UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

BRUNO LARA ZARELLA

**Efeito de resinas experimentais contendo inibidores de proteases
da matriz sobre gelatinases e collagenases**

BAURU
2013

BRUNO LARA ZARELLA

**Efeito de resinas experimentais contendo inibidores de proteases
da matriz sobre gelatinases e collagenases**

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

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Versão corrigida

BAURU
2013

V423e Zarella, Bruno Lara
 Efeito de resinas experimentais contendo
 inibidores de proteases da matriz sobre gelatinases e
 colagenases / Bruno Lara Zarella. – Bauru, 2013.
 83 p. : il. ; 31cm.

 Dissertação (Mestrado) – 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 dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data: 10/05/2013

DEDICATÓRIA

A Deus, pois sem uma força superior jamais seria capaz de chegar a este momento!

Minha dedicatória também é para minha família.

Meus pais, José Zarella Neto e Regina M. de Souza Lara Zarella.

O que seria de minha vida sem vocês? Como é bom saber que tenho o apoio de vocês, saber que a cada dificuldade que encontrar poderei contar com o apoio, conselho e empenho de vocês para me ajudar a contorná-la.

Sabe meu pai, sabe minha mãe, aprendi coisas muito belas com vocês nesses 26 anos. A primeira e mais importante é o amor, como é belo ver um casal que do nada, literalmente do nada, conquistou e construiu um império. Saber que quando esse império desabou, quando o mundo lutava contra nós, o amor e a união fizeram com que aos seus mais de 50 anos, o senhor começasse do zero meu pai. Daí cito uma outra coisa muito importante que aprendi com vocês, a honestidade, pois de alguma forma, o honesto sempre irá vencer. Saber o quanto vocês sofreram para formar seus 3 filhos, para alimentá-los em tempos tão difíceis, saber que o senhor meu pai, estava naquele momento morando sozinho, chorando sozinho, para chegar no final de semana em casa e com todo o carinho, abraçar seus filhos e esposa e falar que estava tudo bem. Quantas lágrimas vocês choraram escondidos para que nos 3 não chorássemos juntos? Isso pra mim é o maior exemplo de ser pai e mãe! E como o senhor mesmo fala, tudo isso só foi possível porque ao seu lado tinha uma grande mulher. Mulher da qual agradeço todos os dias por ser minha mãe. Um ombro, um colo, uma mão amiga que temos sempre, mulher da qual deixa de comer para alimentar seus filhos. Até o último dia de minha vida não conseguirei retribuir o tanto que devo à vocês. Tudo, mas tudo o que faço dedico à vocês.

Obrigado por sempre me apoiarem, sei que sou teimoso as vezes, mas muito obrigado por tudo, vocês são os espelhos nos quais quero sempre me refletir! Amo vocês mais que tudo nessa vida

Dedico também essa dissertação aos meus queridos irmãos.

Camila, Felipe, vocês sabem o quanto me orgulho de vocês né?! Camila com sua beleza encantadora, brava, mas encantadora. Dedicada, teimosa, mas uma irmã que é capaz de armar uma guerra mundial para defender sua família! Desde 15/12/2012, cada vez que falo de você Caquinha, tenho que falar do meu cunhado né?!. Zivanildo, seu nome não é tão belo, mas seu coração é enorme. Como é bom saber que minha irmã encontrou o grande companheiro de sua vida. Muito obrigado por fazer minha irmã feliz, por cuidar dela e tratá-la como ela merece, agradeço demais à você também meu caro Ziva. Meu querido irmão, cara do qual sempre tive orgulho de falar. Quem tem irmão sabe do que falo, nas rodinhas de amigos sempre seu irmão é o melhor. Publicitário, fotografo, sonhador, um dos caras mais inteligentes que já encontrei. Espero que com sua estadia no Canadá você venha a realizar todos os seus sonhos. Tenho muito orgulho de você e agradeço muito por ter feito de tudo para estar em minha defesa. Sem você aqui não seria a mesma coisa!

Amo vocês demais, meus 26 anos jamais seriam os mesmos sem vocês.

Claro que também dedico esta dissertação a minha companheira, minha anjinha brava.

Tatiane, você sabe da importância que tem em minha vida né?! Sempre ao meu lado, sempre me encorajando a ir além, sempre me dando a mão para levantar quando tropeço. Se um dia eu sonhava com uma mulher perfeita, Deus me deu esse sonho, e esse sonho é você! E quando falo de você, tenho que falar de sua família, agradeço demais ao Sr. Euflázio e a Sra. Sônia, sempre me tratando como se fosse seu próprio filho, amo demais vocês e se vocês me tratam como filho, saibam que os tenho como meus pais!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf, uma pessoa que tem o coração tão grande quanto o seu nome.

Sabe Professora, é muito engraçado como a Senhora é importante na vida de tantas pessoas. Acho que a Senhora não percebe o número de pessoas que crescem com sua ajuda. Uma mulher inteligente, dedicada, exemplar, educada, e a qualidade de mais admiro na Senhora, HUMILDE. Algo mais belo no Ser Humano é quando ele atinge algo praticamente inatingível, mas continua se estabelecendo no mesmo degrau dos outros. É muito bonito ver o carinho que a Senhora tem por todos os seus alunos, sinto orgulho demais de fazer parte de seus seguidores, e falo de boca cheia: SOU BUZALETE!!!

Admiro demais a Senhora, se um dia eu conseguir conquistar e aprender um pouquinho do que conquistou e sabe, serei muito feliz. Sempre quis fazer meu melhor, jamais quis que me visse como apenas um aluno. Não tenho pretensão de ser o melhor aluno, mas o Bruno, aquele cara que a Senhora deu asas para entrar nesse maravilhoso mundo da Bioquímica, da odontologia, aquele aluno que a Senhora apoiou quando quis ir pra Finlândia, Canadá e que depois de três anos de formado voltasse a ser um graduando.

Professora, tenho certeza que sabe o quanto te admiro, o quanto é importante em minha vida, dar a mão pra um aluno qualquer e transformá-lo em um homem, isso pra mim não têm valor. Posso falar com absoluta certeza, a Senhora é uma das responsáveis por eu me transformar de garoto Bruno no homem Bruno.

Muito obrigado por esses 6 anos de orientação.

À minha querida co-orientadora e amiga Melissa Thiemi Kato. Melissa, junto com a Profa. Marília, você é a pessoa responsável pelo meu crescimento. Minha AMIGA, minha companheira de profissão. Sabe como fazemos pra ver se uma amizade verdadeira? Não é no momento de felicidade, e sim nos de tristeza. Saber de tudo que passamos com nossa briga, mas jamais, jamais mesmo fiquei sabendo de um “a” de você falando de mim. Depois de um ano sem se quer dizer bom dia, voltamos a trabalhar; sabia que aquele foi um dos dias, se não o dia mais feliz que tive no laboratório? É muito importante pra mim te ter como minha co-orientadora, saber que posso contar com você a cada segundo, saber que nos momentos de

dificuldade terei sua incrível inteligência me ajudando. Você é muito importante pra mim MAMÃE MELISSA. Muito obrigado por aparecer na minha vida.

Ao Prof. Dr. Leo Tjäderhane e a Profa. Dra. Tuula Salo, muito obrigado pelo envio das MMPs, das quais sem elas, esse projeto jamais sairia do papel. Vocês foram muito importantes para que eu seguisse nessa linha de pesquisa e até mesmo por eu ter decidido fazer o mestrado. Muito obrigado pela colaboração e pela orientação.

À Profa. Dra. Anuradha Prakki, com sua cara de brava e coração de mãe, me recebeu no Canadá e me ensinou um pouquinho sobre o maravilhoso mundo dos materiais dentários. Muito obrigado por ter confiado em nosso laboratório e por ter aceitado meu nome para conduzir este projeto. Quero que saiba que sem a Senhora e sem este projeto, jamais teria me apaixonado pela odontologia, profissão da qual quero seguir para toda minha vida. Muito obrigado, admiro demais a Senhora, pois assim como a Profa. Marília, atingiu patamares altos, mas continua com muita humildade e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. José Carlos Pereira, em nome da Faculdade de Odontologia de Bauru. Faculdade da qual me proporcionou toda a estrutura para conduzir meus experimentos, me orgulho muito de ser aluno desta instituição.

À FAPESP, fundação da qual me financia desde 2009, em minha primeira iniciação científica. Muito obrigado pelo financiamento, o trabalho de vocês é exemplar, vocês são responsáveis por diversos projetos saírem do papel. Muito obrigado pelo financiamento de minhas iniciações científicas, pelo meu mestrado e por custear minha ida ao Canadá.

Os professores do laboratório de bioquímica, Profa. Dra. Ana Carolina Magalhães e Prof. Dr. Rodrigo Cardoso, muito obrigado pelos conselhos, dúvidas e conversas, mesmo não sendo meus orientadores, vocês de alguma forma têm um dedinho nesta dissertação. Muito obrigado, admiro demais vocês dois.

À professora Dra. Linda Wang, quando foi sugerido seu nome, de imediato aceitei. Sempre acompanhei de longe seu trabalho junto com suas orientadas de IC. O que sempre achei muito belo, foi o fato da senhora sempre estar trabalhando junto com seus orientados, e desses, ver nos olhos deles a admiração e respeito que tinham pela senhora. Muito obrigado, foi um privilégio tê-la como membro de minha banca.

Os professores do curso de pós graduação desta instituição, muito obrigado pelas aulas e por passar um pouquinho do vasto conhecimento de vocês.

Aos funcionários do laboratório de Bioquímica, Thelma, Aline e Larissa, que juntas com o ex funcionário Ovídio, sempre estiveram prontos a me ajudar quando as dúvidas ou problemas impediam meu andar. Vocês sempre foram muito importantes no meu aprendizado. Sem vocês o laboratório de Bioquímica não seria grande como é. Muito obrigado.

À Vera e Dalva, salvadoras dos alunos de pós graduação da Biologia Oral. Muito obrigado por toda ajuda nesses 2 anos. Merecedoras de placas de mérito por serem tão eficientes.

Muito obrigado aos amigos e colegas de curso e de laboratório. Muito obrigado pela companhia em aulas intermináveis, por rirem e chorarem comigo. Não cito nomes para não deixar escapar algum e assim ser injusto, agradeço a todos vocês, tenho muito orgulho de nossa caminhada.

Aos meus eternos e fiéis amigos: Rafa, Gui, Gutão, Pedrão, Lucas, Yury, e Márcio. Muito obrigado por serem meus amigos. Mesmo o destino nos levando para caminhos diferentes, como é bom saber que tenho com quem contar nos meus momentos mais difíceis. Ter vocês como amigo é algo maravilhoso. Muito obrigado por todos os momentos. Amo vocês.

À Universidade Sagrado Coração, universidade que me formou e que me deu todos os valores que sigo hoje. Muito obrigado.

Ao Prof. Ms. José Rafael Mazzonni, além de um ídolo, um grande amigo. Muito obrigado por todos os conselhos e por sempre estar pronto para uma conversa. Admiro demais o Senhor, muito obrigado por tudo.

E a todos que não mencionei, mas que me ajudaram de algum modo, agradeço demais.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Marthin Luther King)

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcuta)

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens do céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos.”

(Paulo Beleki)

RESUMO

A evolução das resinas compostas fez com que esses materiais passassem a ter uma durabilidade maior e características estéticas muito boas, mas o risco de cárie recorrente é ainda um problema a ser resolvido. Na tentativa de solucionar esse problema, estudos vêm sendo conduzidos na tentativa de se formularem resinas compostas contendo agentes antibacterianos, como é o caso da incorporação de clorexidina (CHX). Outro fato que impede a longevidade deste material é a degradação de matriz de colágeno por proteases ativadas por pH ácido. Para tentar contornar esse problema, a adição de clorexidina, assim como *Epigallocatechin gallate* (EGCg), clássicos antibacterianos e inibidores de proteases da matriz, como as metaloproteinases da matriz (MMP) a resinas, poderia melhorar a eficácia destes materiais como substitutos de dentina em procedimentos restauradores, aumentando a longevidade do tratamento restaurador, mediante preservação das propriedades mecânicas do material. Assim, o objetivo desse estudo é avaliar o poder de inibição de resinas experimentais contendo inibidores conhecidos de proteases da matriz sobre gelatinases e collagenase. Para isso, copolímeros experimentais foram preparados combinando Bis-GMA com o diluente TEGDMA (70/30 mol%). Com exceção do copolímero placebo (sem drogas), EGCg ou CHX foram incorporados a 1% em peso isoladamente ou em combinação, a 0,5% em peso cada. Amostras contendo EGCg, CHX ou EGCg e CHX concentradas 10X foram obtidas do armazenamento de espécimes polimerizados da resina experimental em água deionizada (1 mL) após o período de 24h a 37°C e sua posterior concentração. O efeito da ação dos inibidores foi checado por zimografia e confirmado por um ensaio enzimático específico para collagenases e gelatinases. Os dados passaram por teste de homogeneidade (Bartlett) e normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e foram avaliados por ANOVA a 2 critérios, seguido pelo teste de Bonferroni para comparações individuais ($p < 0,05$). Os resultados do presente estudo, mostraram que, *in vitro*, a liberação de EGCg e CHX incorporados em resinas é capaz de reduzir a atividade gelatinolítica das MMPs -2 e -9, bem como a atividade da collagenase bacteriana, sugerindo um efeito potencial no aumento da longevidade de restaurações de resinas. Com isso, podemos afirmar que a liberação de ativos de resinas experimentais é possível e que esses ativos são capazes de

inibir as MMPs, assim sugerindo um novo substituto para dentina em procedimentos restauradores.

Palavras Chave: Clorexidina, catequina, liberação de drogas, inibidores de MMP

ABSTRACT

Effect of experimental resins containing protease inhibitors on gelatinases and collagenase

The evolution of composite resins made these materials to have a greater durability and very good esthetics characteristics, but the risk of recurrent caries is still a problem to be solved. In the attempt to solve this problem, studies are being conducted with the purpose to formulate composite resins containing antibacterial agents, such as chlorhexidine (CHX). Another fact that prevents the longevity of this material is the degradation of the collagen matrix by the proteases activated by acidic pH. In order to solve this problem, the addition of chlorhexidine and/or *Epigallocatechin gallate* (EGCg), classical antibacterial agents and inhibitors of matrix proteases, such as matrix metalloproteinases (MMP) in resins, could improve the efficacy of these materials as dentin substitutes in restorative procedures, increasing the longevity of the restorative treatment, while preserving the mechanical properties of the material. Thus, the aim of this study is to evaluate the ability of experimental resins containing known matrix protease inhibitors on the inhibition of gelatinases and collagenase. For this purpose, experimental copolymers were prepared combining Bis-GMA with the diluent TEGDMA (70/30 mol%). Except for the placebo copolymer (drug free), EGCg or CHX were incorporated at 1% in weight, isolated or in combination (0.5% in weight each). Samples containing EGCg, CHX or EGCg and CHX concentrated 10X were obtained after storage of polymerized specimens of the experimental resin in deionized water (1 mL) after the period of 24 h, at 37°C and after that were concentra. The effect of the action of the inhibitors was checked by zymography and confirmed by an enzymatic test specific for collagenases and gelatinases. The data passed in the tests of homogeneity (Bartlett test) and normality (Kolmogorov-Smirnov test), and were evaluated by 2-way ANOVA, followed by Bonferroni test for individual comparisons ($p < 0.05$). The results of this study showed that the in vitro release of EGCG and CHX incorporated in resins was able to reduce the gelatinolytic activity of MMPs-2 and -9 and bacterial collagenase activity, suggesting a potential effect in increasing the longevity of resin restorations. It can be concluded that the release of drugs from experimental resins is

possible and that these drugs are able to inhibit MMPs, thereby suggesting a new substitute for dentin in restorative procedures.

Key Words: Chlorhexidine, catechin, drug release, MMP inhibitors

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 - Preparo e acondicionamento dos corpos de prova.....	44
Figura 2 - Liberação de drogas dos corpos de provas e posterior concentração.....	45
Figura 3 - Esquema de inserção das amostras nos poços do gel de zimografia contendo os grupos iniciais.....	48
Figura 4 - Esquema de inserção das amostras nos poços do gel de zimografia contendo o grupo EGCg+CHX.....	48
Figura 5 - Descrição do marcador de peso molecular.....	49
Figura 6 - Esquema demonstrando preparação do gel de zimografia, corrida e sua coloração e descoloração para posterior análise densitométrica.....	51
Figura 7 - Disposição padrão adotada das amostras na microplaca 1.....	54
Figura 8 - Disposição padrão adotada das amostras na microplaca 2.....	55
Figura 9 - Preparo das soluções, inserção e leitura das amostras.....	57
Figura 10 - Gel de zimografia contendo os grupos iniciais.....	63
Figura 11 - Réplica I do gel de zimografia contendo os grupos iniciais.....	64
Figura 12 - Réplica II do gel de zimografia contendo os grupos iniciais.....	64
Figura 13 - Gel de zimografia contendo o grupo contendo combinação das substâncias.....	65
Figura 14 - Réplica I do gel de zimografia contendo o grupo contendo combinação das substâncias.....	65
Figura 15 - Réplica II do gel de zimografia contendo o grupo contendo combinação das substâncias.....	66
Figura 16 - Gráfico análise densitométrica.....	67

Figura 17 - Gráfico porcentagem de inibição nos grupos experimentais no 71
ensaio imunológico.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos grupos de MMPs em relação ao substrato de ação.....	32
Tabela 2 - Descrição da composição do gel de poliacrilamida.....	47
Tabela 3 - Esquema mostrando todos os grupos e todas as soluções inseridas nas amostras, contendo a quantidade de cada solução em cada grupo.....	56
Tabela 4 - Atividade média da collagenase tipo IV de <i>Clostridium histolyticum</i> na presença de diferentes quantidades de inibidores liberados a partir de reinas experimentais.....	68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	Metaloproteínases da matriz e a cavidade oral.....	29
2.2	Clorexidina e <i>Epigallocatechin gallate</i> como inibidores de proteases.....	33
2.3	Resinas compostas: Suas limitações e perspectivas	34
3	PROPOSIÇÃO.....	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1	Materiais.....	43
4.1.1	Formulação dos comonômeros.....	43
4.2	Métodos.....	43
4.2.1	Preparo dos corpos de prova.....	43
4.2.2	Liberação de drogas.....	44
4.2.3	Análise zimográfica.....	46
4.2.3.1	Zimografia.....	46
4.2.3.1.1	Preparação do gel de zimografia.....	46
4.2.3.1.2	Preparo das amostras.....	47
4.2.3.1.3	Inserção das amostras.....	47
4.2.3.1.4	Corrida e incubação do gel.....	49
4.2.3.1.5	Coloração e descoloração do gel.....	49
4.2.4	Ensaio enzimático.....	51
4.2.4.1	Preparo das soluções.....	52
4.2.4.1.1	DQ gelatina.....	52
4.2.4.1.2	Tampão 1X.....	52
4.2.4.1.3	1,10- Fenantrolina monohidratada.....	52
4.2.4.1.4	Colagenase tipo IV.....	53
4.2.4.2	Inserção das amostras.....	53
4.2.4.3	Leitura das amostras.....	54
4.2.5	Análise dos dados.....	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
7	CONCLUSÕES.....	73

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Nas restaurações adesivas, o condicionamento ácido remove os minerais que protegem o tecido dentinário, ativando as enzimas derivadas do próprio hospedeiro, como as metaloproteinases da matriz (MMPs) e cisteína catepsinas, possibilitando a degradação da matriz de colágeno dentinária, não completamente infiltrada pelo sistema adesivo (LIU et al., 2011; MAZZONI et al., 2007; PASHLEY et al., 2004; TERSARIOL et al., 2010; TJÄDERHANE et al., 2013).

As MMPs são endopeptidases cálcio-zinco dependentes que degradam a maioria, se não todos os componentes da matriz extracelular (MEC). MMPs são secretadas como precursores inativos (pró formas) e necessitam de ativação para exercer degradação em um substrato, que em sua maioria é específico (VISSE; NAGASE, 2003). Dentre as 24 MMPs descritas, 23 delas são encontradas em seres vertebrados, as quais são inibidas por inibidores endócrinos, os TIMPs (inibidores teciduais de MMPs) (HANNAS et al., 2007).

As cisteína catepsinas são endopeptidases que participam das atividades proteolíticas intracelulares dentro do compartimento lisossomal (DICKINSON, 2002) (DICKINSON, 2002). Também são encontradas como exopeptidases e participam da degradação da matriz extracelular (OBERMAJER et al., 2008). São descritos 11 tipos de cisteína catepsinas em seres humanos, nomeadas catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, X e W (DICKINSON, 2002). São secretadas como zimogênios inativos e são ativadas tanto autocataliticamente (processo desencadeado por acidificação endosomal) quanto por outras proteases (MACH et al., 1994).

Várias MMPs, TIMPs e cisteína catepsinas foram identificadas na cavidade oral, tendo um importante papel na formação e manutenção do complexo dentinopulpar, progressão de cárie e erosão, formação do esmalte, fluorose dentária, na remodelação da matriz orgânica dentinária, em processos inflamatórios na região pulpar e periapical, em doenças periodontais, e como já mencionado, na degradação da matriz de colágeno dentinária em regiões de restaurações que não foram completamente infiltradas (BUZALAF et al., 2012; CARRILHO, 2012; HANNAS et al., 2007; NIU et al., 2011; TERSARIOL et al., 2010)

Alguns compostos têm potencial para agir como inibidores sintéticos não específicos de MMPs, como é o caso da CHX e do inibidor natural não específico EGCg (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006; GENDRON et al., 1999). A CHX é classicamente utilizada como agente antimicrobiano, mas também tem sido empregada mais recentemente como inibidor de MMPs. O uso de CHX após o condicionamento ácido com a finalidade antimicrobiana mostrou ter grande eficácia, mas também foi demonstrado que esse uso tópico é ainda eficaz na inibição das MMPs presentes na dentina mineralizada e salivar, as quais poderiam vir a degradar a matriz de colágeno na camada híbrida (CARRILHO et al., 2010). Estudos *in situ* mostram que o EGCg, o qual é um dos mais importantes polifenóis encontrados no chá verde, tem potencial de reduzir a erosão dentinária, sendo ela associada ou não à abrasão (BUZALAF et al., 2012; KATO et al., 2010).

Alguns estudos mostram que é possível incorporar substâncias em dimetacrilatos, o que dependendo da quantidade (% em peso), pode ou não influenciar nas propriedades do material (JEDRYCHOWSKI et al., 1983; LEUNG et al., 2005; SEHGAL et al., 2007). A liberação de substâncias de resinas é um processo afetado por muitos fatores, como tipo de monômero, tipo e concentração da substância e hidrofobia do material (PRAKKI et al., 2007).

Portanto, sendo possível a incorporação de substâncias em resinas compostas mantendo-se as propriedades do material, se houver uma liberação destas substâncias para o meio numa quantidade que atinja a concentração necessária para inibir as proteases da matriz, este material modificado poderia ser um excelente substituto para a dentina em procedimentos restauradores, aumentando sobremaneira a longevidade do material restaurador pela preservação da camada híbrida.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão tem como objetivo descrever as MMPs, relatando sua função, tanto em condições normais ou patológicas, bem como o modo como são secretadas e ativadas. Será descrita também sua atual nomenclatura, a qual é baseada no substrato de ação e no seu papel no organismo. Serão apresentados ainda os seus inibidores, sejam eles endógenos (TIMPS) ou não (substâncias capazes de inibir a atividade das MMPs).

Utilizando como exemplos a CHX e o EGCg, dois conhecidos inibidores não específicos de MMPs, será feita uma descrição dessas substâncias e apresentada a dose mínima necessária para inibição das gelatinases (*in vitro*).

Ainda em relação a esses inibidores, será apresentado um novo conceito relacionado à camada híbrida e às resinas compostas, demonstrando a utilização desses compostos, a fim de retardar ou desacelerar a degradação biológica da camada híbrida e da matriz de colágeno, com o intuito de aumentar a longevidade do material restaurador.

2.1 Metaloproteinases da matriz e sua função na cavidade oral

As MMPs constituem uma família importante de endopeptidases metalodependentes que são capazes de degradar quase todas, se não todas as matrizes extracelulares (MEC) (PALOSAARI et al., 2003; VISSE; NAGASE, 2003). Têm papel importante na remodelação tecidual (normal ou patológica), migração celular (normais ou malignas), cicatrização de feridas, formação do esmalte (HANNAS et al., 2007). Elas são secretadas como precursores inativos (pró formas), necessitando de ativação para causar degradação. Podem ser ativadas por diversos fatores, como fatores de crescimento, agentes químicos, forças mecânicas e inclusive baixo pH, mas necessitando da neutralização deste ambiente para exercer degradação (TJÄDERHANE et al., 1998). Atualmente são descritos 24 tipos de MMPs, sendo que 23 deles foram identificadas em humanos. Foi sugerido que cada uma é capaz de degradar um determinado tipo de substrato e assim surgiram

nomenclaturas específicas baseadas no tipo de substrato de ação, como as collagenases, que têm a capacidade de degradar fibrilas intactas de colágeno, e as gelatinases, que têm a capacidade de degradar colágeno desnaturado (gelatina) (HANNAS et al., 2007; VISSE; NAGASE, 2003).

Com base nesta capacidade de degradação, é usualmente feita uma classificação, dividindo as MMPs em 6 subgrupos, sendo eles: collagenases (MMP -1, -8, -13, -18 ou collagenase 1, collagenase 2, collagenase 3 e collagenase 4, respectivamente); gelatinases (MMP -2, -9 ou gelatinase A e gelatinase B, respectivamente); estromelisinases (MMP -3, -10, -11 ou estromelisina 1, estromelisina 2 e estromelisina 3, respectivamente); matrilisinases (MMP -7, -26 ou matrilisina 1 e matrilisina 2, respectivamente); metaloproteinases tipo membrana (MMP -14, -15, -16, -17, -24, -25 ou MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, MT5-MMP e MT6-MMP, respectivamente) e outras (MMP -12 ou elastase macrófaga, MMP-19, MMP-20 ou enamelisina, MMP-21 ou MMP *Xenopus*, MMP-23 ou CA-MMP, MMP-27 ou CMMP ou *Gallus*, MMP-28 ou epilisina) (HANNAS et al., 2007; VISSE; NAGASE, 2003). (Tabela 1).

Como mencionado anteriormente, a classificação das MMPs em geral é feita em função do seu substrato de ação. Assim, as collagenases têm capacidade de degradar colágeno intersticial do tipo I, II e III e são capazes de digerir outros componentes da MEC, além de outras substâncias que não fazem parte da MEC. Já as gelatinases têm capacidade de degradar colágeno desnaturado (gelatina), além do fato de a gelatinase A (MMP-2) também ter capacidade de aumentar a atividade da gelatinase B (MMP-9). A estromelisina 1 (MMP-3) e a estromelisina 2 (MMP-10) possuem substratos de ação similares, mas a estromelisina 1 possui uma maior eficiência proteolítica e também ativa precursores inativos. A matrilisina 1 (MMP-7) processa moléculas da superfície celular e a matrilisina 2 (MMP-26) também degrada componentes da MEC. As MMPs tipo membranas, têm capacidade de ativar precursores inativos da gelatinase A (MMP-2), exceto a MT4-MMP. Elas também degradam moléculas da MEC. A MT1-MMP também é capaz de degradar colágeno tipo I, II e III, além de ter um papel importante na angiogênese (HANNAS et al., 2007; VISSE; NAGASE, 2003).

Conforme citado, as MMPs são secretadas como precursores inativos (pró formas), e necessitam ser ativadas para exercer sua função. A lise do pró domínio do sítio catalítico é necessária antes da ativação da enzima. Essa lise pode ocorrer

por autocatálise ou pela ação de outras enzimas proteolíticas (furina, plastina e até mesmo por outras MMPs). *In vitro*, elas podem ser ativadas por agentes químicos (agentes modificadores de tiol, glutatona oxidada, dodecil sulfato de sódio (SDS), agentes caotrópicos e espécies reativas de oxigênio) (HANNAS et al., 2007; VISSE; NAGASE, 2003), os quais provavelmente agem modificando a interação zinco/cisteína. A ativação também pode acontecer pela queda do pH seguida por neutralização, o que acontece normalmente na cavidade bucal mediante desafios cariogênicos e erosivos (BUZALAF et al., 2012; TJÄDERHANE et al., 1998).

TIMPS (inibidores teciduais de MMPs) são descritos como inibidores endógenos específicos de MMPs. Quatro tipos foram identificados em seres vertebrados (TIMP -1, -2, -3, -4) e sua expressão é regulada pelo remodelamento e crescimento tecidual. Sob uma condição patológica, há um desequilíbrio do balanço entre TIMP/MMP, podendo levar a destruições patológicas ou acúmulo de MEC (VISSE; NAGASE, 2003; BAKER et al., 2002) (BAKER et al., 2002; VISSE; NAGASE, 2003).

Certos TIMPs e MMPs são identificados em estruturas dentárias e saliva humana e têm diferentes papéis na formação e manutenção do complexo dentino pulpar (BUZALAF et al., 2012; NIU et al., 2011; PALOSAARI et al., 2003; TJÄDERHANE et al., 1998). Também é descrito que as MMPs têm papel fundamental na progressão de cárie (SULKALA et al., 2001; TJÄDERHANE et al., 1998) e erosão dentinária (BUZALAF et al., 2012) devido à degradação do colágeno da dentina desmineralizada (MMP-2,-8,-9). Estão envolvidas ainda na formação do esmalte e na fluorose (MMP-2, -20), na remodelação da matriz orgânica dentinária (MMP-2, -8, -9), têm sido identificadas tanto em processos inflamatórios na região pulpar e periapical, em doenças periodontais (HANNAS ET AL., 2007; MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; TJÄDERHANE et al., 1998) e na degradação da matriz de colágeno em regiões de restaurações que não foram completamente infiltradas, a qual é de alta importância para o presente estudo (para revisão, veja LIU et al., 2011; TJÄDERHANE et al., 2013).

Tabela 1 – Descrição dos grupos de MMPs em relação ao substrato de ação (modificado de HANNAS et al. 2007).

GRUPO	ENZIMA
COLAGENASES	MMP-1 ou COLAGENASE 1 MMP-8 ou COLAGENASE 2 MMP-13 ou COLAGENASE 3 MMP-18 ou COLAGENASE 4
GELATINASES	MMP-2 ou GELATINASE A MMP-9 ou GELATINASE B
ESTROMELISINA	MMP-3 ou ESTROMELISINA 1 MMP-10 ou ESTROMELISINA 2 MMP-11 ou ESTROMELISINA 3
MATRISILINA	MMP-7 ou MATRISILINA 1 MMP-26 ou MATRISILINA 2
MMPs TIPO MEMBRANAS	MMP-14 ou MT1-MMP MMP-15 ou MT2-MMP MMP-16 ou MT3-MMP MMP-17 ou MT4-MMP MMP-24 ou MT5-MMP MMP-25 ou MT6-MMP
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 MMP-28 ou EPILISINA

2.2 Clorexidina e *Epigallocatechin gallate* como inibidores de proteases

Além dos inibidores endógenos específicos (TIMPs), também são conhecidas algumas substâncias que podem exercer níveis de inibição sobre as MMPs, como é o caso da CHX e do EGCg (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006; GENDRON et al., 1999).

O EGCg é um polifenol que se constitui no mais importante princípio ativo do chá verde e tem uma atividade inibitória potente contra MT1-MMP, resultando na diminuição da ativação da proMMP-2 (como foi mencionado anteriormente, o MT1-MMP tem potencial de ativar a forma precursora da gelatinase A). Em adição, a MMP-2 e MMP-9, bem como a atividade da MMP-12 de macrófagos e neutrófilos, também foram diretamente inibidas pelo EGCg (DEMEULE et al., 2000; GARBISA et al., 2001; SARTOR et al., 2002). Acredita-se que o mecanismo de inibição esteja relacionado com o fato de que o EGCg parecer se ligar às collagenases por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, o que poderia causar alterações conformacionais ou mascarar o sítio catalítico (CHENG et al., 2003; MADHAN et al., 2007). É importante mencionar que o EGCg é um produto natural e sem efeitos colaterais. Tem sido relatado que é seguro para indivíduos adultos saudáveis ingerir até 16 xícaras de chá verde por dia, o que equivale a uma dose de 800 mg de EGCg em média (CHOW et al., 2003).

A CHX é uma substância usada como agente antimicrobiano que possui um amplo espectro de atividade contra as bactérias orais. É demonstrado que o bochecho de CHX é um eficaz adjunto para o tratamento periodontal, por controlar a placa supragengival e inflamações gengivais. Assim, o bochecho com CHX é largamente utilizado como profilaxia e tratamento de doenças periodontais. Quanto ao poder inibitório da CHX sobre as proteases, estudos mostram que ela tem o potencial de inibir as MMPs -2, -8 e -9, sendo a MMP-2 mais sensível e necessitando de menor quantidade de CHX para ocorrer sua total inibição (GENDRON et al., 1999). Em adição, foi demonstrado que a CHX é um potente inibidor das enzimas proteolíticas cisteína-catepsina encontradas no complexo dentino pulpar (SCAFFA et al., 2012). São elas outra classe de proteases com poder de degradação da MEC, a qual desempenha junto ou complementar papel em

eventos bioquímicos envolvidos na formação e degradação da matriz de dentina (CARRILHO, 2012). Acredita-se que o mecanismo de ação da CHX na inibição seja por quelação do cálcio, essencial à atividade catalítica da colagenase (GENDRON et al., 1999).

Em odontologia, tem sido demonstrado que o chá verde comercial (KATO et al., 2009), bem como seu princípio ativo, o EGCg, além da CHX (KATO et al., 2010), foram capazes de reduzir a erosão associada ou não à abrasão de dentina bovina em estudos *in situ*, sendo esse efeito atribuído aos efeitos de inibição da MMP e subsequente preservação da camada orgânica remanescente da superfície desmineralizada pelo desafio erosivo (KATO et al., 2012).

É descrito que a concentração inibitória mínima de CHX para inibir MMP-2 é de 0,0001% e para inibir MMP-9 é de 0,002%. Para o EGCg, a concentração inibitória mínima para inibir a MMP-2 e MMP-9 é de 0,00075% (DEMEULE et al., 2000; GENDRON et al., 1999; MAEDA-YAMAMOTO et al., 2003).

2.3 Resinas compostas: Suas limitações e perspectivas

As resinas compostas baseadas em dimetacrilatos e carga inorgânica revestida de silano foram introduzidas como restaurações dentárias no meio da década de 1960 (BOWEN, 1962). Entre várias modificações, o Bis-GMA diluído em TEGDMA é ainda o componente da matriz primária da maioria dos compósitos comerciais, embora não sem desvantagem. Clinicamente esses materiais ainda apresentam desvantagens que limitam sua aplicação, como uma resistência ao desgaste inferior (MOSZNER; SALZ, 2001), absorção de água, causando assim, deterioração gradual das propriedades mecânicas (FERRACANE, 2006), e contração de polimerização, o que leva à formação de uma fenda na interface dente-restauração e risco de cárie recorrente. Além disso, nenhum componente das resinas compostas possui atividade bacteriostática, e com isso tem sido demonstrado que elas acumulam mais bactérias ou placa do que os outros materiais restauradores (SVANBERG et al., 1990).

Na tentativa de produzir materiais bioativos capazes de inibir a colonização bacteriana e crescimento de bactérias cariogênicas, pesquisas têm sido conduzidas para a produção de compostos de resina pela adição de agentes

antimicrobianos, como a CHX. Já foi relatado ocorrer liberação de CHX da resina por difusão Fickiana (ANUSAVICE et al., 2006; LEUNG et al., 2005), reduzindo assim, o crescimento bacteriano na superfície (LEUNG et al., 2005). No entanto, estudos têm sugerido que incorporar CHX nas resinas pode dificultar o processo de polimerização e resultar num maior nível de monômeros residuais (RIGGS et al., 2000), levando a propriedades mecânicas inferiores (PRAKKI et al., 2007). É importante descrever que resinas reformuladas com baixos níveis de CHX (0,2% em peso) não apresentaram mudanças nas propriedades dos compostos experimentais, mas a liberação da droga e inibição do crescimento bacteriano foram escassas (SEHGAL et al., 2007). Por outro lado, quantidades maiores de liberação e inibição foram observadas com níveis mais altos (até ~30% em peso) de gluconato, diclorato e diacetato de clorexidina (JEDRYCHOWSKI et al., 1983; LEUNG et al., 2005). Nestes casos, altos níveis de monômeros residuais, perda de peso do material e mudanças em algumas propriedades mecânicas foram observadas.

A liberação da droga das resinas de dimetacrilato é um processo controlado e depende de fatores como o tipo de comonômero e hidrofobia (LEUNG et al., 2005), concentração e tipo de droga (LEUNG et al., 2005; RIGGS et al., 2000), e pH do meio (ANUSAVICE et al., 2006). Então, um balanço entre a concentração da droga e adequações das propriedades mecânicas deve ser realizado para assegurar a eficácia do material (PRAKKI et al., 2007).

Alguns estudos demonstraram que a exposição pelo 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). Autores sugerem que as MMPs da matriz de dentina mineralizada (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; MAZZONI et al., 2007) e saliva (VAN STRIJP, 2003) poderiam ter sido liberadas e ativadas durante o procedimento de condicionamento ácido, e seriam provavelmente responsáveis pela degradação do colágeno (LIU et al., 2011; PASHLEY et al., 2004; TJÄDERHANE et al., 2013).

Foi demonstrado em um estudo a atividade de MMPs gelatinases na camada híbrida por meio de testes zimográficos *in situ*, mostrando que as MMPs estavam localizadas dentro da camada híbrida e que elas têm uma alta atividade, devido à queda do pH na hora do tratamento. Os autores relataram ainda que a atividade da MMP-2 e -9 observada na camada híbrida é principalmente oriunda da

dentina intertubular (MAZZONI et al., 2012). Essas enzimas degradariam a parte inferior da camada híbrida (CARRILHO et al., 2007a), assim aumentando significativamente o influxo do fluido dentinário, desta maneira, incrementando a degradação hidrolítica tanto do adesivo (CARRILHO et al., 2005), quanto do colágeno das demais partes da camada híbrida (GARCIA-GODOY et al., 2007).

Autores relatam que a aplicação de CHX pós condicionamento ácido, teria além do potencial antimicrobiano, o poder de inibir as proteases que poderiam ter sido ativadas por este tratamento, assim aumentando a longevidade da restauração (CARRILHO et al., 2010), pois a duração do material restaurador é diretamente dependente da ligação entre o material e os componentes do substrato (colágeno dentinário) (CARRILHO et al., 2007b).

Em estudo recente (PALLAN et al., 2012), foi demonstrada a incorporação de substâncias em copolímeros experimentais. Foram feitos vários testes para verificar as propriedades mecânicas do material e também a capacidade de liberação das substâncias (CHX e EGCg). Foram testadas 3 formulações de matriz primária diferentes, sendo o bis-GMA diluído em TEGDMA ou nos seus análogos CH₃bis-GMA ou CF₃bis-GMA. Também se avaliaram 3 quantidades diferentes de substância incorporada nesses copolímeros, sendo elas, 0,2; 1 e 2% em peso de CHX ou EGCg. Os melhores resultados de liberação das substância ocorreram para o grupo bis-GMA diluído em TEGDMA. Em relação às propriedades, o melhor grupo foi para os copolímeros contendo 1% em peso, o qual, além de manter as propriedades mecânicas levou à liberação dos princípios ativos em quantidades superiores à concentração inibitória mínima para as MMPs -2 e -9.

Uma vez que um dos maiores problemas em odontologia restauradora é a recorrência de cárie sob procedimentos restauradores adesivos e a erosão, se as resinas contendo EGCg, CHX ou ambas as substâncias liberarem concentrações mínimas para inibição das MMPs, preservando-se as suas características e propriedades mecânicas, elas poderiam ser utilizadas como substitutas de dentina em procedimentos restauradores ou em compostos adesivos, aumentando sobremaneira a longevidade do tratamento restaurador.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Com base no exposto, o objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar o potencial de inibição de MMP-2 e MMP-9 a partir do EGCg, CHX ou a combinação de ambos incorporados em resinas experimentais e liberados destas.

As hipóteses nulas testadas foram:

- O EGCg liberado a partir de resina experimental não é capaz de inibir a MMP-2;
- O EGCg liberado a partir de resina experimental não é capaz de inibir a MMP-9;
- A CHX liberada a partir de resina experimental não é capaz de inibir a MMP-2;
- A CHX liberada a partir de resina experimental não é capaz de inibir a MMP-9.
- A combinação de EGCg e CHX liberados a partir de resina experimental não é capaz de inibir a MMP-2.
- A combinação de EGCg e CHX liberados a partir de resina experimental não é capaz de inibir a MMP-9.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

Bis-GMA, TEGDMA, DMAEMA, CHX, EGCg (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EUA), canforoquinona (agente fotossensibilizador; CQ; Kerr Corp., Orange, CA, EUA), foram utilizados para confecção dos espécimes experimentais.

4.1.1 Formulação dos comonômeros

A proporção entre Bis-GMA e TEGDMA foi de 70/30 em mol%. Foram formuladas resinas sem nenhum princípio ativo (placebo), contendo em sua composição CHX ou EGCg, a 1 % ou a combinação de ambos a 0,5% em peso. As resinas foram ativadas por luz de polimerização visível (Demi LED, Kerr Co., Middleton, WI, EUA 540 mW/cm²) pela adição de canforoquinona e dimetilaminoetil metacrilato (0,2 % em peso) (PALLAN et al., 2012).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo dos corpos de prova

O preparo dos corpos de prova foi realizado no departamento de Odontologia Restauradora da Universidade de Toronto, Canadá, pela Professora Anuradha Prakki, colaboradora deste estudo e pelo aluno Bruno Lara Zarella, autor deste estudo.

Comonômeros não polimerizados foram delicadamente inseridos em matrizes de acrílico com o auxílio de uma espátula, evitando a formação de bolhas. Em cada superfície da moldeira foi colocada uma fita de poliéster, para que o

comonômero não extravasasse. Os espécimes foram então polimerizados por 40 s em cada superfície (7mm diâmetro por 2mm de altura) (PALLAN et al., 2012).

Os espécimes foram retirados das matrizes e acondicionados em um frasco, protegidos de luz e umidade, em temperatura ambiente, até o momento de sua utilização, com o intuito de evitar liberação prematura de drogas ou danos aos espécimes (Fig.1).

Fig. 1a- Matrizes utilizadas.

Fig. 1b- Inserção do copolímero nas matrizes.

Fig. 1d- Fotopolimerização dos espécimes.

Fig. 1c- Proteção da superfície com fita de poliéster.

Fig. 1e- Retirada do espécime da matriz.

Fig. 1f- Armazenamentos dos espécimes.

Figura 1 – Preparo e acondicionamento dos corpos de prova

4.2.2 Liberação de drogas

Os espécimes foram individualmente acondicionados em tubos plásticos do tipo J-10, contendo 1 mL de água deionizada. Os espécimes ficaram imersos por 24 h a 37°C (Orion 502, Fanen, São Paulo, Brasil), sob constante agitação para efetivar a liberação das drogas. A concentração de CHX liberada em água foi de $2,18 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de resina (8,74%). Quanto ao material contendo EGCg, a concentração liberada em água foi de $0,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de resina (2,6%) A solução resultante foi então concentrada 10X (Eppendorf Concentrator Plus, Hamburgo, Alemanha) e armazenada até o momento de sua utilização (Fig.2).

Fig. 2a – Espécimes individualmente acondicionados em tubos J-10.

Fig. 2b- Adicionados 1mL de H₂Od em cada tubo.

Fig. 3d- Levados a estufa a 37° por 24h sob constante agitação.

Fig. 2c- Tubos hermeticamente fechados.

Fig. 2e- Solução resultante foi então concentrada 10X.

Figura 2 – Liberação de drogas dos corpos de provas e posterior concentração

4.2.3 Análise zimográfica

4.2.3.1 Zimografia

Zimografia é uma eletroforese que leva como substrato a gelatina, a qual é polimerizada juntamente com a acrilamida no gel de separação. Esta técnica é simples, sensível e confiável para a detecção de atividade proteolítica. Diferente das outras eletroforeses, a zimografia tem como resultado a visualização de bandas formadas através da degradação da gelatina pela protease (MMPs gelatinases), as quais quanto mais brancas (sem incorporação do corante) podem ser consideradas com maior nível de atividade (LAEMMLI, 1970; LEBER; BALKWILL, 1997; Snoek-VAN BEURDEN; VON DEN HOFF, 2005). As endopeptidases são separadas sob condições não redutoras, as quais são desnaturadas pelo SDS e renaturadas pelo tampão de incubação após a total remoção do SDS por um detergente (geralmente o TRITON X -100 ou Tween 80), fazendo assim um processo de desnaturação renaturação (KLEINER; STETLER-STEVENSON, 1994).

4.2.3.2 Preparação do gel de zimografia

Primeiramente, o gel de separação foi colocado entre as placas de vidro com o auxílio de uma pipeta e aguardado o período de 30 min para sua polimerização em temperatura ambiente. O gel de poliacrilamida contém gelatina como substrato, possibilitando assim, a análise de degradação por proteases.

Em seguida, o gel de largada foi então 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.

O pente utilizado nessa análise foi fornecido pelo próprio kit de eletroforese contendo 10 poços e espaçamento de 1,0 mm (Mini-PROTEAN 3 System, Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, EUA). A composição do gel de poliacrilamida está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 - Descrição da composição do gel de poliacrilamida.

Reagente/ Solução	Gel de Separação a 11%	Gel de Largada a 4%
Água deionizada (H ₂ O _d)	2120 µL	2970 µL
30% Acrilamida + 0,8% Bisacrilamida	2920 µL	670 µL
Tampão gel de Separação (Tris Cl) pH 8,8	2000 µL	-----
Tampão gel de Largada (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

4.2.3.3 Preparo das amostras

Em 3 µL da solução concentrada foram adicionados 9 µL ou 12 µL das enzimas recombinantes MMP-2 ou MMP-9, respectivamente. As amostras foram incubadas por 2 h a 26°C. No momento da inserção no gel, adicionaram-se 4 µL de Sample Buffer.

4.2.3.4 Inserção das amostras

O padrão de peso molecular (Pre stained SDS-PAGE Standards – Low Range, Cat n. 161-0305, Control 300002319. BIO-RAD Laboratories Inc, CA, EUA)

utilizado foi inserido no primeiro poço, calibrado com os pesos moleculares descritos na figura 5 que se segue.

As zimografias foram padronizadas das seguintes formas (Fig. 3,4):

Zimografia contendo os grupos iniciais (Fig.3):

- Poço 1: Padrão de peso molecular.
- Poços 2 e 3: Controles positivos de MMP-2 e MMP-9, respectivamente.
- Poços 4 e 5: Amostras sem princípio ativo (Placebo) com MMP-2 ou MMP-9, respectivamente.
- Poços 6 e 7: Resina contendo EGCg 1% em peso mais MMP-2 ou MMP-9, respectivamente.
- Poços 8 e 9: Resina contendo CHX 1% em peso mais MMP-2 ou MMP-9, respectivamente.

Poço	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Amostra	MWM	MMP-2	MMP-9	Plac. + MMP-2	Plac. + MMP-9	EGCg + MMP-2	EGCg + MMP-9	CHX + MMP-2	CHX + MMP-9	Vazio

Figura 3 - Esquema de inserção das amostras nos poços do gel de zimografia contendo os grupos iniciais.

Zimografia contendo o grupo EGCg + CHX (Fig.4)

Poço 1: Padrão de peso molecular.

- Poços 2 e 3: Controles positivos de MMP-2 e MMP-9, respectivamente.
- Poços 4 e 5: Resina contendo CHX e EGCg 0,5% em peso cada mais MMP-2 ou MMP-9, respectivamente.

Poço	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Amostra	MWM	MMP-2	MMP-9	Vazio	EGCg/ CHX + MMP-2	EGCg/ CHX + MMP-9	Vazio	Vazio	Vazio	Vazio

Figura 4 - Esquema de inserção das amostras nos poços do gel de zimografia contendo o grupo EGCg+CHX.

The image shows a yellow label for Bio-Rad Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range. The label includes the Bio-Rad logo, the product name, and a table of protein standards with their molecular weights. At the bottom, it provides the catalog number and the Bio-Rad Laboratories address.

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 5 – Descrição do marcador de peso molecular

4.2.3.5 Corrida e incubação do gel

As amostras foram submetidas a eletroforese em condições não redutoras (KLEINER; STETLER-STEVENSON, 1994; LAEMMLI, 1970; LEBER; BALKWILL, 1997; SNOEK-VAN BEURDEN; VON DEN HOFF, 2005).

As corridas foram realizadas a 4°C em um sistema de separação proteica por eletroforese (Mini-PROTEAN 3 System, Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, EUA). A voltagem foi fixada em 110 V, e então iniciada a corrida, que levava cerca de 1 h e 45 min.

Após a eletroforese, o gel foi incubado por meia hora sob suave agitação a 22°C. O gel foi retirado das placas e transferido para um reservatório contendo 100 mL de tampão I (Tris HCl a 50 mM, 2,5% de Tween 80, 0,02%(peso/volume) de NaN_3), pH 7,5 a 22°C, e incubado, sob suave agitação por 30 min. Em seguida, a solução foi substituída pelo tampão II (Tris HCl a 50 mM, 2,5% de Tween 80, 0,02% (peso/volume) de NaN_3 , ZnCl_2 a 1 μM , CaCl_2 a 5 mM) e novamente agitada por mais 30 min. Por último, o gel era incubado por 24 h no tampão (TrisHCl a 50 mM, CaCl_2 a 5 mM, ZnCl_2 a 1 μM , 0,02% (peso/volume) de NaN_3), pH 7,5 a 37°C para se determinar a atividade das MMPs.

4.2.3.6 Coloração e descoloração do gel

Após o período de incubação, o tampão foi substituído por 100 mL de solução contendo 0,5% de *Coomassie Blue*, 30% de metanol, 10% de ácido acético por um período de 1 h. O corante foi então substituído por 100 mL de solução descorante (composta de: 30% de metanol, 10% de ácido acético) por um período de meia hora, e em seguida, o gel foi armazenado em água deionizada.

Os géis foram escaneados, utilizando-se o Image Scanner (Amersham Biosciences, Suécia). As áreas ocupadas pelas bandas referentes às MMPs 2 e 9 e suas pró-enzimas foram analisadas por densitometria (Kodak Molecular Imaging, Rochester, EUA, software 4,5). A porcentagem de inibição da atividade enzimática foi analisada em função dos grupos de resinas experimentais com seu controle. Cada gel foi feito em triplicata.

Fig. 6a – Inserção do gel de separação e sua posterior polimerização (~30min).

Fig. 6b – Inserção do gel de largada.

Fig. 6d – Corrida do gel com carga fixada em 110V por volta de 1h e 45min.

Fig. 6c – Inserção do pente contendo 10 poços no gel de largada e sua posterior polimerização (~30min).

Fig. 6e – Incubação dos géis em estufa a 37°C por 24h.

Fig. 6f – Coloração e descoloração dos géis para sua posterior análise densitométrica.

Figura 6 – Esquema demonstrando preparação do gel de zimografia, corrida e sua coloração e descoloração para posterior análise densitométrica.

4.2.4 Ensaio enzimático

O ensaio enzimático EnzChek[®] é um kit de rápida, alta sensibilidade e conveniente para a quantificação de atividade de gelatinases e collagenases (teste de atividade de gelatinases e collagenases) ou para seus inibidores (teste com

inibidores). O kit contém como substrato DQTM gelatina, com fluorescência conjugada. Este substrato é eficientemente conjugado pela maioria, se não, por todas as gelatinases e collagenases e produz peptídeos altamente fluorescentes. O aumento da fluorescência é proporcional à atividade proteolítica e pode ser monitorado por leitura de fluorescência em microplaca, mini fluorímetro ou fluorímetro padrão.

O kit é composto por DQ gelatina de pele suína; tampão de reação 10X; 1,10- fenantrolina monohidratada; collagenase tipo IV de *Clostridium Histolyticum*. Cada kit contém reagente suficiente para 250-2000 ensaios, variando de acordo com a concentração do substrato utilizado em cada reação.

4.2.4.1 Preparo das soluções

4.2.4.1.1 DQ gelatina

A cada tubo que continha 1 mg de DQ gelatina, foi adicionado 1 mL de água deionizada. Então, o tubo foi agitado com a utilização de ultrassom de banho de água por 5 min e aquecido a 50°C (Ultracleaner 1600 A, Indaiatuba, Brasil). Para cada dia de ensaio foi utilizado um tubo do kit, a fim de evitar uma perda significativa de fluorescência, a qual prejudicaria o resultado dos ensaios.

4.2.4.1.2 Tampão 1X

Foram diluídos 2 mL do tampão de reação 10x fornecido, em 18 mL de água deionizada. Esse preparo era suficiente para trabalhar com ao menos cinquenta ensaios de 200 µL e para realizar as diluições e preparo das soluções de trabalho.

4.2.4.1.3 1,10- Fenantrolina monohidratada

Foram pesados 9,9 mg da 1,10-fenantrolina monohidratada fornecida no kit, que foi diluída em 25 μ L de etanol. Desta solução inicial, 10 μ L foram diluídos em 2 mL de tampão de reação 1X. A nova solução foi acondicionada em tubo hermeticamente fechado, protegido da luz e em temperatura ambiente controlada, para evitar a evaporação do etanol.

4.2.4.1.4 Colagenase tipo IV

Para este preparo foi feito uma modificação do protocolo recomendado pelo fabricante, com a finalidade de aumentar a quantidade de solução pipetada para cada poço, com o intuito de diminuir a probabilidade de erro. O tubo proveniente do kit, contendo 500 U de colagenase foi diluído em 500 μ L de água deionizada, assim ficando em uma concentração de 1000 U/mL. Posteriormente, foram diluídos 5 μ L desta solução em 5 mL de água deionizada, ficando assim uma solução com concentração de 1 U/mL.

4.2.4.2 Inserção das amostras

As amostras foram inseridas nas microplacas contendo 96 poços (TPP®, Suíça). Adotou-se uma disposição padrão para todos os ensaios (Fig. 5,6). As soluções foram inseridas, deixando apenas a inserção da colagenase tipo IV de *Clostridium histolyticum* por último, para evitar uma reação precoce, fazendo com que houvesse uma diferença significativa entre a primeira e última amostra.

As amostras a serem testadas, as quais eram provenientes da solução concentrada 10X, foram inseridas em 5 volumes diferentes (01 μ L, 05 μ L, 10 μ L, 40 μ L e 80 μ L), a fim de evidenciar um efeito dose-resposta na inibição. A Figura 5 e 6 mostram a disposição padrão adotada das amostras nas microplacas.

As soluções foram inseridas nos poços seguindo as recomendações do fabricante. A concentração de colagenase adotada para as amostras a serem testadas foi a mesma usada no padrão 3 e para o controle negativo (0,2 U/mL), por

ter apresentado uma fluorescência intermediária num estudo piloto. A tabela 3 mostra todos os reagentes empregados no ensaio, com os respectivos volumes. O volume final de reação foi de 200 μ L. Os ensaios foram conduzidos em sextuplicata.

4.2.4.3 Leitura das amostras

As amostras foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente e analisadas utilizando-se leitor de microplacas (Synergy™ Mx Monochromator-Based Multi-Mode da Bio-Tek Instruments, EUA) com as seguintes especificações:

- Sensibilidade em 50.
- Leitura em 495 nm +/- 9; 515 +/- 9;
- Leitura top;
- Agitação de 20 s com velocidade média.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	Blank	Plac.	Plac.	Plac.	Plac.	Plac.	Plac.	Plac.	Plac.	Plac..
B	STD1	STD1	STD1	Plac.	Plac.	Plac.	Plac.	Plac.	Plac.	Plac.	Plac.	Plac.
C	STD2	STD2	STD2	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX
D	STD3	STD3	STD3	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX
E	STD4	STD4	STD4	EGCg	EGCg	EGCg	EGCg	EGCg	EGCg	EGCg	EGCg	EGCg
F	Con -	Con -	Con -	EGCg	EGCg	EGCg	EGCg	EGCg	EGCg	EGCg	EGCg	EGCg
G				CHX/ EGCg	CHX/ EGCg	CHX/ EGCg	CHX/ EGCg	CHX/ EGCg	CHX/ EGCg	CHX/ EGCg	CHX/ EGCg	CHX/ EGCg
H				CHX/ EGCg	CHX/ EGCg	CHX/ EGCg	CHX/ EGCg	CHX/ EGCg	CHX/ EGCg	CHX/ EGCg	CHX/ EGCg	CHX/ EGCg

Figura 7. Disposição padrão adotada das amostras na microplaca. Leitura de partida calibrada pelo blank; concentração padrão 1 de 0,05 U/mL (STD1); concentração padrão 2 de 0,1 U/ml (STD2); concentração padrão 3 de 0,2 U/mL (STD 3); concentração padrão 4 de 0,5 U/mL (STD4); controle negativo contendo concentração de 0,2 U/mL de collagenase adicionado de 1,10- fenantrolina monohidratada (Con -); grupos contendo soluções concentradas 10X, grupo placebo (Plac.), grupo clorexidina (CHX), grupo *Epigallocatechin gallate* (EGCg) e grupo clorexidina e *Epigallocatechin gallate* (CHX/EGCg) nos 4 volumes diferentes, a saber: grupo de 1 μ L, grupo de 5 μ L, grupo de 10 μ L, todos contendo concentração de 0,2 U/mL de collagenase.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	Blank	Plac.	Plac.	Plac.	Plac.	Plac.	Plac.			
B	STD1	STD1	STD1	Plac.	Plac.	Plac.	Plac.	Plac.	Plac.			
C	STD2	STD2	STD2	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX			
D	STD3	STD3	STD3	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX			
E	STD4	STD4	STD4	EGCg	EGCg	EGCg	EGCg	EGCg	EGCg			
F	Con -	Con -	Con -	EGCg	EGCg	EGCg	EGCg	EGCg	EGCg			
G				CHX/ EGCg	CHX/ EGCg	CHX/ EGCg	CHX/ EGCg	CHX/ EGCg	CHX/ EGCg			
H				CHX/ EGCg	CHX/ EGCg	CHX/ EGCg	CHX/ EGCg	CHX/ EGCg	CHX/ EGCg			

Figura 8. Disposição padrão adotada das amostras na microplaca. Leitura de partida calibrada pelo blank; concentração padrão 1 de 0,05 U/mL (STD1); concentração padrão 2 de 0,1 U/ml (STD2); concentração padrão 3 de 0,2 U/mL (STD 3); concentração padrão 4 de 0,5 U/mL (STD4); controle negativo contendo concentração de 0,2 U/mL de collagenase adicionado de 1,10- fenantrolina monohidratada (Con -); grupos contendo soluções concentradas 10X, grupo placebo (Plac.), grupo clorexidina (CHX), grupo *Epigallocatechin gallate* (EGCg) e grupo clorexidina e *Epigallocatechin gallate* (CHX/EGCg) nos 4 volumes diferentes, a saber: grupo de 40 µL, grupo de 80 µL, todos contendo concentração de 0,2 U/mL de collagenase.

4.2.5 Análise dos dados

Os dados relativos à atividade média da collagenase tipo IV de *Clostridium histolyticum* na presença de diferentes quantidades de inibidores liberados a partir das resinas passaram nos testes de homogeneidade (Bartlett) e normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e foram avaliados por ANOVA a 2 critérios, seguida pelo teste de Bonferroni para comparações individuais. Foi utilizado o *software* GraphPad Prism (versão 4,0 para *Windows*, GraphPad Inc., La Jolla, CA, EUA).

A porcentagem de inibição nos grupos experimentais foi calculada tomando-se como referência o grupo placebo no respectivo volume (100%), a fim de desprezar qualquer efeito inibitório de outros componentes presentes na composição da resina, como por exemplo o TEGDMA (DE CARVALHO et al., 2011).

Tabela 3 - Esquema mostrando todos os grupos e todas as soluções inseridas nas amostras, contendo a quantidade de cada solução em cada grupo.

	Tampão 1X	Gelatina	Colagenase	Fenantrolina	Amostra
Blank	180 µL	20 µL	0	0	0
Padrão 1	170 µL	20 µL	10 µL	0	0
Padrão 2	160 µL	20 µL	20 µL	0	0
Padrão 3	140 µL	20 µL	40 µL	0	0
Padrão 4	80 µL	20 µL	100 µL	0	0
Controle negativo	130 µL	20 µL	40 µL	10 µL	0
Placebo 1	139 µL	20 µL	40 µL	0	1 µL
CHX 1	139 µL	20 µL	40 µL	0	1 µL
EGCg 1	139 µL	20 µL	40 µL	0	1 µL
CHX/EGCg 1	139 µL	20 µL	40 µL	0	1 µL
Placebo 2	135 µL	20 µL	40 µL	0	5 µL
CHX 2	135 µL	20 µL	40 µL	0	5 µL
EGCg 2	135 µL	20 µL	40 µL	0	5 µL
CHX/EGCg 2	135 µL	20 µL	40 µL	0	5 µL
Placebo 3	130 µL	20 µL	40 µL	0	10 µL
CHX 3	130 µL	20 µL	40 µL	0	10 µL
EGCg 3	130 µL	20 µL	40 µL	0	10 µL
CHX/EGCg 3	130 µL	20 µL	40 µL	0	10 µL
Placebo 4	100 µL	20 µL	40 µL	0	40 µL
CHX 4	100 µL	20 µL	40 µL	0	40 µL
EGCg 4	100 µL	20 µL	40 µL	0	40 µL
CHX/EGCg 4	100 µL	20 µL	40 µL	0	40 µL
Placebo 5	60 µL	20 µL	40 µL	0	80 µL
CHX 5	60 µL	20 µL	40 µL	0	80 µL
EGCg 5	60 µL	20 µL	40 µL	0	80 µL
CHX/EGCg 5	60 µL	20 µL	40 µL	0	80 µL

Fig. 9a- Preparo das soluções do kit enzimático (na foto, ultrassom aquecido utilizado para preparo da gelatina).

Fig. 9b- Inserção das soluções nas microplacas, deixando apenas a inserção da colágenase tipo IV de *Clostridium histolyticum* por último, para evitar uma reação precoce.

Fig. 9d- As microplacas foram protegidas com papel alumínio durante seu período de incubação.

Fig. 9c- Microplacas prontas para leitura.

Fig. 9f- Leitura das placas

Figura 9 – Preparo das soluções, inserção e leitura das amostras

5 Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desde seu surgimento, por volta de 1960 (BOWEN,1962), as resinas tiveram um enorme avanço e desenvolvimento, mas ainda apresentam deficiências, como o caso de adesão bacteriana na superfície (SVANBERG et al., 1990) e pequeno tempo de durabilidade inferior ao amálgama de prata (FERRACANE, 2011). Para tentar melhorar as propriedades biológicas desses materiais, estudos recentes são conduzidos para incorporar componentes biologicamente ativos, que tenham atividades antimicrobianas e antiproteolíticas, a fim de tentar diminuir a adesão bacteriana na superfície (LEUNG et al., 2005) e aumentar a longevidade do procedimento restaurador.

A fragilidade da camada híbrida é um dos grandes problemas encontrados, pois sua falha afeta a durabilidade da restauração. Nesta região, podemos encontrar dois grandes problemas: a degradação da resina infiltrada e/ou a degradação do colágeno (CARRILHO et al., 2007b, PASHLEY et al., 2004). Estes problemas vêm sendo solucionados com o emprego da CHX, tanto aplicada topicamente quanto incorporada em sistemas restauradores, o que tem demonstrado aumentar a longevidade da adesão (CARRILHO et al., 2007ab; CARRILHO et al., 2010).

No passado, acreditava-se que a CHX fosse apenas uma substância com capacidade antimicrobiana. Assim, seu uso em cavidades era feito com o intuito de desinfecção do local (GOHO; AARON, 1992). Hoje já é sabido que a CHX, além de ser um potente agente antimicrobiano, tem também grande poder antiproteolítico (GENDRON et al., 1999).

É relatado que a degradação do colágeno na camada híbrida é devida à ativação das MMPs presentes em dentina pelo condicionamento ácido (LIU et al., 2011; PASHLEY et al., 2004; TJÄDERHANE et al., 2013). Assim, o aumento da longevidade do material após o uso de CHX poderia ser diretamente ligado à inibição dessas proteases pela CHX, aumentando a longevidade dessa adesão e consequentemente da restauração (CARRILHO et al., 2010).

Vários trabalhos (PALLAN et al., 2012; LEUNG et al., 2005; JEDRYCHOWSKI et al., 1983) desde algum tempo relatam ter incorporado CHX em resinas. Estes trabalhos, além de verificar a possibilidade da incorporação da substância, avaliaram as propriedades mecânicas do material, para verificar se a não prejudica estas propriedades.

Porém, o uso de CHX pode ter algumas desvantagens. A CHX é uma substância sintética e seu uso é associado ao manchamento e descoloração das estruturas dentárias, além de ser um potente agente antimicrobiano e por conta sua utilização pode estar associada à indução de resistência bacteriana.

Em virtude dessas desvantagens, seria muito interessante achar alternativas que ao mesmo tempo fossem tão eficazes quanto a CHX, mas que não estivessem ligadas a essas desvantagens. Uma destas alternativas seriam os polifenóis encontrados na folha do chá verde. Estudos avaliaram os principais polifenóis, e dentre eles, o EGCg foi o que mostrou melhor eficácia antimicrobiana e antiproteolítica (DEMEULE et al., 2000). Algo importante de citar é que esta substância, além de ser potente contra bactérias e proteases, é um produto natural, o que representa uma outra vantagem em relação à CHX, que é um produto sintético.

Nosso grupo avaliou em estudos prévios que a incorporação de CHX e EGCg em resinas sem afetar suas propriedades mecânicas é algo possível. Além de se avaliarem as mudanças nas propriedades (propriedades mecânicas, grau de conversão, sorção de água e solubilidade), foi mensurada a quantidade de liberação das drogas por um período de 28 dias. Os níveis de liberação acumulados de EGCg por 28 dias foram de $5,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Os níveis correspondentes para a CHX foram de $7,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (PALLAN, et al., 2012). A concentração mínima de CHX para inibir a MMP-2 é de 0,0001%, enquanto que para a MMP-9 é de 0,002% (GENDRON et al., 1999), enquanto que para o EGCg, a concentração é de 0,00075%, tanto para a MMP-2 quanto para a MMP-9 (DEMEULE et al., 2000). Os resultados do presente estudo mostram que a quantidade de EGCg e CHX liberadas a partir dos corpos de prova foram suficientes para inibir a MMP-2 e a MMP-9, bem como a collagenase de *Clostridium histolyticum*. As Figuras 10 a 15 mostram o resultado do gel piloto

e réplicas dos grupos iniciais e grupo contendo a combinação de EGCg e CHX. Na análise dos géis, podemos verificar que em todos os grupos houve redução na degradação da gelatina (Poços 4 a 9), mostrando assim que houve liberação das substâncias das resinas experimentais e que essas substâncias liberadas foram capazes de inibir a atividade das MMPs, tanto para a forma pró, quanto a forma ativa de ambas as MMPs testadas (MMP-2 e MMP-9).

Figura 10 - Gel de zimografia demonstrando a inibição da atividade de MMP-2 e MMP-9 pela CHX ou EGCg liberados do comonômero à base de Bis-GMA/TEGDMA.

Figura 11 - Réplica I de gel de zimografia demonstrando a inibição da atividade de MMP-2 e MMP-9 pela CHX ou EGCg liberados do comonômero a base de Bis-GMA/TEGDMA.

Figura 12 - Réplica II de gel de zimografia demonstrando a inibição da atividade de MMP-2 e MMP-9 pela CHX ou EGCg liberados do comonômero a base de Bis-GMA/TEGDMA.

Figura 13 - Gel de zimografia demonstrando a inibição da atividade de MMP-2 e MMP-9 pela CHX e EGCg liberados do comonômero à base de Bis-GMA/TEGDMA.

Figura 14 - Réplica I de gel de zimografia demonstrando a inibição da atividade de MMP-2 e MMP-9 pela CHX e EGCg liberados do comonômero a base de Bis-GMA/TEGDMA.

Figura 15 - Réplica II de gel de zimografia demonstrando a inibição da atividade de MMP-2 e MMP-9 pela CHX e EGCg liberados do comonômero a base de Bis-GMA/TEGDMA.

A densitometria dos géis (Fig. 16) revelou que as maiores porcentagens de inibição (45%) foram encontradas para a CHX, tanto para as formas pró quanto ativas de MMP-2 e MMP-9. As porcentagens de inibição foram maiores para a MMP-2 que para a MMP-9, independentemente do inibidor testado. 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 16 - Inibição das formas pró e ativa das MMPs -2 e -9 por soluções liberadas a partir de resinas experimentais contendo ou não CHX 1%, EGCg 1% ou combinação de ambos (0,5% cada). A escala representa a média de inibição quando comparados aos respectivos controles não tratados (positivos), mensurados como bandas eletroforéticas de géis escaneados (n=3). O volume de solução adicionado foi de 5 μ L.

A análise do perfil de atividade da collagenase na presença de diferentes volumes (1, 5, 10, 40 ou 80 μ L) de soluções liberadas a partir das resinas experimentais (concentrada 10 vezes), utilizando o kit *EnzCheck® gelatinase/collagenase assay* está mostrada na tabela 4. O limite de detecção estimado foi de 3×10^{-4} U/mL, e as curvas de calibração, feitas com padrões contendo entre 0,05 e 0,5 U/mL tiveram $r^2 > 0,99$. Os ensaios de inibição foram feitos utilizando-se uma concentração de collagenase de 0,2 U/mL. 1,10-fenantrolina 10 mM (10 μ L) foi utilizada como um inibidor geral da atividade de metaloproteinases, de acordo com o fabricante. A ANOVA a 2 critérios revelou diferença significativa entre os tipos de soluções ($F=196,7$, $p < 0,0001$), entre os volumes utilizados no ensaio ($F=348,8$, $p < 0,0001$), tendo havido interação significativa entre estes critérios ($F=15,06$, $p < 0,0001$). Foi observado que, no menor volume de solução empregado (1 μ L), o EGCg, e sua combinação com a CHX foram capazes de reduzir significativamente a atividade da collagenase em relação ao placebo e CHX. Entretanto, conforme o volume de solução empregado no ensaio aumentou, a maior redução na atividade da collagenase passou a ser observada para o grupo da CHX, e sua

combinação com EGCg, sem diferença entre ambos. Em geral, foi observada uma menor atividade de collagenase com o aumento do volume de solução empregada no ensaio, para todos os grupos. Para o grupo da CHX e sua combinação com EGCg, já a partir de 40 µL de solução, não foi possível detectar a atividade da collagenase. Assim, pode-se inferir que a combinação CHX/EGCg foi mais eficaz, por levar à maior redução na atividade da collagenase, independentemente do volume de solução empregado nos testes. Pode-se dizer que isto se deveu principalmente à ação do EGCg nos volumes menores, e à ação da CHX nos volumes maiores. Não foi possível observar uma inibição completa da atividade da collagenase quando se empregou o EGCg pois, no ensaio utilizado, o maior volume possível de amostra que pode ser inserido é 80 µL.

Tabela 4 - Atividade média da collagenase tipo IV de *Clostridium histolyticum* na presença de diferentes quantidades de inibidores liberados a partir de reinas experimentais.

Volume (µL)	Placebo	CHX	EGCg	EGCg/CHX
1	0,197± 0,008 ^{Aa}	0,178± 0,012 ^{Aa}	0,151± 0,012 ^{Ba}	0,130± 0,013 ^{Ba}
5	0,192± 0,005 ^{Aa}	0,153± 0,015 ^{Bb}	0,143± 0,008 ^{Ba}	0,115± 0,010 ^{Cab}
10	0,182± 0,006 ^{Aa}	0,130± 0,013 ^{Bb}	0,113± 0,041 ^{Ba}	0,100± 0,008 ^{Cb}
40	0,129± 0,037 ^{Ab}	0 ^{Bc}	0,103± 0,011 ^{Cb}	0 ^{Bc}
80	0,103± 0,011 ^{Ac}	0 ^{Bc}	0,036± 0,040 ^{Cc}	0 ^{Bc}

A atividade foi avaliada utilizando-se o kit *EnzCheck® gelatinase/collagenase assay*, empregando-se 0,2 U/mL de collagenase. 1,10-fenantrolina foi utilizado como inibidor padrão (inibição de 100% da atividade). Letras maiúsculas distintas nas mesmas linhas indicam diferença significativa entre os tipos de soluções; letras minúsculas distintas nas mesmas colunas indicam diferença significativa entre os volumes de soluções (ANOVA e Bonferroni, $p < 0,05$. $n = 6$)

Conforme pode ser visto na Tabela 4, quando se aumenta o volume de solução placebo há uma redução na atividade da collagenase, chegando a cerca de 50% da atividade observada para o volume de 1 μL , em relação ao padrão contendo também 0,2 U/mL de concentração de collagenase, o qual apresentou atividade média de 0,219. Por conta disto, a porcentagem de inibição nos grupos experimentais no ensaio imunológico foi calculada tomando-se como referência o grupo placebo no respectivo volume (100%) (Fig. 11), a fim de desprezar qualquer efeito inibitório de outros componentes presentes na composição da resina, como por exemplo, o TEGDMA (DE CARVALHO et al., 2011). As porcentagens de inibição calculadas são observadas na Fig. 11. Em geral, a porcentagem de inibição foi crescente de acordo com o aumento do volume de solução empregado. Entretanto, o perfil encontrado para a CHX, foi diferente daquele observado para o EGCg. No menor volume empregado (1 μL), houve apenas cerca de 10% de inibição quando a CHX foi empregada, enquanto que o valor correspondente para o EGCg foi de 23%. Entretanto, com o aumento do volume empregado houve um aumento proporcionalmente maior de inibição para o grupo da CHX, que com 10 μL inibiu cerca de 30% da atividade da collagenase, e com 40 μL inibiu completamente esta atividade. Já a dose-resposta para EGCg não foi tão pronunciada, sendo que praticamente não houve aumento da inibição até 40 μL , e com o maior volume empregado a inibição foi da ordem de 65%. Como mencionado anteriormente, não é possível conduzir este ensaio com volume maior de solução contendo inibidor. Já o grupo CHX/EGCg comportou-se literalmente como uma combinação de ambos os inibidores (efeito sinérgico), e os percentuais de liberação foram, grosseiramente, a soma daqueles percentuais encontrados para o EGCg e a CHX individualmente. É importante mencionar que o material contendo a combinação CHX/EGCg tinha 0,5% de cada um destes agentes, enquanto que a resina contendo só CHX ou apenas EGCg tinha 1% destes agentes. Estes resultados sugerem que, caso se opte por um material com apenas um dos inibidores, sua concentração poderia ser reduzida para 0,5%, a fim de se ter melhores propriedades mecânicas. Há vários estudos relatando que quanto menor a concentração de substâncias incorporadas em resinas, mais estáveis são suas propriedades mecânicas (ANUSAVICE et al.,

2006; PALLAN et al., 2012). Entretanto, um material contendo ambos os agentes parece ser mais efetivo para a inibição, devido ao sinergismo entre os inibidores, com ação potencialmente maior do EGCg nos volumes menores, e da CHX nos volumes maiores.

Uma pergunta que pode surgir quando se pensa na utilização de resinas contendo EGCg ou CHX para reduzir a degradação da camada híbrida é se os ativos liberados chegam a atingir esta camada, uma vez que existe o sistema adesivo interposto entre o material e a estrutura dentária. Embora ainda não seja completamente investigado, as razões que suportam a eficácia biológica das resinas contendo drogas contra a degradação da camada híbrida, são que os monômeros nos sistemas adesivos, como o HEMA e especialmente os monômeros ácidos, são extremamente hidrofílicos e permeáveis (TAY et al., 2004a; TAY et al., 2004b). Além disso, a quantidade de resina em uma restauração clínica (~2- 4mm) é muito maior quando comparada com a camada muito fina de adesivo (~100- 250µm). Se a resina está incorporada com drogas pode-se supor que pode haver migração da droga para a dentina devido a diferenças no gradiente osmótico entre as duas camadas monoméricas (resina restaurativa e sistema adesivo). Isso reduz a liberação da droga, provavelmente devido a uma difusão retardada, como mostrado em estudos que avaliaram a liberação de drogas em resinas revestidas (HUANG et al., 2000; RHODES; PORTER, 1998), que simula a camada de ligação suplementar normalmente colocado entre o material restaurador e da estrutura do dente. Este atraso é devido a mudanças na estrutura e comprimento do trajeto de difusão para a liberação da droga (TALLURY et al., 2007).

Os resultados do presente trabalho mostraram que, *in vitro*, a liberação de EGCg e CHX incorporados em resinas é capaz de reduzir a atividade gelatinolítica das MMPs -2 e -9, bem como a atividade da collagenase bacteriana, sugerindo um efeito potencial no aumento da longevidade de restaurações de resinas. Entretanto, são necessários estudos adicionais para testar, inicialmente *in vitro*, se estes materiais são capazes de reduzir a degradação do colágeno dentinário, mantendo a integridade da camada híbrida, para que no futuro possam ser feitos ensaios clínicos, definindo o protocolo de utilização dos materiais como substitutos de dentina.

Figura 17 - Porcentagem de inibição da atividade da collagenase tipo IV de *Clostridium histolyticum* na presença de diferentes quantidades de inibidores liberados a partir de resinas experimentais. A porcentagem de inibição nos grupos experimentais foi calculada tomando-se como referência o grupo placebo no respectivo volume (100%), a fim de desprezar qualquer efeito inibitório de outros componentes presentes na composição da resina. As barras indicam desvio-padrão. n=6.

7 Conclusões

6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo suportam a rejeição de todas as hipóteses nulas testadas, uma vez que:

- O EGCg liberado a partir de resina experimental é capaz de inibir a MMP-2;
- O EGCg liberado a partir de resina experimental é capaz de inibir a MMP-9;
- A CHX liberada a partir de resina experimental é capaz de inibir a MMP-2;
- A CHX liberada a partir de resina experimental é capaz de inibir a MMP-9.
- A combinação de EGCg e CHX liberados a partir de resina experimental é capaz de inibir a MMP-2.
- A combinação de EGCg e CHX liberados a partir de resina experimental é capaz de inibir a MMP-9.

Com isso, podemos concluir que a liberação de EGCg e CHX a partir de resinas experimentais é possível e que estes ativos liberados são capazes de inibir as MMPs, assim podendo sugerir um novo substituto para dentina em procedimentos restauradores.

Referências

7 REFERÊNCIAS

- Anusavice K, Zhang N, Shen C. Controlled release of chlorhexidine from UDMA-TEGDMA resin. *J Dent Res* 2006;85(950-54.
- Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 19):3719-27.
- Bowen R. Dental filling material comprising vinyl silane treated fused silica and a binder consisting of the reaction product of bisphenol and glycidyl acrylate. US 1962.
- Buzalaf MA, Kato MT, Hannas AR. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. *Adv Dent Res* 2012;24(2):72-6.
- Carrilho M, Carvalho R, de Goes M, di Hipolito V, Geraldeli S, Tay F, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res* 2007a;86(90-94.
- Carrilho MR, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L, Carvalho RM. Mechanical stability of resin-dentin bond components. *Dent Mater* 2005;21(3):232-41.
- Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res* 2007b;86(6):529-33.
- Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Nicolau J, Breschi L, Mazzoni A, et al. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dent Mater* 2010;26(8):779-85.
- Carrilho MR. Can exogenous protease inhibitors control dentin matrix degradation? *J Dent Res* 2012;91(12):1099-102.
- 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.
- 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(1):126-32.
- 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(9):3312-9.
- de Carvalho RV, Ogliari FA, Marques MR, de Souza AP, Petzhold CL, Line SR, et al. Inhibition of the activity of matrix metalloproteinase 2 by triethylene glycol dimethacrylate. *Clin Oral Investig* 2011;15(5):643-8.
- Demeule M, Brossard M, Pagé M, Gingras D, Béliveau R. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochim Biophys Acta* 2000;1478(1):51-60.

- Dickinson DP. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13(3):238-75.
- Ferracane J. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater* 2006;22(211-222).
- Ferracane JL. Resin composite--state of the art. *Dent Mater* 2011;27(1):29-38.
- 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):822-832.
- 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(2):109-13.
- 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(3):437-9.
- Goho C, Aaron GR. Enhancement of antimicrobial properties of cavity varnish: a preliminary report. *J Prosthet Dent* 1992;68(4):623-5.
- Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 2007;65(1):1-13.
- Huang J, Wong HL, Zhou Y, Wu XY, Grad H, Komorowski R, et al. In vitro studies and modeling of a controlled-release device for root canal therapy. *J Control Release* 2000;67(2-3):293-307.
- Jedrychowski JR, Caputo AA, Kerper S. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. *J Oral Rehabil* 1983;10(5):373-81.
- 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(6):560-4.
- Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MA. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. *J Dent Res* 2010;89(5):468-72.
- Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Calábria MP, Magalhães AC, Pereira JC, et al.. Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase. *J Dent Res* 2012;91(12):1119-23.
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994;218(2):325-9.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(259):680-685.

Leber TM, Balkwill FR. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal Biochem* 1997;249(1):24-8.

Leung D, Spratt DA, Pratten J, Gulabivala K, Mordan NJ, Young AM. Chlorhexidine-releasing methacrylate dental composite materials. *Biomaterials* 2005;26(34):7145-53.

Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, et al. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res* 2011;90(8):953-68.

Mach L, Mort JS, Glössi J. Maturation of human procathepsin B. Proenzyme activation and proteolytic processing of the precursor to the mature proteinase, in vitro, are primarily unimolecular processes. *J Biol Chem* 1994; 269(17):13030-5.

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(1):16-22.

Maeda-Yamamoto M, Suzuki N, Sawai Y, Miyase T, Sano M, Hashimoto-Ohta A, et al. Association of suppression of extracellular signal-regulated kinase phosphorylation by epigallocatechin gallate with the reduction of matrix metalloproteinase activities in human fibrosarcoma HT1080 cells. *J Agric Food Chem* 2003;51(7):1858-63.

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

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.

Mazzoni A, Nascimento FD, Carrilho M, Tersariol I, Papa V, Tjäderhane L, et al. MMP activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. *J Dent Res* 2012;91(5):467-72.

Moszner N, Salz U. New developments of polymeric dental composites. *Prog Polym Sci* 2001;26(535-576).

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

Obermajer N, Jevnikar Z, Doljak B, Kos J. Role of cysteine cathepsins in matrix degradation and cell signalling. *Connect Tissue Res* 2008;49(3):193-6.

- Pallan S, Furtado Araujo MV, Cilli R, Prakki A. Mechanical properties and characteristics of developmental copolymers incorporating catechin or chlorhexidine. *Dent Mater* 2012;28(6):687-94.
- Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci*; 2003;111(2):117-27.
- Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004; 83(3):216-21.
- Prakki A, Tallury P, Mondelli RF, Kalachandra S. Influence of additives on the properties of Bis-GMA/Bis-GMA analog comonomers and corresponding copolymers. *Dent Mater* 2007;23(10):1199-204.
- Rhodes CT, Porter SC. Coatings for controlled-release drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm* 1998;24(12):1139-54.
- Riggs P, Braden M, Patel M. Chlorhexidine release from room temperature polymerizing methacrylate systems. *Biomaterials* 2000;21(345-51).
- 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.
- Scaffa PM, Vidal CM, Barros N, Gesteira TF, Carmona AK, Breschi L, et al. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. *J Dent Res* 2012;91(4):420-5.
- Sehgal V, Shetty VS, Mogra S, Bhat G, Eipe M, Jacob S, et al. Evaluation of antimicrobial and physical properties of orthodontic composite resin modified by addition of antimicrobial agents--an in-vitro study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007;131(4):525-9.
- Snoek-Van Beurden PA, von Den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques* 2005;38(1):73-83.
- 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(6):1545-9.
- Svanberg M, Mjor I, Orstavik D. Mutans streptococci in plaque from margins of amalgam, composite and glass ionomer restorations. *J Dent Res* 1990;69(861-64).
- Tallury P, Alimohammadi N, Kalachandra S. Poly(ethylene-co-vinyl acetate) copolymer matrix for delivery of chlorhexidine and acyclovir drugs for use in the oral environment: effect of drug combination, copolymer composition and coating on the drug release rate. *Dent Mater* 2007;23(4):404-9.

Tay FR, Pashley DH, Garcia-Godoy F, Yiu CK. Single-step, self-etch adhesives behave as permeable membranes after polymerization. Part II. Silver tracer penetration evidence. *Am J Dent* 2004a;17(5):315-22.

Tay FR, Pashley DH, Suh B, Carvalho R, Miller M (2004b). Single-step, self-etch adhesives behave as permeable membranes after polymerization. Part I. Bond strength and morphologic evidence. *Am J Dent* 17(4):271-8.

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(3):475-81.

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(8):1622-9.

Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, et al. Optimizing dentin bond durability: Control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater* 2013;29(1):116-35.

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(1):58-65.

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

Bauru, 05 de maio de 2013.

Bruno Lara Zarella

Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf