After the erosive challenge, the dentine surface is demineralised (**b**), causing the exposure of the collagen fibrils (**c**). When unprotected by FeSO_4 , the collagen fibrils are exposed by the action of the acid of the soft drink and the collagen fibrils hydrolysed (**c, d**). The application of an iron gel for 1 min may have allowed the formation of a surface deposit (probably ferric phos-

phate) on dentine, which may have acted as a mechanical barrier to the subsequent erosive challenges (**e**). By the inhibition of dentine-bound and/or salivary MMPs by the iron ions during the subsequent erosive challenges (**f**), the protective layer might have prevented these enzymes from hydrolysing the collagen fibrils exposed by the action of the acid of the soft drink, thus preserving the collagen layer (**g**), resulting in a significant decrease in erosive wear.

[2000] showed that a ZnSO_4 solution could inhibit MMPs (mostly MMP-2). These same authors demonstrated that CuSO_4 and HgSO_4 caused less inhibition since these compounds are constituted by metals (Cu and Hg linked to SO_4) which are less reactive than Ca^{2+} . The activities of MMP-2 and MMP-9 were fully inhibited by 3 mmol/l ZnSO_4 [Souza et al., 2000] and also by metal ions present in amalgam restorations [Souza et al., 2001]. The reactivity series of metals determines the reactivity of metals, from the highest to the lowest. Metals which are more reactive than hydrogen (K, Na, Ca, Mg, Al, Zn, Fe, Sn and Pb) can displace H from water or dilute acids. Metals which are less reactive than hydrogen (Cu, Hg, Ag) do not replace H in a reaction with water or dilute acids.

The wear observed for the placebo groups in the in situ part of the study was within the same range that had been

observed in previous studies using similar erosive protocols and the same profilometer that were employed in this study [Kato et al., 2009; Magalhães et al., 2009]. This low degree of wear could be explained by the fact that the erosive mineral loss in dentine is relatively high at the beginning of the erosion process but continues at somewhat lower dissolution rates [Ganss et al., 2001, 2004], the collagen layer serving as a diffusion barrier, which has been observed to occur in root caries as well [Ogaard et al., 1988]. It has also been suggested that this organic layer may also exhibit buffering properties. During an erosive challenge from the outer surface, it may adsorb H^+ ions, thus preventing the inner dentine from reaching low pH values [Klont and ten Cate, 1991; Kleter et al., 1994].

In the second part of the present study, the effect of a gel containing 1 mmol/l FeSO_4 on the reduction of den-

tine wear was assessed. An iron rinse had previously been shown to reduce dentine erosion *in situ* [Sales-Peres et al., 2007], but the rinse had a high iron concentration (10 mmol/l FeSO_4) and was used repeatedly after each erosive challenge, which caused staining of the dentine blocks and also of the volunteers' teeth. This drawback was not observed in the present study since the FeSO_4 concentration was low (1 mmol/l) and the gel was applied only once. Despite this single application, the iron gel was able to completely inhibit the wear of the dentine blocks submitted to a high erosive challenge.

The mechanism of action of the FeSO_4 gel for the reduction of dentine erosion was not directly evaluated in this study. However, it is possible that FeSO_4 might have had some action on the inhibition of dentine MMPs. Since, in the *in situ* experiment, the bovine teeth were used within one week after extraction, the activity of MMPs was preserved, as has previously been shown [van Strijp et al., 2003]. Previous studies testing MMP inhibitors (chlorhexidine and green tea) delivered as mouth-rinse found a protective effect against dentine erosion [Kato et al., 2009; Magalhães et al., 2009], but the reduction in wear was around 40–50% only. The potent wear inhibition observed in the present study might be related to the vehicle chosen to deliver FeSO_4 to the dentine. The use of a gel allowed an increase in contact time with dentine, which might possibly have promoted a more effective and long-lasting MMP inhibition. Another possible mechanism of action of the FeSO_4 might have been the formation of a precipitate (probably ferric phosphate) [Torell, 1988] on the dentine and also in the dentinal tubules (fig. 2f), which might have acted as a mechanical barrier to the subsequent erosive challenges. Tubular occlusion was also visible with the F gel (fig. 2d). The better performance of the FeSO_4 gel when compared to the F gel might be due to the lower acid dissolution rate of the precipitates originating from the FeSO_4 gel when compared to the CaF_2 precipitates deriving from the F gel.

A probable mechanism of action of the FeSO_4 gel for the reduction of dentine wear was proposed and is de-

picted in figure 3. The application of an iron gel for 1 min may have allowed the formation of a surface deposit on dentine, which may have acted as a mechanical barrier to the subsequent erosive challenges (fig. 3e). Via the inhibition of dentine-bound and/or salivary MMPs by the iron ions present in the deposit (fig. 3f), the protective layer might have prevented these enzymes from hydrolysing the collagen fibrils exposed by the action of the acid of the soft drink, thus preserving the collagen layer (fig. 3g), resulting in a significant decrease in erosive wear. The preservation of this collagen layer has been reported to slow down the rate of progression of erosion [Klont and ten Cate, 1991; Ganss et al., 2001, 2004]. The ability of FeSO_4 to inhibit MMPs could help to explain the differential results of FeSO_4 inhibition of erosive changes in enamel and dentine properties in earlier experiments. FeSO_4 results in a significant improvement in surface microhardness, but in a non-significant (7.5%) reduction in wear after erosive challenges in enamel, while in dentine, the reduction in microhardness is minor, but the reduction in wear is marked (36.3%; $p < 0.05$) [Sales-Peres et al., 2007]. Since enamel does not contain organic matrix, the preservation of dentine matrix by MMP inhibition seems to be a plausible explanation for the observed differences.

Based upon the results of the present study, both null hypotheses formulated were rejected. The use of an iron gel seems to be a promising preventive measure against dentine erosion. Additional studies are being conducted in order to determine for how long the protective effect of a single iron gel application lasts, so that a clinical protocol of application can be established.

Acknowledgement

This study was supported by grants from the FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, 07/08389-3 and 07/04209-0), Brazil.

References

- ▶ Ganss C, Klimek J, Schaffer U, Spall T: Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine *in vitro*. *Caries Res* 2001;35:325–330.
- ▶ Ganss C, Klimek J, Starck C: Quantitative analysis of the impact of the organic matrix on the fluoride effect on erosion progression in human dentine using longitudinal microradiography. *Arch Oral Biol* 2004;49:931–935.
- ▶ Gregg T, Mace S, West NX, Addy M: A study *in vitro* of the abrasive effect of the tongue on enamel and dentine softened by acid erosion. *Caries Res* 2004;38:557–560.
- ▶ Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L: The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 2007;65:1–13.

- Hara AT, Ando M, González-Cabezas C, Cury JA, Serra MC, Zero DT: Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ. *J Dent Res* 2006;85:612–616.
- Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, Konttinen YT, Sorsa T: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996;23:1127–1132.
- Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MA: Gels containing MMP inhibitors prevent dentin erosion in situ. *J Dent Res* 2010;89:468–472.
- Kato MT, Magalhães AC, Rios D, Attin T, Buzalaf MA: The protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion: an in situ study. *J Appl Oral Sci* 2009;17:560–564.
- Kato MT, Maria AG, Sales-Peres SH, Buzalaf MA: Effect of iron on the dissolution of bovine enamel powder in vitro by carbonated beverages. *Arch Oral Biol* 2007a;52:614–617.
- Kato MT, Sales-Peres SH, Buzalaf MA: Effect of iron on acid demineralisation of bovine enamel blocks by a soft drink. *Arch Oral Biol* 2007b;52:1109–1111.
- Kinney JH, Balooch M, Haupt DL Jr, Marshall SJ, Marshall GW Jr: Mineral distribution and dimensional changes in human dentin during demineralization. *J Dent Res* 1995;74:1179–1184.
- 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;73:1523–1529.
- Klont B, ten Cate JM: Remineralization of bovine incisor root lesions in vitro: the role of the collagenous matrix. *Caries Res* 1991;25:39–45.
- Magalhães AC, Rios D, Delbem AC, Buzalaf MA, Machado MA: Influence of fluoride dentifrice on brushing abrasion of eroded human enamel: an in situ/ex vivo study. *Caries Res* 2007;41:77–79.
- Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MA: Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. *J Dent* 2009;37:994–998.
- Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM: The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol* 2000;45:757–765.
- Maskos K: Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie* 2005;87:249–263.
- Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri A Jr, Carrilho M, Tjäderhane L, di Lenarda R, Breschi L: Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis. *J Biomed Mater Res A* 2009;88:697–703.
- Ogaard B, Rolla G, Arends J: In vivo progress of enamel and root surface lesions under plaque as a function of time. *Caries Res* 1988;22:302–305.
- Ramires I, Maia LP, Rigolizzo Ddos S, Lauris JR, Buzalaf MA: External control over the fluoridation of the public water supply in Bauru, SP, Brazil. *Rev Saude Publica* 2006;40:883–889.
- Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Delbem AC, Machado MA, Silva SM, Buzalaf MA: Effect of salivary stimulation on erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: an in situ/ex vivo study. *Caries Res* 2006;40:218–223.
- Sales-Peres SH, Pessan JP, Buzalaf MA: Effect of an iron mouthrinse on enamel and dentine erosion subjected or not to abrasion: an in situ/ex vivo study. *Arch Oral Biol* 2007;52:128–132.
- Souza AP, Gerlach RF, Line SR: Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dent Mater* 2000;16:103–108.
- Souza AP, Gerlach RF, Line SR: Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam. *Biomaterials* 2001;22:2025–2030.
- Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L: Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol* 2007;52:121–127.
- Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, Tjäderhane L: The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *J Dent Res* 2001;80:1545–1549.
- Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T: The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res* 1998;77:1622–1629.
- Torell P: Iron and dental caries. *Swed Dent J* 1988;12:113–124.
- van Strijp AJ, Jansen DC, DeGroot J, ten Cate JM, Everts V: Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. *Caries Res* 2003;37:58–65.
- Wiegand A, Laabs KA, Gressmann G, Roos M, Magalhães AC, Attin T: Protection of short-time enamel erosion by different tetrafluoride compounds. *Arch Oral Biol* 2008;53:497–502.

ANEXO H – Artigo publicado na Journal of Dental Research referente ao Subprojeto 3

Journal of Dental Research

<http://jdr.sagepub.com>

Gels Containing MMP Inhibitors Prevent Dental Erosion in situ

M.T. Kato, A.L. Leite, A.R. Hannas and M.A.R. Buzalaf
J DENT RES 2010; 89; 468 originally published online Mar 3, 2010;
DOI: 10.1177/0022034510363248

The online version of this article can be found at:
<http://jdr.sagepub.com/cgi/content/abstract/89/5/468>

Published by:

<http://www.sagepublications.com>

On behalf of:

International and American Associations for Dental Research

Additional services and information for *Journal of Dental Research* can be found at:

Email Alerts: <http://jdr.sagepub.com/cgi/alerts>

Subscriptions: <http://jdr.sagepub.com/subscriptions>

Reprints: <http://www.sagepub.com/journalsReprints.nav>

Permissions: <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>

RESEARCH REPORTS

Clinical

M.T. Kato, A.L. Leite, A.R. Hannas, and
M.A.R. Buzalaf*

Bauru Dental School, University of São Paulo, Department of Biological Sciences, Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, Bauru-SP 17012-901, Brazil; *corresponding author, mbuzalaf@fob.usp.br

J Dent Res 89(5):468-472, 2010

ABSTRACT

Matrix metalloproteinase (MMP) inhibition has been shown to reduce dentin caries progression, but its role in dental erosion has not yet been assessed. This study tested the hypothesis that gels containing MMP inhibitors (epigallocatechin gallate-EGCG and chlorhexidine) can prevent dental erosion. Volunteers ($n = 10$) wore palatal devices containing bovine dentin blocks ($n = 10$ /group) treated for 1 min with EGCG at 10 (EGCG10) or 400 μ M (EGCG400), chlorhexidine at 0.012%, F at 1.23% (NaF), and no vehicle (placebo). Erosion was performed with Coca-Cola® (5 min) 4X/day during 5 days. The wear, assessed by profilometry (mean $\pm$ SD, μ m), was significantly reduced by the gels containing MMP inhibitors (0.05 ± 0.02^a , 0.04 ± 0.02^a , and 0.05 ± 0.02^a for EGCG10, EGCG400, and chlorhexidine, respectively) when compared with NaF (0.79 ± 0.35^b) and placebo gels (1.77 ± 0.35^b) (Friedman and Dunn's tests, $p < 0.01$). The use of gels delivering MMP inhibitors was shown to prevent erosion and opens a new perspective for protection against dental erosion.

KEY WORDS: dentin, chlorhexidine, epigallocatechin gallate, MMP, dental erosion.

DOI: 10.1177/0022034510363248

Received February 13, 2009; Last revision October 6, 2009;
Accepted December 16, 2009

Gels Containing MMP Inhibitors Prevent Dental Erosion *in situ*

INTRODUCTION

Dental erosion is defined as a chemical removal of mineral from the tooth structure without the involvement of bacteria (Imfeld, 1996). In the case of dental erosion, when dentin is exposed to acids, the minerals from the peritubular/inter-tubular dentin junction are initially released. In sequence, the peritubular dentin is lost, and the dentin tubules are widened (Meurman *et al.*, 1991). Finally, a superficial layer of demineralized collagenous matrix is detectable. It is conceivable that this superficial layer of collagenous matrix might protect the remaining demineralized dentin against mechanical forces such as toothbrush abrasion (Ganss *et al.*, 2007). The dentin demineralization rate decreases when the amount of degradable collagen increases thus the demineralized matrix has been suggested to hamper ionic diffusion into and out of the demineralizing area (Klont and ten Cate, 1991; Kleter *et al.*, 1994). However, the organic matrix can be degraded both mechanically and chemically, which may contribute to an enhanced progression of dentin wear (Ganss *et al.*, 2004, 2007; Hara *et al.*, 2005).

Chemically, the dentin organic matrix can be degraded by MMPs which mediate the break of practically all extracellular matrix (ECM) molecules, including native and denatured collagen (Visse and Nagase, 2003; Hannas *et al.*, 2007). MMP-8 has been found to be the major collagenase in human dentin (Sulkala *et al.*, 2007), but MMP-2 and MMP-9 have also been shown to be present in human dentin (Martin-De Las Heras *et al.*, 2000; Mazzoni *et al.*, 2009). Additionally, the activity of MMP-2 and MMP-9 has a crucial role in dentin collagen breakdown in caries lesions (Tjäderhane *et al.*, 1998). Two studies have shown that the addition of external collagenase is necessary for matrix degradation to occur in dentin caries experiments *in vitro* (Katz *et al.*, 1987; Kawasaki and Featherstone, 1997).

MMP inhibitors are being investigated as potential therapeutic agents in the treatment and prevention of several diseases, including oral diseases. Therefore, the use of MMP inhibitors has been tested in an attempt to solve many problems in the oral cavity. The use of chlorhexidine, an MMP inhibitor (Gendron *et al.*, 1999), has been suggested as a useful tool in the prevention of the degradation of incompletely resin-infiltrated collagen fibrils by MMPs in the hybrid layers, thus increasing the longevity of adhesive restorations (Hebling *et al.*, 2005; Carrilho *et al.*, 2007a,b). Green tea polyphenols, especially epigallocatechin-3-gallate (EGCG), were also found to have distinct inhibitory activity against MMPs (Demeule *et al.*, 2000; Garbisa *et al.*, 2001; Sartor *et al.*, 2002; Chaussain-Miller *et al.*, 2006) and in cell culture tests (Demeule *et al.*, 2000; Sartor *et al.*, 2002). EGCG seems to exhibit hydrogen bonding and hydrophobic interactions with collagenases, which are responsible for the change in the secondary structure of collagenases and, consequently, for their inhibition (Demeule *et al.*, 2000). Recently, an *in situ* study has shown that a green tea rinse was able to reduce erosive dentin wear (Kato *et al.*, 2009), but the isolated active compound in green tea (EGCG) has not yet been tested.

Based upon the rationale that (1) the progression of dentin caries is related to the activity of MMPs (Tjäderhane *et al.*, 1998), (2) chlorhexidine, an MMP inhibitor, can prevent the proteolytic degradation of incompletely infiltrated collagen fibrils in acid-etched dentin under hybrid layers (Hebling *et al.*, 2005; Carrilho *et al.*, 2007a,b), and (3) green tea, another well-known MMP inhibitor (Demeule *et al.*, 2000), can reduce dentin wear under erosive challenges (Kato *et al.*, 2009), this study tested the hypothesis that gels containing MMP inhibitors (EGCG and chlorhexidine) can prevent dental erosion.

MATERIALS & METHODS

Sample Preparation

Crown dentin blocks (100, 4 x 4 x 3 mm) were prepared from bovine incisors that had been stored in 0.1% thymol solution (pH 7.0) at 4°C. Sample preparation has been described elsewhere (Sales-Peres *et al.*, 2007). Samples were allocated to groups according to surface microhardness (Knoop diamond, 10 g, 5 sec, HMV-2000; Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) and stratified randomization. To maintain reference surfaces for lesion depth determination by profilometry, two layers of nail varnish were applied to half the surface of each sample. Individual acrylic palatal appliances with 5 palatal cavities were used for intra-oral exposure of the samples.

Ethical Aspects

This study was approved by the Institutional Review Board of the Bauru Dental School, University of São Paulo, Brazil (Process 119/2008), and volunteers participated after providing signed informed consent. Ten healthy adult volunteers (aged 20-30 yrs) residing in a fluoridated water area (0.6-0.8 mg F/L) fulfilled the inclusion criteria (Rios *et al.*, 2006).

Intra-oral Phase and Treatment

The participants wore the appliances 12 hrs before starting the erosive challenges, allowing a salivary pellicle to form (Hara *et al.*, 2006). The gels were then applied in a thin layer by means of a microbrush for 1 min and carefully removed with a cotton swab. All gel formulations presented essentially the same composition (hydroxyethylcellulose, propyleneglycol, methylparaben, Imidazolidinyl urea, and de-ionized water), except for the active vehicle: EGCG10 (10 µM EGCG), EGCG400 (400 µM EGCG), chlorhexidine (0.012% chlorhexidine), and F (1.23% NaF, positive control). The placebo gel had no active vehicle (negative control).

In the intra-oral phase, volunteers were instructed to start the erosive challenges 6 hrs after the gel treatment. On the following 5 days, erosive challenges were performed extra-orally 4 times *per day* at pre-determined times (8, 12, 16, and 20 hrs) after the main meals. For erosion of the dentin samples, the participants were instructed to remove the appliance and immerse it in a cup containing 150 mL of regular Coca-Cola (pH 2.6; Coca-Cola Company SpA, Porto Real, RJ, Brazil) for 5 min at room temperature. After the erosive challenge, volunteers

took one sip of the beverage and re-inserted the appliances into the mouth.

The volunteers were instructed to wear the appliances continuously for 24 hrs, but to remove them only during the main meals (4 times/day), when the appliance should be stored in wet gauze. Seven days prior to the beginning and throughout the experimental phase, participants brushed their teeth with a non-fluoridated dentifrice (Crest, Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA). They were also instructed to avoid touching the samples with their tongue, to avoid abrasion (Gregg *et al.*, 2004). The volunteers received oral and written information to refrain from using any fluoridated or antibacterial product.

Wear Analysis

After the *in situ* phase, the samples were removed from the appliances and kept moistened until the wear analysis, to avoid shrinkage of the dentin organic material. The nail varnish over the reference surfaces was carefully removed with a scalpel blade, with care taken to avoid touching of the dentin surface. The dentin wear was determined in relation to the reference surfaces by contact profilometry (Hommel Tester T 1000, Hommelwerke, VS, Schwenningen, Germany), as described previously (Sales-Peres *et al.*, 2007).

Scanning Electron Microscopy

Two dentin blocks representative of each group were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). They were immersed in Karnovsky's fixative for 24 hrs and extensively washed in 0.1 M cacodylate buffer. Specimens were fractured into 2 halves, to allow for the visualization of not only the sample surface, but also of a transverse section of the demineralized dentin and its organic matrix. They were then dried at room temperature for 24 hrs in desiccators and lightly gold-sputtered. Samples were analyzed in a SEM (Type XL30; Philips Electron Optics, Eindhoven, the Netherlands). The acceleration voltage was set to 25 kv. The magnifications used were -70-, -2,000-, and -8,000-fold.

Statistical Analysis

The assumptions of equality of variances and normal distribution of errors were checked for all the variables tested, by the Bartlett and Kolmogorov-Smirnov tests, respectively. Since the assumptions were not satisfied, Friedman and Dunn's *post hoc* tests were performed. The significance level was set at 1%. The software GraphPad Prism 4 version 4.0 for Windows, Graph Pad Software (San Diego, CA, USA) was used.

RESULTS

The results of the profilometric analysis (µm, mean ± SD) showed that the gels containing MMP inhibitors completely inhibited wear (0.05 ± 0.02 , 0.04 ± 0.02 , and 0.05 ± 0.02 µm for EGCG10, EGCG400, and chlorhexidine, respectively). The difference was significant when compared with the positive (NaF,

Figure 1. Mean wear (μm) of dentin blocks subjected to erosion and treated with EGCG10 (10 μM EGCG) or EGCG400 (400 μM EGCG), CHX (0.012% chlorhexidine), F (1.23% NaF, positive control) or P, placebo gel (no active vehicle, negative control). Distinct superscript letters indicate statistically significant differences among the treatments (Friedman and Dunn's tests, $p < 0.01$). $n = 10$ in each group. Bars indicate SD.

Figure 2. Representative scanning electron micrographs (SEM) of the dentinal interface between control and eroded specimen surfaces in the NaF-treated group at high-power magnification (4000x), showing a clearly visible interface (arrow). For the gels containing MMP inhibitors, it was not possible to clearly identify an interface between the control and eroded areas (data not shown).

$0.79 \pm 0.35 \mu\text{m}$) and negative control (placebo, $1.77 \pm 0.35 \mu\text{m}$) groups, which did not significantly differ from each other (Friedman and Dunn's tests, $p < 0.01$) (Fig. 1).

For the gels containing MMP inhibitors, it was not possible to clearly identify an interface between the control and eroded areas by SEM, due to the absence of wear (data not shown). This interface was clearly visible for NaF gel (Fig. 2). The observation of the surfaces of eroded areas (Fig. 3) indicated that MMP inhibitors might also have some physical effect by tubule occlusion of the dentin surface (Figs. 3d-3f), which was not detected in the placebo group (Fig. 3b).

DISCUSSION

Since the use of gels delivering MMP inhibitors (EGCG and chlorhexidine) to dentin did protect against erosion, the hypothesis of this study was accepted. A recent *in situ* study by our group has shown that green tea can reduce dentin wear under erosive challenges (Kato *et al.*, 2009). It was suggested that this effect could possibly be due to MMP inhibition by the presence of EGCG ($\sim 400 \mu\text{M}$), a well-known MMP inhibitor (Demeule *et al.*, 2000), in the tea. Thus, we decided to analyze the effect of the isolated active vehicle present in green tea (EGCG) on the prevention of dental erosion. Chlorhexidine was also included as an MMP inhibitor. The vehicle chosen to deliver these compounds to dentin was a gel, to increase the contact time with dentin, to enhance substantivity, and also to make easier clinical use easier, since the green tea was used 4 times *per* day in the above-mentioned study (Kato *et al.*, 2009), which is not practical from a clinical point of view. Fluoride was used as a positive control because, despite the fact that, to date, there is no standard protocol that could be recommended for the prevention of erosive wear, topical application of fluoride is one of the most

studied measures (Schlueter *et al.*, 2007; Magalhães *et al.*, 2008; Wiegand *et al.*, 2008). Since all the gels tested had essentially the same formulation, any preventive effect on erosion could be attributed to the active compounds added.

The gels containing MMP inhibitors showed a clearly superior performance when compared with the gel containing fluoride, with a complete inhibition of dental erosion. SEM images confirmed the absence of wear in the groups where MMP inhibitor gels were applied and additionally showed that there was deposition of particles inside the tubules, leading to their complete obstruction, which also suggests a physical effect of the gels containing the active principles. It is known that both chlorhexidine and polyphenols are able to interact with metal ions (Gendron *et al.*, 1999; Garbisa *et al.*, 2001), which could have led to the observed deposition of particles inside the tubules, by binding to calcium from apatite. It is possible that this interaction could have influenced the de/remineralization processes in dentin, thus contributing to the reduction of erosion progression.

The doses of EGCG and chlorhexidine used in the present study are known to inhibit the activity of MMPs. The ability of chlorhexidine to interfere in MMP degradation is dose-dependent. The minimum concentration that induced a complete inhibition of MMP-9 was 0.002%, while that for MMP-2 was 0.0001% (Gendron *et al.*, 1999). Nevertheless, it should be emphasized that in the above-mentioned experiment, chlorhexidine was incubated directly with MMPs for 30 min at room temperature. Thus, it is expected that the concentration of chlorhexidine necessary for dentin MMP inhibition in clinical situations may be higher. For this reason, an intermediate chlorhexidine dose was used in this study, that is, 0.012%. This dose could be prescribed for continuous use by individuals with erosion, since it is much lower than that used in commercial chlorhexidine mouthrinses (0.12%). As for EGCG, the IC_{50}

values for the inhibition of MMP-2 and MMP-9 are 6 and 0.8 μM , respectively (Demeule *et al.*, 2000). Thus, the lowest dose used in the present study (10 μM) was enough to diminish the activity of both gelatinases. We also tested a much higher dose (400 μM), since this is the concentration of EGCG found in green tea (Kato *et al.*, 2009).

The erosive challenges were performed extra-orally by the immersion of appliances in Coca-Cola for 5 min. It is likely that the low pH of this soft drink may have activated MMPs from dentin and saliva when the participants took a sip of the drink. However, MMPs are not able to degrade dentin organic matrix in acidic pH, since MMPs are neutral proteases and function only in neutral pH. The alternating periods between dentin demineralization in pH below 5.5 and the periods of neutral pH due to salivary buffers provided the sequence in which the collagen fibrils of dentin organic matrix were first exposed and then degraded by MMPs (Tjäderhane *et al.*, 1998). In this protocol, the interval between each erosive challenge (> 2 hrs) would allow for the remineralization and also pH neutralization, which is essential for the degradation of the organic matrix by MMPs.

MMP inhibition has previously been shown to be effective in preventing dentin matrix degradation in the hybrid layer (Hebling *et al.*, 2005; Carrilho *et al.*, 2007a,b) and dentinal caries (Sulkala *et al.*, 2001). The results of the present work indicate that MMP inhibition also seems to be effective in preventing dental erosion. However, a proof-of-concept study is still necessary to confirm this, since, in the present study, the response variables used were wear and SEM. Further studies should be carried out in an attempt to access the longevity of the effect on wear reduction and also to establish clinical protocols.

Figure 3. Representative scanning electron micrographs (SEM) of the dentinal surface of the placebo control specimen at low-power magnification (2000x) (a) and different groups of eroded specimens at high-power magnification (8000x): (b) placebo; (c) NaF-treated; (d) chlorhexidine-treated; (e) EGCG10-treated; and (f) EGCG400-treated. In the eroded placebo specimen (b), most of the dentinal tubules were exposed. Nevertheless, the specimens treated with experimental gels clearly demonstrated tubule occlusion, as can be observed in (d-f), as well as in the positive control (c), which had been treated with NaF. The surface aspects observed for specimens of all groups at the control side were similar (a).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank FAPESP for financial support (07/08389-3 and 07/04209-0) and all the volunteers who took part in the study.

REFERENCES

- Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipolito V, Geraldini S, Tay FR, *et al.* (2007a). Chlorhexidine preserves dentin bond *in vitro*. *J Dent Res* 86:90-94.

- Carrilho MR, Geraldini S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, et al. (2007b). *In vivo* preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res* 86:529-533.
- Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S (2006). The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res* 85: 22-32.
- Demeule M, Brossard M, Pagé M, Gingras D, Béliveau R (2000). Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochim Biophys Acta* 1478:51-60.
- Ganess C, Klimek J, Starck C (2004). Quantitative analysis of the impact of the organic matrix on the fluoride effect on erosion progression in human dentine using longitudinal microradiography. *Arch Oral Biol* 49:931-935.
- Ganess C, Schlueter N, Hardt M, von Hinckeldey J, Klimek J (2007). Effects of toothbrushing on eroded dentine. *Eur J Oral Sci* 115:390-396.
- Garbisa S, Sartor L, Biggin S, Salvato B, Benelli R, Albini A (2001). Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. *Cancer* 91:822-832.
- Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D (1999). Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol* 6:437-439.
- Gregg T, Mace S, West NX, Addy M (2004). A study *in vitro* of the abrasive effect of the tongue on enamel and dentine softened by acid erosion. *Caries Res* 38:557-560.
- Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L (2007). The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 65:1-13.
- Hara AT, Ando M, Cury JA, Serra MC, González-Cabezas C, Zero DT (2005). Influence of the organic matrix on root dentine erosion by citric acid. *Caries Res* 39:134-138.
- Hara AT, Ando M, González-Cabezas C, Cury JA, Serra MC, Zero DT (2006). Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges *in situ*. *J Dent Res* 85:612-616.
- Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR (2005). Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers *in vivo*. *J Dent Res* 84:741-746.
- Imfeld T (1996). Dental erosion. Definition, classification and links. *Eur J Oral Sci* 104(Pt 2):151-155.
- Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MA (2009). Protective effect of gels containing matrix metalloproteinases inhibitors against dentin erosion *in situ*. *J Appl Oral Sci* 17:560-564.
- Katz S, Park KK, Palenik CJ (1987). *In-vitro* root surface caries studies. *J Oral Med* 42:40-48.
- Kawasaki K, Featherstone JD (1997). Effects of collagenase on root demineralization. *J Dent Res* 76:588-595.
- Kleter GA, Damen JJ, Everts V, Niehof J, ten Cate JM (1994). The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin *in vitro*. *J Dent Res* 73:1523-1529.
- Klont B, ten Cate JM (1991). Remineralization of bovine incisor root lesions *in vitro*: the role of the collagenous matrix. *Caries Res* 25:39-45.
- Magalhães AC, Rios D, Moino AL, Wiegand A, Attin T, Buzalaf MA (2008). Effect of different concentrations of fluoride in dentifrices on dentin erosion subjected or not to abrasion *in situ/ex vivo*. *Caries Res* 42:112-116.
- Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM (2000). The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol* 45:757-765.
- Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri A Jr, et al. (2009). Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis. *J Biomed Mater Res A* 88:697-703.
- Meurman JH, Drysdale T, Frank RM (1991). Experimental erosion of dentin. *Scand J Dent Res* 99:457-462.
- Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Delbem AC, Machado MA, Silva SM, et al. (2006). Effect of salivary stimulation on erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: an *in situ/ex vivo* study. *Caries Res* 40:218-223.
- Sales-Peres SH, Pessan JP, Buzalaf MA (2007). Effect of an iron mouthrinse on enamel and dentine erosion subjected or not to abrasion: an *in situ/ex vivo* study. *Arch Oral Biol* 52:128-132.
- Sartor L, Pezzato E, Dell'Aica I, Caniato R, Biggin S, Garbisa S (2002). Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochem Pharmacol* 64:229-237.
- Schlueter N, Ganess C, Hardt M, Schegietz D, Klimek J (2007). Effect of pepsin on erosive tissue loss and the efficacy of fluoridation measures in dentine *in vitro*. *Acta Odontol Scand* 65:298-305.
- Sulkala M, Tervahartala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L (2007). Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol* 52:121-127.
- Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto V-J, Larmas M, Salo T (1998). The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res* 77:1622-1629.
- Visse R, Nagase H (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92:827-839.
- Wiegand A, Meier W, Sutter E, Magalhães AC, Becker K, Roos M, et al. (2008). Protective effect of different tetrafluorides on erosion of pellicle-free and pellicle-covered enamel and dentine. *Caries Res* 42: 247-254.