UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

BRUNO LARA ZARELLA

Papel das proteases na erosão dentinária

BAURU
2017

BRUNO LARA ZARELLA

Papel das proteases na 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

BAURU
2017

Zarella, Bruno
Z18p Papel das proteases na erosão dentinária/
Bruno Lara Zarella. – Bauru, 2017.
83 p. : il. ; 31cm.

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

Orientador: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo
Buzalaf

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

Assinatura:

Data:18/01/2017

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 606.726
Data: 26/03/2014

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese primeiramente à Deus, o qual nos dá força para lutarmos todos os dias pelos nossos objetivos.

Dedico também à minha esposa, a qual tem me acompanhado e me dado força desde o primeiro dia trabalhando neste laboratório, muito obrigado por tudo, por sempre estar ao meu lado. Começamos na minha defesa de TCC em 2010 como namorados, passamos pela defesa da dissertação do mestrado como noivos e hoje estamos aqui na defesa da tese de doutorado como casados! Você faz mais do que parte desta história, você é a minha história!! Te amo.

Dedico também aos meus pais e meus irmãos, os quais sempre me deram todo o suporte para que eu pudesse disponibilizar meu tempo integralmente aos estudos. Sempre me dando força e conselhos para que eu pudesse seguir em frente, amo vocês eternamente, tudo o que faço na minha vida é pensando em vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Faculdade de Odontologia de Bauru por disponibilizar todos os recursos necessários para meus estudos e minhas pesquisas.

Ao laboratório de Bioquímica da FOB-USP por ter tornado o menino Bruno no homem Bruno, muito obrigado pelos 10 anos de ensinamento.

Aos especialistas do laboratório, Aline, Larissa e Thelma pela paciência, dedicação, broncas, elogios, por todo o ensinamento que sempre me deram, muito obrigado.

Aos colegas de laboratório, obrigado pelas conversas e risadas.

Agradeço a Universidade de Turku na Finlândia, em especial a Dra. Arzu Tezvergil-Mutluay e a Roda Seseogullari-Dirihan por terem me recebido tão bem no período do meu Doutorado Sanduíche e pelos enormes ensinamentos, muito obrigado pela amizade e pelo carinho.

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa de Doutorado Sanduíche (202532/2014-3).

Agradeço aos meus amigos, os quais sempre estiveram ao meu lado, dando apoio, força, conselhos, alegrias para que eu pudesse seguir em frente.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Profa. Marília, agradeço eternamente por indiretamente ter sido uma segunda mãe para mim. Já te falei isso, vivemos uma vida dentro do laboratório. São dez anos de muitos fatos, de muitas histórias, de tristeza, de alegria, de conquistas e derrotas, afinal, isso é a vida! Sempre falo para a senhora que nunca conseguirei retribuir o que a senhora fez por mim nesses anos. Assim como falei no meu mestrado, você involuntariamente cria amor com a gente, você nos cria como seus próprios filhos! Mas saiba que a resposta para isso é que também temos a senhora como mãe. Isso é o que eu acho mais digno na senhora, humildade, amor, dedicação. Você não é apenas uma orientadora, é A ORIENTADORA. Muito obrigado por tudo e para

o resto da minha vida irei falar com muito orgulho, fui orientado da Marília Buzalaf!

Meu segundo agradecimento especial vai para duas pessoas, não tinha como colocar uma antes da outra. Melissa e Polliana, ou Polliana e Melissa, minhas co-orientadoras, ou em certos momentos orientadoras. Muito obrigado pela amizade, pela confiança, pelo respeito, pelo ensinamento, por tudo. Vocês foram o meu combustível para chegar até aqui, cada uma em um tempo, cada uma em uma parte da história, mas as duas se completando!! Muito obrigado, sou fã número um de vocês!

Queria agradecer ao professor José Mauricio Sforcin por ter aceitado nosso convite para ser membro da banca. Sabíamos desde o começo que essa defesa não poderia acontecer sem o senhor. Muito obrigado por participar deste momento tão especial.

Professora Linda Wang, será que na minha vida, sempre quando eu precisar ser avaliado a senhora estará lá? Tomara, pois seus posicionamentos, suas contribuições são sempre fantásticas e indispensáveis. Muito obrigado pelos almoços, pelas risadas, por tudo. Muito obrigado pelo enorme carinho.

Professora Ana Carolina Magalhães muito obrigado por sempre estar disponível para dúvidas. A senhora também não poderia estar de fora desta banca, seus conhecimentos tinham que estar presente neste dia. Muito obrigado.

Ao Professor Leo Tjäderhane, muito obrigado por ter me aceitado como aluno de Doutorado Sanduíche. Muito obrigado por ser mais que um orientador, por ser um amigo.

“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)

RESUMO

Na dentina, a matriz orgânica desmineralizada tem um papel protetor contra desafios erosivos subsequentes. Porém, essa camada pode ser degradada por proteases, como as metaloproteinases da matriz (MMPs) e cisteína catépsinas (CCs). Recentemente, o uso de inibidores de proteases da matriz surgiu como uma importante ferramenta preventiva contra a erosão dentinária. Entretanto, o(s) mecanismo(s) exato(s) pelo(s) qual(is) os inibidores de proteases podem prevenir a erosão dentinária, bem como os tipos de proteases mais envolvidas neste processo ainda não são completamente conhecidos. O projeto foi desenvolvido em 2 subprojetos, com os seguintes objetivos: A) Subprojeto 1: Avaliar o papel das proteases na progressão da erosão dentária; B) subprojeto 2: Testar o potencial inibitório do NaF em CCs dentinárias. Para cumprir esses objetivos, foram utilizadas dentina de terceiros molares humanos para a preparação dos espécimes.

A) Subprojeto 1: Blocos de dentina (4 X 4 x 2 mm) (n=119) foram obtidos de raízes. Os espécimes foram divididos em 7 grupos de acordo com o seu tratamento (E-64, inibidor específico II de catépsinas B, clorexidina, galardina NaF, placebo) ou sem tratamento, géis foram aplicados uma única vez sobre a superfície e feito o desafio erosivo (90s, 4x por dia por 5 dias) e feita análise perfilométrica. Os espécimes foram incubadas em solução contendo colagenase de *Clostridium histolyticum* tipo VII por 96hrs e então feita uma segunda análise perfilométrica para se determinar a espessura da MOD. Dois espécimes foram separados para análise de microscopia eletrônica de varredura. B) Subprojeto 2: Palitos de dentina (6 mm X 2 mm X 1 mm) (n=60) foram cortados da porção médio coronária dos dentes e completamente desmineralizados por imersão em EDTA 0,5 M (pH7,4) por 30 dias e lavados em água deionizada sob constante agitação a 4°C por 72 h. Os espécimes foram divididos em 6 grupos (E-64, NaF e controle negativo, pH 5,5 ou 7,2) e incubados em saliva artificial contendo seus respectivos inibidores por 24 h 7 dias e 21 dias; ao termino de cada período, os espécimes eram pesados para avaliar a perda de massa e analisada a presença de CTX.

A) Subprojeto 1: a perda de tecido desmineralizado (μm , média $\pm$ SD) foi: CHX 8,4 $\pm$ 1,7b, Gala 8,6 $\pm$ 1,9b, IECB 9,6 $\pm$ 1,4a, E64 9,9 $\pm$ 1,3a, NaF 9,9 $\pm$ 1,7a, P 10,9 $\pm$ 2,2a, ST 11,0 $\pm$ 1,5a. A perda de tecido mineralizado foi: CHX 15,4 $\pm$ 2,2b, Gala 16,0 $\pm$ 1,8b, IECB 17,6 $\pm$ 2,4a, E64 17,6 $\pm$ 2,0a, NaF 17,3 $\pm$ 2,8a, P 19,1 $\pm$ 2,1a, ST 18,9 $\pm$ 2,4a. Os inibidores de MMP reduziu

significativamente a perda de matriz orgânica e tecido mineralizado em comparação com os outros grupos ($p < 0,05$). Não foi achada diferença significativa entre a espessura da matriz orgânica desmineralizada remanescente ($p = 0,845$).

B) Subprojeto 2: Na perda de massa houve diferença significativa em relação ao inibidor ($F = 20,047$, $p < 0,0001$) e tempo de incubação ($F = 222,462$, $p < 0,0001$) com significativa interação entre esses critérios, nos períodos de menor tempo de incubação, a perda foi similar para todos os grupos testados, no período de maior tempo de incubação, o grupo contendo NaF demonstrou os melhores resultados. Na análise de CTX, houve diferença significativa em relação aos inibidores ($F = 46,543$, $p < 0,0001$), pH ($F = 14,836$, $p < 0,0004$) e tempo de incubação ($F = 161,438$, $p < 0,0001$) com significativa interação entre esses critérios, como ocorrido na perda de massa, não houve diferença estatística nos períodos de menor incubação. No período de maior tempo de incubação, mais uma vez o grupo NaF mostrou os melhores resultados. No valor acumulado de CTX, os grupos E64 e controle negativo tiveram os maiores valores de CTX acumulado, o grupo NaF, independente do pH mostrou redução significativa em relação aos demais grupos. Após análise dos resultados dos dois subprojetos, podemos indicar que as MMPs são as proteases de maior importância na progressão da erosão dentinária, assim, sua inibição é de maior importância para a redução desta patologia. Mesmo as CCs não exercendo papel direto para a progressão da erosão, elas são efetivas na cascata da ativação de outras proteases, como as próprias MMPs. Com isso, sua inibição também pode ser importante para a redução indireta da progressão da erosão. Neste presente estudo, pudemos comprovar que o NaF tem potencial inibitório sobre as CCs dentinárias, assim, sugerindo um novo inibidor de CCs. Com os resultados deste estudo, podemos afirmar que as MMPs são as principais proteases na progressão da erosão dentinária e que o NaF tem potencial inibitório nas CCs dentinárias.

Palavras-chave: Metaloproteínases da Matriz. Cisteína Catapsinas. Erosão dentária. Dentina.

ABSTRACT

The role of proteases on dental erosion

In the dentine, the demineralized organic matrix has a protector part against the following erosive challenges. Nevertheless, this layer can be degraded by proteases, like the matrix metalloproteinases (MMPS) and cystein cathepsins (CCs). Recently, the use of proteases of the matrix's inhibitors, emerged as an important preventive tool against the dentinária erosion. However, the exact mechanisms from which the inhibitors of the proteases may prevent the dentin erosion, as much as the kinds of proteases more involved in this process are not completely known yet. Therefore, the general objective of this project was to investigate the part of the two main proteases of the matrix (MMPs and CCs) in the dental erosion. The project was developed in 2 subprojects, with the following objectives: A)Subproject 1: Evaluate the part of the proteases in the progression of the dental erosion; B)subproject 2: To test the NaF inhibitory potencial in the dentin CCs. To accomplish these objectives, human third molar dentin were used for the preparation of the specimens, obtained in the surgery and urgency clinics of FOB-USP (subproject 1) or granted by the University of Oulu (subproject 2). A) Subproject 1: Dentine blocks 4 X 4 X 2 mm) (n=119) were obtained from the roots of the obtained teeth. The specimens were divided in 7 groups according with their treatment. Gels containing inhibitors (E-64, specific cathepsin B inhibitor II, chlorhexidine, galardin NaF, placebo), or without treatment, were produced, applied only one time over the surface and made the erosive challenge (90s, 4x a day for 5 days) and made profilometric analysis. The specimens were incubated in a solution containing collagenase of *Clostridium histolyticum* type VII for 96 hours and then a second profilometric analysis was made to determine the thickness of the MOD. Two specimens were separated for the electronic microscopy scan analysis. B) Subproject 2: Dentine sticks (6 mm X 2 mm X 1 mm) (n=60) were cut from the medium coronary portion of the teeth and completely demineralized by immersion in EDTA 0,5 M (pH7,4) ifor 30 days and washed in deionized water under constant agitation in 4° C for 72 hours. The specimens were divided in 6 groups (divided by inhibitors: E-64, NaF and negative control, pH 5,5 or 7,2) and incubated in artificial saliva containing their respective inhibitors for 24 hours, 7 days and 21 days; by the end of each period, the specimens were weighted to evaluate the loss of mass and analised the presence of CTX. A)Subproject 1: the loss of demineralized

tissue (μm , média $\pm$ SD) was : CHX $8,4\pm1,7\text{b}$, Gala $8,6\pm1,9\text{b}$, IECB $9,6\pm1,4\text{a}$, E64 $9,9\pm1,3\text{a}$, NaF $9,9\pm1,7\text{a}$, P $10,9\pm2,2\text{a}$, ST $11,0\pm1,5\text{a}$. The loss of demineralized tissue was: CHX $15,4\pm2,2\text{b}$, Gala $16,0\pm1,8\text{b}$, IECB $17,6\pm2,4\text{a}$, E64 $17,6\pm2,0\text{a}$, NaF $17,3\pm2,8\text{a}$, P $19,1\pm2,1\text{a}$, ST $18,9\pm2,4\text{a}$. The MMP inhibitors reduced significantly the loss of organic matrix and demineralized tissue in comparison with other groups ($p<0,05$). There was no significant difference found between the thickness of the remaining demineralized organic matrix. ($p=0,845$). B) Subproject: In the loss of mass, there was a significant difference in relation to the inhibitor ($F=20,047$, $p<0,0001$) and incubation time ($F=222,462$, $p<0,0001$) with significant interaction between these criteria, in the periods of lesser time of incubation, the loss was similar for all the tested groups, in the period of higher time of incubation, the group containing NaF demonstrated the best results. In the analysis of CTX, there was significant difference in relation the inhibitors ($F=46,543$, $p<0,0001$), pH ($F=14,836$, $p<0,0004$) and time of incubation ($F=161,438$, $p<0,0001$) with significant interaction between these criteria, as occurred in the mass loss, there was no statistic difference in the period of lesser incubation. In the period of higher time of incubation, once again, the NaF group demonstrated the best results. The CTX accumulated value, the E64 groups and negative control had the greater accumulated values of CTX, the NaF group, regardless of the pH, demonstrated significant reduction in relation to the other groups. After the analysis of the results of both subprojects, we can indicate that the MMPs are the proteases of greater importance in the progression of the dentin erosion, thus, its inhibition is of greater importance for the reduction of this pathology. Even the CCs don't playing the part directly for the progression of erosion, they are effective in the cascade of the activation of other proteases, like the MMPs themselves. In this manner, its inhibition can also be important for the indirect reduction of the progression of the erosion. In this present study, we can prove that the NaF has inhibiting potential over the dentin CCs, thus, suggesting a new inhibitor of CCs. With the results of this study, we can affirm that the MMPs are the main proteases in the progression of the dentin erosion and that the NaF has inhibiting potential in the dentin CCs.

Key words: Matrix Metalloproteinases. Cystein Cathepsin. Dental erosion. Dentin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 - Imagens de MEV de espécimes de cada grupo após desmineralização erosiva.....	43
Figura 2 - Variação da massa dos palitos de dentina desmineralizados após cada período de incubação.....	44
Figura 3 - CTX liberado dos palitos de dentina desmineralizados após cada período de incubação.....	48
Figura 4 - CTX acumulado liberado dos palitos de dentina desmineralizados após cada período de incubação.....	48

-

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos grupos de MMPs em relação ao substrato de ação.....	39
Tabela 2 - Resultados das análises perfilométricas (primeira e segunda) subprojeto 1	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
3	PROPOSIÇÃO	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	O Papel das Metaloproteinases da Matriz e Cisteíno-Catepsinas na progressão da erosão dentária	39
4.2	Inibição das Cisteíno-Catepsinas dentinárias pelo fluoreto de sódio	43
5	RESULTADOS	45
5.1	O Papel das Metaloproteinases da Matriz e Cisteíno-Catepsinas na progressão da erosão dentária	47
5.2	Inibição das Cisteíno-Catepsinas dentinárias pelo fluoreto de sódio	50
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	67
	ANEXOS	75

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A erosão dentinária é caracterizada pela perda mineral após exposição por ácidos. O processo erosivo na dentina leva à exposição de uma camada de matriz orgânica completamente desmineralizada, seguida por uma zona parcialmente desmineralizada, até que a dentina interna sadia seja alcançada (KINNEY et al. 1995).

Após esta desmineralização, há a formação de uma matriz orgânica desmineralizada, a qual pode ser degradada por enzimas presentes na dentina. As Metaloproteinases da matriz (MMPs) e as Cisteino catepsinas (CCs), são duas enzimas presentes na dentina humana que vem sendo descritas como principais responsáveis pela degradação da matriz orgânica desmineralizada (TJÄDERHANE et al., 1998b; TERSARIOL et al., 2010).

As MMPs são endopeptidases cálcio-zinco dependentes que degradam a maioria dos componentes da matriz extracelular (MEC). Elas são secretadas como precursores inativos (pró formas) e necessitam de ativação para exercer degradação do substrato, o qual na maioria das vezes é específico (VISSE e NAGASE, 2003). Dentre as 24 formas descritas, 23 são encontradas em seres vertebrados (HANNAS et al., 2007).

As CCs também são endopeptidases que participam das atividades proteolíticas intracelulares dentro do compartimento lisossomal (DICKINSON, 2002). Também são encontradas como exopeptidases e participam da degradação da MEC (OBERMAJER et al., 2008). São descritas 11 diferentes tipos em seres humanos (DICKINSON, 2002). São secretadas como zimogênios inativos e são ativadas tanto autocataliticamente (processo desencadeado por acidificação endossomal) quanto por outras proteases (MACH et al., 1994).

Na cavidade oral, tanto as MMPs quanto as CCs foram identificadas exercendo papel importante na formação e manutenção do complexo dentino pulpar, progressão da cárie e erosão, formação do esmalte e fluorose dentária, na remodelação da matriz orgânica dentinária, em processos inflamatórios na região pulpar e periapical em doenças periapicais e na degradação de matriz de colágeno dentinária em restaurações aonde o colágeno exposto não foi completamente infiltrado pelo adesivo (BUZALAF et al., 2012; CARRILHO et al., 2012; HANNAS et al., 2007; NIU et al., 2011; TERSARIOL et al., 2010).

Alguns compostos têm potencial inibitório sobre as MMPs e CCs, seja uma inibição específica, como é o caso da Galardina em MMPs, o E-64 em CCs, ou um composto que tenha potencial inibitório não específico, como é o caso da Clorexidina (SCAFFA et al., 2012; CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006).

Portanto, se as proteases presentes na matriz orgânica desmineralizada forem inibidas, seja essa inibição por compostos agindo inibindo as MMPs ou inibindo as CCs ou ambas, e houver uma preservação da mesma, há a possibilidade de ocorrer uma remineralização desta camada e uma provável reestruturação do tecido.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão da literatura busca descrever de uma forma sucinta alguns conceitos sobre as doenças cárie e erosão dentinária, bem como apresentar o papel de algumas proteases (MMPs e CCs) na degradação da matriz orgânica dentinária.

Metaloproteinases da Matriz e Cisteíno-Catepsinas em tecidos dentários

As MMPs constituem uma família importante de endopeptidases metalodependentes que são capazes de degradar quase todas, se não todas as matrizes extracelulares (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) e também fazem o processamento proteolítico controlado de uma grande variedade de moléculas sinalizadoras que podem ter efeitos benéficos na resolução de doenças (RODRIGUES et al. 2010).

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, alteração do pH e até mesmo por outras enzimas (TJÄDERHANE et al., 1998; NAGASE, 1997). Atualmente são descritos 24 tipos de MMPs, sendo que 23 delas 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 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) (HANNAS et al., 2007; VISSE; NAGASE, 2003). (Tabela 1).

Como mencionado anteriormente, uma das formas de classificar as MMPs é 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. Além disso, elas também degradam moléculas da MEC e a MT1-MMP 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, cisteíno-protease e até mesmo por outras MMPs). *In vitro*, elas podem ser ativadas por agentes químicos (agentes modificadores de tiol, glutathiona oxidada, dodecil sulfato de sódio (SDS), agentes caotrópicos e espécies reativas de oxigênio) (HANNAS et al., 2007; VISSE; NAGASE, 2003; NAGASE, 1997), 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).

Os 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).

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

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 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), bem como na degradação da matriz de colágeno em regiões de restaurações que não foram completamente infiltradas (LIU et al., 2011; CARRILHO et al., 2007a,b; TJÄDERHANE et al., 2013).

Outro grupo de enzimas envolvidas no processo de metabolismo e remodelação do colágeno dentinário são as cisteíno-catepsinas (CCs) (TERSARIOL et al., 2010). As cisteíno-peptidases são enzimas que possuem um grupo tiol de um resíduo de cisteína agindo como nucleófilo no mecanismo de catálise. Estas enzimas pertencem ao clã CA, mais especificamente à família C1, conhecida como família da papaína. Existem 11 cisteíno-catepsinas humanas conhecidas atualmente: B, C, F, H, K, L, O, S, V, X e W (TURK et al., 2012). As cisteíno-catepsinas são enzimas ativas em pH levemente ácido e, podem degradar proteínas da matriz extracelular como colágeno, laminina, fibronectina e proteoglicanos (DICKINSON, 2002). As CCs também participam em múltiplos sistemas relacionados à saúde e doença no hospedeiro (por exemplo, remodelação tecidual, *turnover* da MEC e função do sistema imune). As CCs podem também participar em cascatas

proteolíticas que ampliam a capacidade degradativa, levando a danos patológicos e facilitando a invasão dos tecidos por células cancerígenas (DICKINSON, 2002).

A expressão gênica de diferentes CCs no tecido pulpar humano e em odontoblastos foi demonstrada, bem como, também foi relatada a presença e atividade de CC-B e CC-K em dentina sadia e cariada (TERSARIOL et al. 2010; NASCIMENTO et al. 2011; VIDAL et al. 2014;). Várias evidências sugerem sua importância em doenças destrutivas do tecido dentário, como a cárie dentária, perda de restaurações de resina composta e erosão dentinária (VIDAL et al. 2014; SCAFFA et al. 2017)

Enzimas proteolíticas na degradação da matriz orgânica desmineralizada

A cárie dentária continua a ser uma das mais difundidas doenças infecciosas do mundo. O tratamento da cárie e suas consequências (pulpite e infecções periapicais) causa custos financeiros significativos tanto para os indivíduos quanto para os governos. Como a população, hoje em dia, mantém a sua dentição por mais tempo, isso provocou um aumento significativo do problema da cárie de superfície radicular da população ocidental (SAUNDERS et al. 2005). Uma vez que a cárie é uma doença infecciosa, os microrganismos são essenciais no início e progresso das lesões. Por outro lado, enzimas derivadas do próprio hospedeiros, como as MMPs e as CCs, têm um papel significativo na progressão da cárie. As MMPs degradam a matriz dentinária de colágeno nas lesões de cárie, sendo que a variação do pH no biofilme dentinário é um potente ativador de MMPs (TJÄDERHANE et al. 1998b, 1999). Em adição, inibidores de MMPs reduzem significativamente a progressão de cárie em dentina *in vivo*, sendo seu efeito comparável ao do fluoreto (SULKALA et al. 2001). As enzimas responsáveis podem ser aquelas presentes em dentina, originadas dos odontoblastos ou transportadas para os sítios cariados via fluido dentinário (SULKALA et al. 2002, TERSARIOL et al. 2010 BOUSHELL et al. 2011, ZEHNDER et al. 2011, NASCIMENTO et al. 2011) ou ainda podem ser originárias da saliva (TJÄDERHANE et al. 1998b, KONTTINEN et al. 1998, SULKALA et al. 2001, VUOTILA et al. 2002). As CCs também são mais abundantes em lesões de cárie (NASCIMENTO et al. 2011; VIDAL et al. 2014) do que na dentina intacta (TERSARIOL et al. 2010). Uma vez que as cisteíno-catepsinas são funcionais em meio ácido e as MMPs em meios neutros, e catepsinas podem ativar as MMPs latentes (NAGASE,

1997), estas duas classes enzimáticas podem ter um papel sinérgico na progressão da cárie (NASCIMENTO et al. 2011; SCAFFA et al. 2017). O papel das MMPs e CCs abre uma nova perspectiva em relação à patogenia da doença cárie, abrindo novas possibilidades para o desenvolvimento de novas modalidades de tratamentos preventivos.

As restaurações de lesões de cárie são comumente acompanhadas da aplicação de sistemas adesivos a base de polímeros. A falha adesiva é seguida pela cárie secundária na interface dentina-adesivo, seguida por perda da estrutura dentária, aumento da taxa de destruição pulpar, e aumento da necessidade de tratamentos endodônticos, restauradores e protéticos (ABBOTT 2004, HICKEL et al. 2005). As enzimas presentes na matriz dentinária têm sido relacionadas à redução da longevidade das restaurações adesivas, por degradarem as fibrilas de colágeno que constituem a parte dentária da camada híbrida (TJÄDERHANE et al. 2013a). O colágeno na interface dentina-restauração é susceptível à degradação enzimática e isso pode levar à completa perda da integridade da camada híbrida e eventual perda da força de resistência de união (HEBLING et al. 2005, CARRILHO et al. 2007a,b). A inibição dessas enzimas é promissora para aumentar a longevidade das restaurações (BRESCHI et al. 2008 e PASHLEY et al. 2011). Experimentos *in vitro* (CARRILHO et al. 2007a) e *in vivo* (CARRILHO et al. 2007b) têm demonstrado que a perda da resistência de união pode ser prevenida com clorexidina, um agente antimicrobiano usualmente utilizado na odontologia e um inibidor conhecido tanto das MMPs (GENDRON et al. 1999, PASHLEY et al. 2004) quanto das CCs (SCAFFA et al. 2012). Em conjunto, enzimas dentinárias são extremamente importantes na perda da adesão de restaurações, e portanto, no desenvolvimento de cáries secundárias, inflamações pulpares, lesões periapicais e perdas de restaurações. Sendo assim, sua inibição é uma maneira efetiva para o estabelecimento de sistemas adesivos mais duráveis.

A erosão dentinária é caracterizada pela perda mineral centrípeta que começa nas áreas peritubulares, que é seguida pela desmineralização intertubular. O processo erosivo na dentina leva à exposição de uma camada de matriz orgânica completamente desmineralizada, seguida por uma zona parcialmente desmineralizada, até que a dentina interna sadia seja alcançada (KINNEY et al. 1995). Por causa da diminuição das taxas de desmineralização dentinária quando a quantidade de colágeno degradado aumenta (GANSS et al. 2004), acredita-se que a

matriz desmineralizada dificulta a difusão iônica para dentro e para fora da área que está sendo desmineralizada (KLETER et al. 1994). Como consequência, poderia ser esperado que houvesse uma menor redução do pH no fronte de desmineralização prevenindo a remoção imediata do mineral dissolvido, o que pode aumentar o grau de saturação (GANSS et al. 2009b). Com isso, poder-se-ia esperar que a preservação da matriz orgânica desmineralizada (MOD) pudesse reduzir a progressão da perda dentinária. Entretanto, apesar de essa camada ser resistente à degradação por forças mecânicas, como as exercidas pela escovação (GANSS et al. 2009a), ela pode ser degradada bioquimicamente pelas proteases, como as MMPs presentes na dentina e saliva (TJÄDERHANE et al. 1998b). Em adição, outras proteases poderiam contribuir para as respostas colagenolíticas/gelatinolíticas intrínsecas dos tecidos bucais, como as serino-proteases, enzimas lisossomais e CCs (TERSARIOL et al. 2010). Diante da grande disponibilidade de MMPs (HANNAS et al. 2007) e outras proteases capazes de degradar o colágeno (SCHLUETER et al. 2012 a, TERSARIOL et al. 2010) na cavidade bucal, poderia ser presumido que a MOD não devesse persistir na superfície de lesões erosivas *in vivo*. Tendo isso em mente, uma série de estudos *in situ* do nosso grupo empregou conhecidos inibidores de proteases (IP), como o chá verde ou o seu polifenol *epigallocatechin 3-gallate* (EGCg) (DEMEULE et al. 2000), clorexidina (CHX) (GENDRON et al. 1999, SCAFFA et al. 2012) ou sulfato ferroso (FeSO₄) (KATO et al. 2010a), numa tentativa de prevenir a perda dentinária causada por desafios erosivos sozinhos ou combinados com desafios abrasivos (KATO et al. 2009, KATO et al. 2010a,b, MAGALHÃES et al. 2009). Uma vez que a perda dentinária foi reduzida desde 30% até cerca de 100%, dependendo do veículo usado para distribuir os ingredientes ativos para a dentina, e pelo fato de os compostos utilizadores serem reconhecidos IPs, sugeriu-se que o mecanismo de ação dessas substâncias para prevenir a erosão dentinária seria devido às suas habilidades em inibir as proteases, preservando, assim, a MOD. Isso foi confirmado no estudo *in vitro* de prova de conceito (KATO et al. 2012).

A habilidade dos IPs em preservar a matriz orgânica desmineralizada abre uma nova perspectiva para a proteção contra a erosão dentinária. Além de se preservar, surge outra questão importante: poderia a dentina erodida apresentando matriz orgânica desmineralizada preservada ser remineralizada? No momento, os estudos *in vitro* sobre este tema são contraditórios, uma vez que variáveis de

resposta distintas têm sido empregadas nos diferentes estudos. No estudo de Klont e ten Cate (1991) foi mostrado que a remoção de matriz orgânica desmineralizada não afetou a taxa de deposição de mineral em dentina erodida (0,1 M ácido acético, pH 4, por 3 ou 7 dias), sugerindo que a deposição mineral acontece primariamente nos cristais residuais da lesão. Todavia, a remineralização resultou em uma significativa redução na quantidade de colágeno degradado. Os autores empregaram análise de colágeno, cálcio e fosfato inorgânico nas soluções de remineralização como variáveis de resposta. As soluções de remineralização tinham uma proporção molar Ca/P_i de 1,67 e produtos de concentração [Ca].[P_i] de 0,6; 1,35 ou 2,4 mM², com força iônica de 0,15 M e pH 7,0. Por outro lado, Hara et al. (2008) foram capazes de remineralizar com sucesso a dentina erodida (1% ácido cítrico, pH 2,3, por 30 ou 60 min). A remineralização foi mostrada *in vitro*, sob condições específicas de grau de saturação e concentrações de Ca e P_i nas soluções de remineralização. Foi observada uma remineralização quase completa nas lesões de 30 min quando foi usada uma formulação contendo 1,45 mM de Ca e 5,4 mM de P_i. A variável de resposta foi a microradiografia transversa, que não permitiu uma avaliação precisa do nível da superfície da dentina. No entanto, a partir da análise das microradiografias, parecia que o nível original da superfície da dentina tinha sido restaurado, o que indicava o papel da matriz orgânica desmineralizada para guiar a reconstrução da dentina. Contudo, isso deve ser avaliado usando protocolos apropriados.

Como descrito anteriormente, a erosão causa uma extensa desmineralização do colágeno dentinário. Como a matriz de colágeno exposta é resistente ao desgaste (GANSS et al. 2009a), e apenas destruída pela degradação enzimática, a proteção dessa matriz da degradação pode facilitar a remineralização do colágeno, que deve finalmente, levar a uma melhor resistência ao desgaste, à diminuição significativa do progresso da erosão e à preservação do tecido dentário.

A remineralização do colágeno requer a produção de cristais de apatita que determinam a orientação da remineralização dos cristais reticulados. Isso restringe a remineralização da dentina completamente desmineralizada, como vem sendo mostrado com dentina desmineralizada em relação aos adesivos dentários (LIU et al. 2011b). Em dentina erodida, o fundo da zona desmineralizada (perto da dentina não afetada) ainda contém cristais de hidroxiapatita que podem servir de modelo para uma reposição aposicional de cristais de apatita por deposição epitaxial. Assim

nesta parte da remineralização através do crescimento de cristais é possível, desde que a degradação do colágeno seja prevenida e íons (cálcio, fosfato e flúor) sejam disponíveis e mantidos na superfície o tempo suficiente para que aconteça a remineralização (dentro de semanas).

A completa remineralização de colágeno dentinário desmineralizado, sem a formação de cristais, é mais difícil. Portanto, matrizes de colágeno completamente desmineralizadas penetradas por adesivos sob restaurações dentárias (chamadas camadas híbridas) vêm demonstrando ser remineralizada, usando uma aproximação de mineralização biomimética (MAI et al. 2009, 2010). Na remineralização biomimética análogos polianiónico biomiméticos de fosfoproteínas não colágenas são usadas para ligar colágeno e servem como modelos para induzir nucleação e crescimento de apatita em regiões completamente desmineralizadas de colágeno. Poliânions, como os ácidos poliacrílicos, são incluídos para aglomerar em volta de nanoprecusores de fosfato de cálcio amorfo para preveni-lo do crescimento em cristais que são demasiadamente grandes para se ajustar na mineralização do colágeno dentinário. Os inibidores de crescimento de cristais, como as fetuínas, permitem a entrada de pequenos cristais de apatita dentro dos espaços intrafibrilares, onde o crescimento de cristal pode continuar depois da exclusão dos inibidores de crescimento. O teste de conceito de estratégia de biomineralização usando ácido fosfórico polivinil, tanto como modelos moleculares e inibidores de MMPs endógenas da dentina já foram realizados (TEZVERGIL-MULUAY et al. 2010 b).

Recentemente, Liu et al. (2011a) examinou o uso de trimetafosfato de sódio como um análogo biomimético de fosfoproteínas da matriz para remineralização de dentina artificial afetada por cárie. 2,5% de trimetafosfato de sódio hidrolisado foi aplicado nas lesões de cáries artificiais para fosforilar a matriz de colágeno parcialmente desmineralizada, e remineralizado em sistema de fluidos corporais simulados, contendo fosfato de cálcio amorfo e ácido poliacrílico. A microtomografia computadorizada revelou uma diminuição de 73% na profundidade da lesão e 91% de eficácia de remineralização após 4 meses. Portanto, quando a lesão foi coberta com adesivo antes da remineralização, os respectivos valores caíram entre 53 e 57%. Em adição, análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou uma degradação enzimática de colágeno em amostras cobertas por adesivo,

demonstrando a necessidade da inibição enzimática durante o processo de remineralização biomimética (LIU et al. 2011a).

Uma vez que nos dias atuais a erosão dentária vem crescendo pelo alto consumo de refrigerantes, sucos ácidos, vinhos e outros alimentos ácidos, o entendimento da doença é de grande importância para saúde pública. Se os inibidores forem capazes de agir nas proteases presente na dentina humana e a matriz orgânica desmineralizada for preservada, sua remineralização é de grande interesse, assim podendo haver uma reestruturação tecidual e maior longevidade aos dentes acometidos pela lesão.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Para o melhor desenvolvimento e entendimento, este projeto foi dividido em dois subprojetos.

3.1 O Papel das Metaloproteinases da Matriz e Cisteíno-Catepsinas na progressão da erosão dentária:

O objetivo deste subprojeto foi avaliar o papel das diferentes famílias de proteases na progressão da erosão dentária.

As hipóteses nulas testadas foram:

- Não há diferença entre os inibidores testados;
- As MMPs e as CCs exercem atividades iguais na erosão dentinária;
- A perda mineral e da matriz orgânica é igual para todos os grupos testados;
- A MOD é igual em todos os grupos testados.

3.2 Inibição das Cisteíno-Catepsinas dentinárias pelo fluoreto de sódio:

O objetivo deste projeto é testar o potencial inibitório do NaF em CCs dentinárias.

As hipóteses nulas testadas foram:

- O pH não tem efeito na perda de massa da dentina;
- Os tratamentos com NaF (inibidor de MMP) e E-64 (inibidor de CC) não alteram a perda de massa;
- Os tratamentos com E-64 (inibidor de CC) mas não NaF (inibidor de MMP), inibe a atividade da Cisteíno-Catepsina K na dentina desmineralizada.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Como citado anteriormente, este projeto foi dividido em dois subprojetos. O primeiro subprojeto foi realizado na Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, e o segundo subprojeto, foi realizado na University of Oulu, Finlândia, durante o período de Doutorado Sanduíche (202532/2014-3). Terceiro molares não cariados recém extraídos foram utilizados neste projeto. Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (606.726) referente ao subprojeto 1 e pelo Comitê de Ética em pesquisa da University of Oulu, Finlândia (#19/2006), referente ao subprojeto 2. Os dentes foram limpos e estocados em solução de 0,1% Timol (pH 7.0) à 4°C até seu uso.

4.1 O Papel das Metaloproteinases da Matriz e Cisteíno-Catepsinas na progressão da erosão dentária:

4.1.1 Preparo das Amostras

As coroas foram separadas das raízes com a utilização de um disco diamantado (Isomet 1000; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). Blocos de dentina (4 x 4 x 2 mm) foram cortados da cervical das raízes sob constante refrigeração de água (para evitar aquecimento e possível degradação proteica) e o polimento para completa remoção de cimento e para planificar a amostra foi feita com auxílio de uma sequência de lixas (320, 600 e 1200 de granulação de Al₂O₃, Buehler), removendo em torno de 200 µm de superfície dentária. Finalmente, os espécimes foram polidos com um disco de feltro umedecido por uma solução diamantada (1µm, Buehler) com auxílio de uma politriz metalográfica. Após o polimento, os espécimes foram limpos com utilização de banho em ultrassom (T7 Thornton, Unique Ind. E Com. Ltda., São Paulo, Brasil) por 2 min. Para confirmação da completa remoção do cimento, análise microscópica foi utilizada. Os espécimes foram fixados em blocos acrílicos e randomizados em 7 grupos, os quais se diferenciavam pelo gel de tratamento. Para estabelecer uma superfície de referência para determinar o grau da lesão, dois

terços da superfície exposta dos espécimes foram cobertas com duas camadas de esmalte de unha, criando assim duas áreas controles nos dois cantos da superfície, e assim deixando uma área central sem proteção.

4.1.2 Tratamento e modelo de ciclagem de pH

Os grupos de tratamento foram (n=17/grupo):

- Clorexidina (CHX, 10 mM de Digluconato de Clorexidina, Sigma, Steinheim, Alemanha);
- Galardina, GM 6001 (Gala, 0.2 mM, Cat.N°364205, Calbiochem, San Diego, CA, EUA);
- Inibidor II específico de catepsinas B (IECB 0,2 mM; Cat N°219385, Calbiochem, San Diego, CA, EUA);
- Inibidor não específico de Cisteíno-Catepsina E-64 (E64, 5 µM, Cat.N°324890, Calbiochem, San Diego, CA, EUA);
- Fluoreto (NaF, 1,23% NaF, controle positivo; Sigma Steinheim, Alemanha)
- Sem princípio ativo (P, controle negativo, gel placebo);
- Sem tratamento (ST, não tratado).

Todos os géis tinham basicamente a mesma formulação (hidroxietilcelulose, propilenoglicol, metilparabeno, ureia e água deionizada) (KATO et al., 2010), exceto pelo princípio ativo. Os géis foram aplicados nos espécimes em uma fina camada com a utilização de um microbrush por 1 min, apenas uma vez e delicadamente removidos com o uso de um cotonete (KATO et al., 2010; KATO et al., 2010b; KATO et al., 2012).

Para a desmineralização erosiva, cada espécime foi individualmente imerso em 30 mL de Coca-Cola (Cia de Bebidas, Ipiranga, Ribeirão Preto, Brasil, pH 2.6) por 90 s, 4 vezes por dia, durante 5 dias. Após cada desafio de desmineralização, os espécimes foram lavados com água deionizada (10 s) e imersos em uma solução simuladora de fluido corporal (KLIMEK et al., 1982) contendo 0,2 mM glicose, 9,9 mM NaCl, 1,5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3 mM NH_4Cl , 17 mM KCl, 2mM NaSCN, 2,4 mM K_2HPO_4 , 3,3 mM ureia, 2,4 mM NaH_2PO_4 , 0,05 mM ZnCl_2 e traços de ácido ascórbico (pH 6.8, 30 mL/espécime, 25°C). O refrigerante foi trocado a cada desafio erosivo e a solução simuladora de fluido foi trocada diariamente.

4.1.3 Análise Perfilométrica

A primeira análise perfilométrica permitiu que fosse medido o nível da superfície desmineralizada em comparação com as áreas controle (perda tanto de mineral quanto de componente orgânico dentinário). As análises foram feitas por perfilometria de contato (Mahr Perthometer, Göttingen, Alemanha). O esmalte de unha foi delicadamente removido com auxílio de bisturi e solução de acetona (1:1 água). As análises foram feitas sob criterioso controle de umidade para evitar a contração da matriz dentinária. Para isso, as superfícies dos espécimes foram cobertas com água deionizada por 30 s antes da análise, esta água foi removida com papel absorvente, sem tocar na superfície e logo após a análise realizada. A ponta diamantada moveu-se desde a primeira área de controle até a área exposta e finalmente para a segunda área controle (2,5 mm de comprimento e 2,0 de largura). Cinco análises perfilométricas foram obtidas nos intervalos de 0,5 mm para cada espécime. A distância vertical entre a linha horizontal da área controle com a área exposta foi definida como desgaste dentário pela utilização de um software (Mahr Surf Xt20, 2009).

Após a primeira leitura, a MOD foi removida completamente, assim permitindo a mensuração da perda de tecido mineralizado. Isso foi feito pela imersão individual dos espécimes por 96 h a 37°C, sob agitação, em 0,5 mL de uma solução mineral contendo collagenase obtida de *Clostridium histolyticum* tipo VII (100 U/mL; Sigma, St. Louis, EUA) (GANSS et al. 2009b). A composição da solução mineral é 4,08 mM H_2PO_4 , 20,10 mM KCl, 11,90 mM Na_2CO_3 e 1,98 mM $CaCl_2$ (pH 6,7) (GERRARD & WINTER, 1986). Após a remoção da MOD, uma segunda perfilometria foi realizada e assim, a perda de tecido mineralizado foi obtido. A espessura do material orgânico desmineralizado remanescente foi calculado como a diferença entre o valor obtido pela mensuração da perda do tecido mineralizado (segunda perfilometria) e o valor obtido pela mensuração do nível da superfície da matriz orgânica desmineralizada em relação as áreas controles (primeira perfilometria) (SCHLUETER et al. 2012b).

4.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

Após a desmineralização erosiva, espécimes suplementares foram lavados por 10 min em 0,1 M de tampão Cacodilato (pH 7.4) a 4°C, fixados overnight com paraformaldeído a 4% em tampão de 0,1 M de Cacodilato de Sódio a 4°C, lavados em tampão de Cacodilato de Sódio por 10 min em temperatura ambiente e fixados com Tretoxido de Ósmio a 1% (2 h/ 2 vezes, em temperatura ambiente) e então lavados em água deionizada por 30 minutos. Os espécimes fixados foram desidratados em uma série ascendente de Etanol (50°, 70°, 80°, 90°, 95°, 100°, cada solução foi substituída por uma nova duas vezes a cada 30 min em temperatura ambiente). Eles foram então fraturados após secos a ponto crítico (CPD 030, Balzers, Alemanha) e metalizados em ouro (Denton, Vaccum Desk IV, Nova Jersey, EUA). Os fragmentos foram analisados utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (FEI company, Eindhoven, Holanda) equipado com catodo de tungstênio. A aceleração da voltagem foi ajustada em 5 kV. A magnificação das imagens de MEV foi 500X.

4.1.5 Análise Estatística

O software GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, EUA) foi utilizado para todas as análises estatísticas deste subprojeto. A suposição da distribuição normal dos dados e a igualdade da variância foram checados para todas as variáveis testadas, usando os testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, respectivamente. Para as medidas perfilométricas, os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Para a espessura da MOD, os dados foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn. O nível de significância foi de 5%.

4.2 Inibição das Cisteíno-Catepsinas dentinárias pelo fluoreto de sódio:

4.2.1 Preparo das Amostras

As coroas foram separadas das raízes com a utilização de um disco diamantado. Neste subprojeto, foi utilizada dentina coronária. Palitos de dentina com 6 mm x 2 mm x 1mm de dimensão foram seccionados da porção médio coronal. Os palitos foram completamente desmineralizados em 0,5 M EDTA (pH 7.4; Sigma, St. Louis, EUA) por 30 dias a 4°C. A cada quatro dias, a solução de EDTA era trocada por uma nova. Os espécimes foram então lavados com água deionizada a 4°C por 72 h para completa remoção dos resíduos de EDTA, assim evitando uma possível inibição das MMPs (CARRILHO et al. 2009).

4.2.2 Incubação experimental

Os espécimes foram divididos aleatoriamente em 6 grupos (n=10/grupo), diferenciados de acordo com o tratamento e o pH da solução. Os palitos de dentina desmineralizada foram individualmente incubados em 500 µL de solução simuladora de fluido corporal (SSFC), contendo 5 mM HEPES, 2,5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,02 mM ZnCl_2 e NaN_3 (SESEOGULLARI-DIRIHAN et al., 2015; TEZVERGIL-MUTLUAY et al., 2011) em pH 5.5 (pH ótimo para atividade de CCs) ou 7.2 (pH ótimo para atividade das MMPs).

Os grupos foram divididos em:

- SSFC sem inibidores em pH 5.5 (NC; controle negativo);
- SSFC sem inibidores em pH 7.2 (NC; controle negativo);
- SSFC contendo 0,5 mM de inibidor não específico de cisteíno-catepsinas E-64 em pH 5.5 (controle positivo);
- SSFC contendo 0,5 mM de inibidor não específico de cisteíno-catepsinas E-64 em pH 7.2 (controle positivo);
- SSFC contendo 5000 ppm (263 mM) F (como NaF) em pH 5.5;
- SSFC contendo 5000 ppm (263 mM) F (como NaF) em pH 7.2.

4.2.3 Massa Seca

A perda de massa seca foi usada como um teste indireto para checagem de degradação e hidrólise do colágeno em todos os períodos de incubação (24 h, 7 e 21 dias). Para isso, os palitos de dentina desmineralizada foram individualmente acondicionados em tubos de polipropileno e submetidos a secagem em dessecador à vácuo contendo CaSO_4 por 72 h. A massa seca inicial foi medida (antes do primeiro período de incubação) para fornecer a massa basal inicial (XP6 Microbalance, Mettler Toledo, Hightstown, NJ, EUA). O protocolo foi repetido após cada período de incubação. Após analisadas as massas, os espécimes eram reidratados com água deionizada a 4°C por 3 horas (SESEOGULLARI-DIRIHAN et al., 2015).

4.2.4 Análise de telopeptídeo-C terminal de ligação cruzada do colágeno tipo I (CTX)

A degradação dentinária pelas cisteíno-catepsinas K endógenas foi analisada pela mensuração de CTX presente na SSFC de cada período de incubação usando o CTX ELISA Kit (UniQ EIA, Orion, Diagnostica, Finlândia). A CC-K é a única catepsina hábil a produzir CTX (GARNERO et al., 1998; TEZVERGIL-MUTLUAY et al., 2015). Após cada período de incubação, toda SSFC era coletada e armazenada a -80°C até sua análise. Alíquotas de SSFC de 7 amostras (n=7) foram usadas para mensurar a quantidade de CTX.

4.2.5 Análise Estatística

O software Statistica versão 10.0 para Windows (Statsoft, Tulsa, OK, EUA) foi utilizado para todas as análises estatísticas deste subprojeto. Os dados originais foram submetidos a testes de normalidade e homogeneidade (Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, respectivamente) e foram analisados pelos testes ANOVA 3 critérios e Tukey. Os valores de liberação cumulativa de CTX não seguiram distribuição normal, e foram analisados por testes não paramétricos (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney). O nível de significância foi de 5%.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 O Papel das Metaloproteinases da Matriz e Cisteíno-Catepsinas na progressão da erosão dentária:

5.1.1 Análise Perfilométrica

O perfil obtido na primeira e na segunda análise perfilométrica dentro dos grupos foi muito similar (Tabela 2). Os géis contendo 10 mM de CHX e 0,2 mM de galardina, inibidor de MMP, reduziram significativamente a perda de material orgânico da superfície e compartimento mineral quando comparados com os outros géis ou com o grupo não tratado ($F=5,57$, $p<0,0001$ e $F=4,95$, $p<0,0002$, para a primeira e para segunda análise perfilométrica, respectivamente). O gel de fluoreto (controle positivo), os géis inibidores de catepsina, gel placebo e os grupos não tratados não mostraram diferença estatística significativa, tanto na primeira quanto na segunda análise perfilométrica (Tabela 2). A espessura da matriz orgânica desmineralizada não foi significativamente diferente entre todos os grupos ($KW=2,705$, $p<0,845$) (Tabela 2).

Tabela 2. Perda (μm , média $\pm$ SD) de material orgânico desmineralizado de superfície (MODS; primeira análise perfilométrica) e tecido mineralizado (TM; segunda análise perfilométrica), e espessura da MOD residual (perda de TM – Perda de MODS) nos espécimes de dentina tratados com os géis contendo inibidores de proteases ou não e submetidos à desmineralização erosiva.

Inibição	Tratamentos	Perda de MODS*	Perda de TM*	Espessura da MOD residual**
Inibidores MMP	10 mM CHX ^{&}	$8,4 \pm 1,7^b$	$15,4 \pm 2,2^b$	$7,0 \pm 2,3^a$
	0,2 mM galardina	$8,6 \pm 1,9^b$	$16,0 \pm 1,8^b$	$7,3 \pm 1,8^a$
Inibidores Catepsina	0,2 mM Inibitor II	$9,6 \pm 1,4^a$	$17,6 \pm 2,4^a$	$7,9 \pm 1,8^a$
	0,5 μM E-64	$9,9 \pm 1,3^a$	$17,6 \pm 2,0^a$	$7,0 \pm 3,0^a$
Controles	1,23% NaF	$9,9 \pm 1,7^a$	$17,3 \pm 2,8^a$	$7,1 \pm 2,3^a$
	Gel Placebo	$10,9 \pm 2,2^a$	$19,1 \pm 2,1^a$	$8,0 \pm 3,5^a$
	Sem Tratamento	$11,0 \pm 1,5^a$	$18,9 \pm 2,4^a$	$7,8 \pm 3,2^a$

* Testes ANOVA e Tukey ($p<0,001$). ** Testes Kruskal-Wallis e Dunn ($p=0,845$). $n=15$.

[&] Também inibe catepsina.

5.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A figura abaixo (figura 1) apresenta as imagens características obtidas por MEV de espécimes de cada grupo após desmineralização erosiva. Nos grupos, 10 mM de CHX e 0,2 mM de galardina, podemos observar uma MOD mais organizada em relação aos demais grupos.

Figura 1- Imagens de MEV de espécimes de cada grupo após desmineralização erosiva. Os grupos de tratamento são representados de 1 a 7, como: 1- 10 mM CHX; 2- 0,2 mM galardina; 3- 0,2 mM inibidor II; 4- 0,5 µM E-64; 5- 1,23% NaF; 6- Gel placebo; 7- Sem tratamento. Nos grupos CHX e galardina, a preservação da MOD é mais visível.

5.2 Inibição das Cisteíno-Catepsinas dentinárias pelo fluoreto de sódio:

5.2.1 Massa Seca

A porcentagem de perda de massa seca está demonstrada na figura 2. Houve diferença significativa em relação ao inibidor ($F=20,047$, $p<0,0001$), e o tempo de incubação ($F=222,462$, $p<0,0001$), com significativa interação entre esses critérios. Todos os grupos tiveram perda de massa seca nos períodos testados. Para as incubações de menores tempos (24 h e 7 dias), a perda de massa foi similar em todos os grupos. O maior valor total de perda de massa foi encontrado nos grupos incubados com E-64 e SSFC (CN) no pH 7.2. Em todos os grupos com pH 5.5, independente da presença de E-64 ou NaF, mostraram significativa redução na perda de massa total em comparação ao grupo controle e E-64 no pH 7.2. No pH 7.2, NaF também teve aproximadamente 75% menos perda de massa do que seu respectivo grupo controle e E-64 em pH 7.2.

Fig 2 – Variação da massa dos palitos de dentina desmineralizados após cada período de incubação (24 h, 7 e 21 dias) em SSFC contendo inibidor de CC (0,5 mM E-64; controle positivo), 5000 ppm F (NaF) ou sem tratamento (controle negativo; NC). Todos os grupos foram testados em pH 5.5 e pH 7.2. Os dados foram analisados por anova 3 critérios e Tukey. Barras com a mesma letra indicam grupos sem diferença estatística significativa ($p<0,05$). N=10.

5.2.2 Análise de telopeptídeo-C terminal de ligação cruzada do colágeno tipo I (CTX)

A figura 3 mostra a concentração de CTX liberados dos palitos de dentina desmineralizada de todos os grupos experimentais. Como mostrado para a perda de massa seca, houve diferença significativa em relação aos inibidores ($F=46,543$, $p<0,0001$), pH ($F=14,836$, $p<0,0004$) e tempo de incubação ($F=161,438$, $p<0,0001$), com significativa interação entre esses critérios. A liberação de CTX não mostrou diferença estatística significativa entre os grupos nos períodos de 24 h e 7 dias de incubação. O grupo NaF mostrou significativamente menor liberação de CTX em comparação com seu respectivo grupo controle negativo em 21 dias de incubação. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre o grupo controle negativo e E-64 no pH correspondente, indiferente do pH (5.5 ou 7.2). Entretanto, no pH 7.2 o grupo incubado em E-64 no período de 21 dias teve uma liberação significativamente maior que o grupo incubado no pH 5.5. Para as outras condições, pH não interferiu significativamente na liberação de CTX. O achado mais importante foi que o grupo controle negativo e o grupo E-64 tiveram liberações significativamente maiores de CTX no período de 21 dias quando comparado com o período de 24 h, enquanto o grupo NaF se manteve estável ao longo do tempo.

Fig 3 – CTX liberado dos palitos de dentina desmineralizados após cada período de incubação (24 h, 7 dias e 21 dias) em SSFC contendo inibidor de CC (0,5 mM E-64; controle positivo), 5000 ppm F (NaF) ou sem tratamento (controle negativo; NC). Todos os grupos foram testados tanto em pH 5.5 e pH 7.2. Os dados foram analisados por anova 3 critérios e Tukey. Barras com a mesma letra indicam grupos sem diferença estatística significante ($p < 0,05$). N=7.

Para melhor visualizar o geral da liberação de CTX, foi calculado a liberação acumulada de CTX durante todos os 30 dias de incubação (figura X'). O maior valor de liberação acumulada de CTX pode ser visto nos grupos controle negativo e E-64 no pH 7.2. Incubação no pH 5.5 reduziu significativamente a liberação de CTX. O grupo contendo NaF, independente do pH, foi o que mostrou menor liberação acumulada de CTX, sendo significativamente diferente de todos os outros grupos.

Fig 4 – CTX acumulado liberado dos palitos de dentina desmineralizados após cada período de incubação (24 h, 7 e 21 dias) em SSFC contendo inibidor de CC (0,5 mM E-64; controle positivo), 5000 ppm F (NaF) ou sem tratamento (controle negativo; NC). Todos os grupos foram testados tanto em pH 5.5 e pH 7.2. Os dados foram analisados por anova 3 critérios e Tukey. Barras com a mesma letra indicam grupos sem diferença estatística significativa ($p < 0,05$). N=7.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

No subprojeto 1, a análise perfilométrica das amostras de dentina tratadas com CHX e galardina, inibidores conhecidos de MMPs, permitiu verificar uma menor taxa de erosão. A preservação da MOD foi significativamente maior que o grupo não tratado e o grupo controle negativo. Os inibidores de CCs tiveram uma menor taxa de progressão na erosão em relação aos grupos controle, mas não houve diferença estatística significativa entre eles. Com isso, o presente estudo indica que as MMPs dentinárias endógenas são o principal grupo de enzimas responsáveis pela perda da MOD. A CHX também é descrita como um inibidor de CCs, foi o grupo que obteve o melhor resultado de todos os grupos. Com isso, os dados atuais indicam que as CCs possuem alguma função na degradação da MOD, mas não tão pronunciada quanto a função das MMPs. Apesar de haver uma correlação significativa entre a atividade das MMPs e CCs em dentina, a atividade funcional deve ter uma diferença acentuada. A grande diferença nos resultados pode estar relacionada com a quantidade de MMPs e CCs em dentina. Entretanto, comparações quantitativas são difíceis e mesmo que sejam feitas, a quantidade pode não ser o único fator determinante, mas a ativação e o ambiente possibilitando a atividade funcional. Estudos conseguiram determinar uma atividade (aproximadamente 10X) maior das MMPs em relação as CCs em dentina desmineralizada incubada em solução simuladora de fluído corporal (TEZVERGIL-MUTLUAY et al., 2013; SCAFFA et al., 2017). Nossos dados estão diretamente correlacionados com esses achados.

Outro aspecto que afeta os achados neste presente estudo (subprojeto 1), pode ser o protocolo da ciclagem de pH (diretamente relacionado ao ambiente citado no paragrafo anterior). O pH ótimo para a função das MMPs é bem próximo das condições de neutralidade. Catepsina B tem pH ótimo em torno de 7.4 para atividade (KHOURI et al., 1991), mas em geral, CCs tem atividade funcional em pH levemente ácidos, e devem estar em inatividade irreversível em pH neutro (TURK et al., 1995). Uma vez que a exposição erosiva (ácido) neste projeto foi curta (total de 6 minutos por dia, por 5 dias), o tempo em pH ótimo para atividade das CCs endógenas não deve ter sido suficiente para produzir degradação excessiva da MOD. No entanto, se o tempo foi planejado para imitar um desafio erosivo que pode acontecer

cl clinicamente (WIEGAND et al., 2011), isto indica que o papel das CCs na degradação erosiva da MOD é muito menos significativa que o papel das MMPs.

É também possível que as CCs possam ativar as MMPs durante o período erosivo, sugere-se que isso ocorra em lesões cariosas dentinárias (NASCIMENTO et al., 2011). Pelo menos a catepsina B cliva e inativa os inibidores teciduais específicos de MMP, TIMP, -1 e -2 (NAGASE et al., 1997), mudando o equilíbrio entre as MMPs e seus inibidores específicos. O pH ácido na erosão pode ativar as CCs dentinárias, que por sua vez, podem ativar proteolicamente as proMMPs ou degradar os TIMPs, ou ambos, resultando em ativação das MMPs. As MMPs se tornam funcionais após a neutralização do pH por tampões salivares. O modelo *in vitro* usado neste estudo não pode confirmar estes fatos, com isso, a ativação das MMPs deve ter acontecido apenas pela redução no pH (TJÄDERHANE et al., 1998). Se isto for verdade, as enzimas responsáveis pela degradação da MOD são as MMPs. Portanto, se for possível preservar a MOD, a protease que deve ser inibida é a MMP.

Neste estudo, o grupo tratado com gel contendo 1,23% de NaF reduziu levemente a perda de dentina quando comparado com o grupo placebo, mas a diferença não foi estatisticamente significativa, como relatado em um outro estudo *in situ* (KATO et al., 2010). Já que o fluoreto tem potencial inibitório em MMPs e adicionalmente tem um potencial remineralizador (MEI et al., 2012; KATO et al., 2014), 1,23% de NaF aparentemente não é suficiente para preservar a degradação da MOD e a progressão da erosão dentinária. Diferentes compostos de fluoretos, como o estanhoso ou fluoreto de titânio, devem ter um efeito protetor melhor na erosão do que o fluoreto de sódio (GANSS et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2008). O efeito do fluoreto estanhoso vem sendo proposto com base no aumento da resistência ácida, mas este efeito só tem sido demonstrado em esmalte, onde não há matriz orgânica (GANSS et al., 2008; HOVE et al., 2008). O papel dos íons metálicos na função das enzimas dentinárias não é muito conhecido, mas pelo menos o zinco (OSORIO et al., 2011; TOLEDANO et al., 2012) e o ferro (KATO et al., 2010) vem sendo sugeridos como inibidores das MMPs presentes na MOD.

Em relação ao subprojeto 2, a perda de massa final nos grupos controle negativo e E-64 pH 7.2 foi significativamente maior em relação aos mesmos tratamentos em pH 5.5. Como já citado, as MMPs são ativadas em pH ácido e tem sua atividade em pH neutro (TJÄDERHANE et al. 1998). Em pH 5.5, pH ótimo para

atividade das CCs, mas com acentuada redução da atividade de MMP-9 (OKADA et al. 1995), a perda de massa não mostrou diferença entre os grupos. Em adição, no grupo controle e no grupo E-64 pH 7.2 mostraram a maior quantidade de CTX acumulada liberada. A cisteíno-catepsina K pode manter 20% de sua atividade em pH 7.4 quando comparado ao pH 5 (TEZVERGIL-MUTLUAY et al. 2015), isto poderia explicar em partes a alta liberação de CTX no grupo controle negativo, em pH 7.2. O E-64 é um efetivo inibidor geral de CCs (Turk et al. 2012), mas sua estabilidade em soluções é limitada (http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/e3132pis.pdf).

Amostras incubadas com E-64 em pH 7.2 tiveram uma menor (mas não significativamente) liberação de CTX quando comparadas com o grupo controle negativo após 24 h e 7 dias de incubação, o que está de acordo com outros trabalhos que usaram 3 dias de incubação (TEZVERGIL-MUTLUAY et al. 2013). Já que a liberação de CTX no grupo E-64 após 21 dias foi a mais proeminente, é possível que o E-64 não esteja apto a inibir adequadamente a CC-K dentinária durante longos períodos de incubação. Em adição, a CC-K é comumente aceita como a principal enzima para liberação de CTX, mas ela não é a única envolvida. Garnero et al (2003) demonstrou que tanto a MMP-2 quanto a MMP-9 podem produzir CTX de fragmentos de colágeno ósseo degradado pela catepsina K, aumentando a quantidade de CTX em aproximadamente 60% e 90%, respectivamente, quando comparado com a catepsina K sozinha. Com isso, já que MMP-2 e MMP-9 estão presentes na dentina (TjÄDERHANE et al. 2015), elas podem ter contribuído para a alta taxa de liberação de CTX nos grupos controle negativo e E-64 em pH 7.2. Além disso, a perda de atividade das MMPs -2 e -9 em pH 5.5 pode explicar porque em pH ótimo para atividade das CCs, houve uma taxa menor de liberação de CTX nos grupos controle negativo e E-64 em relação ao pH 7.2. Assim, os resultados, tanto da perda de massa quanto da liberação de CTX, suportam estudos prévios indicando que as MMPs endógenas tem o papel mais importante na degradação do colágeno (ZARELLA et al. 2015).

O NaF tem sido indicado por agir como inibidor de MMP (KATO et al. 2014; BRACKETT et al. 2015), e nossos resultados suportam isso. A perda de massa final nos grupos incubados com NaF foi significativamente menor quando comparado com o grupo controle negativo e E-64 (pH 7.2), mas não em pH 5.5. Isso pode ser

atribuído à inibição das MMPs, mas não de CCs, já que o pH 5.5 não é o melhor pH para atividade das MMPs. Para comprovar isso, grupos incubados com E-64 não mostraram nenhum efeito na perda de massa, independente do pH, quando comparado com o respectivo grupo controle negativo.

A CC-K é a mais potente collagenase mamífera, e tem a capacidade proteolítica de clivar colágeno triplo helicoidal tipo I em múltiplos pedaços, incluindo telopeptídeos (GARNERO et al. 1998). Os resultados da análise de CTX indicam que o NaF exerce seu efeito na liberação de CTX diretamente na inibição da CC-K. O fluoreto vem sendo demonstrado na diminuição da atividade de reabsorção osteoclastica sem afetar a formação do osteoclasto, e parte deste efeito pode ser relacionado com a redução da expressão da MMP-9 e CC-K (PEI et al., 2013). A concentração de 1415 ppm de NaF e 4480 ppm de NaF-KF inibiu 23,6% e 31,8% a atividade de CC-B recombinante, respectivamente (MEI et al., 2014). Nossos resultados suportam esses achados e pela primeira vez, sugerem uma efetiva inibição de CC-K em dentina, com grande relevância clínica, utilizando 5000 ppm de flúor. É importante lembrar que a maioria das análises de inibição enzimática são feitas na grande maioria com enzimas recombinantes purificadas, a atividade funcional em tecidos geralmente varia muito dependendo das interações potenciais com outros componentes teciduais.

Apesar dos resultados indicarem que as MMPs são mais importantes na degradação da dentina desmineralizada, isso não necessariamente significa que as CCs não possuem nenhuma contribuição na patogenicidade enzimática na doença cárie, erosão ou perda de adesividade dentinária. O aumento na abundância (VIDAL et al. 2014) e atividade (NASCIMENTO et al. 2011) das cisteíno-catepsinas na cárie dentinária indicam fortemente que essas enzimas derivadas tanto de odontoblastos quanto de outras células pulpares, podem ser o participante chave nas lesões de cárie ativa (VIDAL et al. 2014). Durante a desmineralização inicial, a mudança do pH pode ativar as MMPs e as CCs por atividade da telopeptidase (pelo menos MMPs -2 e -9 e CC-K), que pode clivar os telopeptídeos terminais. Mesmo que a clivagem do colágeno helicoidal em dentina desmineralizada por CCs seja baixa, por clivar os telopeptídeos elas podem causar a perda de cross-linking intermolecular e com isso reduzir as propriedades mecânicas do colágeno e tornando-o mais susceptível a degradação de proteases não específicas e termicamente menos estável (TJÄDERHANE et al., 2015).

Os resultados demonstram que a MMP é a protease que tem a maior ação (direta) na degradação da matriz orgânica desmineralizada e assim na progressão da erosão. Com isso, sua inibição é de grande importância para controle da erosão em pacientes com problemas gástricos, que fazem alto consumo de refrigerantes, sucos ácidos e outras comidas ácidas, e com isso aumentando de sobremaneira a longevidade do dente afetado pela doença. Mesmo as CCs exercendo ação indireta na progressão da doença, sua inibição é importante para reduzir a ativação das MMPs, com o presente estudo, o NaF pode vir a ser sugerido como um composto capaz de reduzir significativamente a ação das CCs.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

7.1 O Papel das Metaloproteinases da Matriz e Cisteíno-Catepsinas na progressão da erosão dentária:

Os resultados do presente estudo suportam a rejeição das seguintes hipóteses nulas:

- Houve diferença entre os inibidores testados;
- As MMPs e as CCs não exercem atividades iguais na erosão dentinária;
- A perda mineral e da matriz orgânica não é igual para todos os grupos testados;

E suportaram a seguinte hipótese:

- A MOD é igual em todos os grupos testados.

7.2 Inibição das Cisteíno-Catepsinas dentinárias pelo fluoreto de sódio:

Os resultados do presente estudo suportam a rejeição das seguintes hipóteses nulas:

- O pH tem efeito na perda de massa da dentina;
- Os tratamentos com NaF (inibidor de MMP) e E-64 (inibidor de CC) alteram a perda de massa;
- Os tratamentos com E-64 (inibidor de CC) e NaF (inibidor de MMP), inibem a atividade da Cisteíno-Catepsina K na dentina desmineralizada.

Com isso, concluímos que as MMPs são as proteases de maior importância na degradação da matriz orgânica desmineralizada, assim, fazendo com que sua inibição seja a mais importante, e que, o NaF em concentrações equivalentes a 5000 ppm é capaz de reduzir a atividade das CCs presentes em dentina humana.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABBOTT P.V. Assessing restored teeth with pulp and periapical diseases for the presence of cracks, caries and marginal breakdown. **Aust Dent J** 2004;49:33-9;
- BAKER A.H.; EDWARDS D.R.; MURPHY G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. **J Cell Sci** 2002;115(Pt 19):3719-27.
- BOUSHELL L.W.; NAGAOKA H.; NAGAOKA H.; YAMAUCHI M. Increased matrix metalloproteinase-2 and bone sialoprotein response to human coronal caries. **Caries Res**. 2011;45(5):453-9.
- [BRACKETT M.G.](#); [AGEE K.A.](#); [BRACKETT W.W.](#); [KEY W.O.](#); [SABATINI C.](#); [KATO M.T.](#); [BUZALAF M.A.](#); [TJÄDERHANE L.](#); [PASHLEY D.H.](#); Effect of Sodium Fluoride on the endogenous MMP Activity of Dentin Matrices. **J Nat Sci**. 2015;1(6). pii: e118.
- BRESCHI L.; MAZZONI A.; RUGGERI A.; CADENARO M.; DI LENARDA R.; DE STEFANO DORIGO E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. **Dent Mater** 2008;24:90-101.
- BUZALAF M.A.; KATO M.T.; HANNAS A.R. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. **Adv Dent Res** 2012;24(2):72-6.
- CARRILHO M.; CARVALHO R.; DE GOES M.; DI HIPÓLITO V.; GERALDELI S.; TAY F.; PASHLEY D.; TJÄDERHANE L. Chlorhexidine preserves dentin bond *in vitro*. **J Dent Res** 2007a;86:90-4.
- CARRILHO M.; GERALDELI S.; TAY F.; DE GOES M.; CARVALHO R.; TJÄDERHANE L.; REIS A.; HEBLING J.; MAZZONI A.; BRESCHI L.; PASHLEY D. *In vivo* preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. **J Dent Res** 2007b;86:529-33.
- CARRILHO M.R.; TAY F.R.; DONNELLY A.M.; AGEE K.A.; TJÄDERHANE L.; MAZZONI A.; BRESCHI L.; FOULGER S.; PASHLEY D.H. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater** 2009;90:373-80.
- DEMEULE M.; BROSSARD M.; PAGE M.; GINGRAS D.; BELIVEAU R. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. **Biochim Biophys Acta** 2000;1478:51-60
- 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;49:931-5.
- GANSS C.; SCHLUETER N.; HARDT M.; SCHATTENBERG P.; KLIMEK J. Effect of fluoride compounds on enamel erosion *in vitro*: a comparison of amine, sodium and stannous fluoride. **Caries Res** 2008;42:2-7.

GANSS C.; HARDT M.; BLAZEK D.; KLIMEK J.; SCHLUETER N. Effects of toothbrushing force on the mineral content and demineralized organic matrix of eroded dentine. **Eur J Oral Sci** 2009a;117:255-60.

GANSS C.; LUSSI A.; SCHARMANN I.; WEIGELT T.; HARDT M.; KLIMEK J.; et al. Comparison of calcium analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosion in dentine. **Caries Res** 2009b;43:422-9

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;44:248-52.

GARNERO P.; BOREL O.; BYRJALSEN I.; FERRERAS M.; DRAKE F.H.; MCQUENEY M.S.; FOGED N.T.; et al. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. **J Biol Chem** 1998;273:32347-52.

GARNERO P.; FERRERAS M.; KARSDAL M.A.; NICAMHLAOIBH R.; RISTELI J.; BOREL O.; et al. The type I collagen fragments ICTP and CTX reveal distinct enzymatic pathways of bone collagen degradation. **J Bone Miner Res** 2003; 18:859-67.

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;6:437-9.

HANNAS A.R.; PEREIRA J.C.; GRANJEIRO J.M.; TJÄDERHANE L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. **Acta Odontol Scand** 2007;65(1):1-13.

HARA A.T.; ANDO M.; CURY J.A.; SERRA M.C.; GONZÁLEZ-CABEZAS C.; ZERO D.T. Influence of the organic matrix on root dentine erosion by citric acid. **Caries Res** 2005;39:134-8.

HARA A.T.; KARLINSEY R.L.; ZERO D.T. Dentine remineralization by simulated saliva formulations with different Ca and Pi contents. **Caries Res** 2008;42:51-6.

HEBLING J.; PASHLEY D.; TJÄDERHANE L.; TAY F. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers *in vivo*. **J Dent Res** 2005;84:741-6.

HICKEL R.; KAADEN C.; PASCHOS E.; BUERKLE V.; GARCÍA-GODOY F.; MANHART J. Longevity of occlusally-stressed restorations in posterior primary teeth. **Am J Dent** 2005;18:198-211.

HOVE L.H.; HOLME B.; YOUNG A.; TVEIT A.B. The protective effect of TiF₄, SnF₂ and NaF against erosion-like lesions *in situ*. **Caries Res** 2008;42:68-72.

KATO M.T.; MAGALHÃES A.C.; RIOS D.; HANNAS A.R.; ATTIN T.; BUZALAF M.A. Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. **J Appl Oral Sci** 2009;17:560-4.

- KATO M.T.; LEITE A.L.; HANNAS A.R.; BUZALAF M.A. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion *in situ*. **J Dent Res** 2010a;89:468-72.
- KATO M.T.; LEITE A.L.; HANNAS A.R.; OLIVEIRA R.C.; PEREIRA J.C.; TJÄDERHANE L.; BUZALAF M.A.R. Effect of iron on matrix metalloproteinase inhibition and on the prevention of dentine erosion. **Caries Res** 2010b;44:309-16.
- KATO M.T.; LEITE A.L.; HANNAS A.R.; CALABRIA M.P.; MAGALHÃES A.C.; PEREIRA J.C.; BUZALAF M.A. Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase. **J Dent Res** 2012 91(12):1119-23.
- KATO M.T.; BOLANHO A.; ZARELLA B.L.; SALO T.; TJÄDERHANE L.; BUZALAF M.A.R. Sodium fluoride inhibits MMP-2 and MMP-9. **J Dent Res** 2014;93:74-7.
- KHOURI H.E.; PLOUFFE C.; HASNAIN S.; HIRAMA T.; STORER A.C.; MÉNARD R. A model to explain the pH-dependent specificity of cathepsin B-catalysed hydrolyses. **Biochem J** 1991;275(Pt. 3):751-7.
- KLETER G.A.; DAMEN J.J.; EVERTS V.; NIEHOF J.; TEN CATE J.M. The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin *in vitro*. **J Dent Res** 1994;73:1523-9.
- KLONT B.; TEN CATE J.M. Remineralization of bovine incisor root lesions *in vitro*: the role of the collagenous matrix. **Caries Res** 1991;25:39-45.
- KIM Y.K.; MAI S.; MAZZONI A.; LIU Y.; TEZVERGIL-MUTLUAY A.; TAKAHASHI K.; ZHANG K.; PASHLEY D.H.; TAY F.R. Biomimetic remineralization as a progressive dehydration mechanism of collagen matrices--implications in the aging of resin-dentin bonds. **Acta Biomater** 2010b;6:3729-39.
- KINNEY J.H.; BALOOCH M.; HAUPT D.L.; MARSHALL S.J.; MARSHALL G.W. Mineral distribution and dimensional changes in human dentin during demineralization. **J Dent Res** 1995;74:1179-84.
- KONTTINEN Y.T.; HALINEN S.; HANEMAAIJER R.; SORSA T.; HIETANEN J.; CEPONIS A.; XU J.W.; MANTHORPE R.; WHITTINGTON J.; et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-9 type IV collagenase/gelatinase implicated in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. **Matrix Biol** 1998;17:335-47.
- LIU Y.; LI N.; QI Y.; NIU L.N.; ELSHAFIY S.; MAO J.; BRESCHI L.; PASHLEY D.H.; TAY F.R. The use of sodium trimetaphosphate as a biomimetic analog of matrix phosphoproteins for remineralization of artificial caries-like dentin. **Dent Mater** 2011a;27:465-77.
- LIU Y.; TJÄDERHANE L.; BRESCHI L.; MAZZONI A.; LI N.; MAO J.; PASHLEY D.; TAY F. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. **J Dent Res** 2011b;90:953-68.
- MARTIN-DE LAS HERAS S.; VALENZUELA A.; OVERALL C.M. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. **Arch Oral Biol** 2000;45(9):757-65.

MAGALHÃES A.C.; WIEGAND A.; RIOS D.; HANNAS A.; ATTIN T.; BUZALAF M.A. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion *in situ*. **J Dent** 2009;37:994-8.

MAI S.; KIM Y.K.; KIM J.; YIU C.K.; LING J.; PASHLEY D.H.; TAY F.R. *In vitro* remineralization of severely compromised bonded dentin. **J Dent Res** 2010;89:405-10.

MAI S.; KIM Y.K.; TOLEDANO M.; BRESCHI L.; LING J.Q.; PASHLEY D.H.; TAY F.R. Phosphoric acid esters cannot replace polyvinylphosphonic acid as phosphoprotein analogs in biomimetic remineralization of resin-bonded dentin. **Dent Mater** 2009;25:1230-9.

MEI M.L.; LI Q.L.; CHU C.H.; YIU C.K.; LO E.C. The inhibitory effects of silver diamine fluoride at different concentrations on matrix metalloproteinases. **Dent Mater** 2012;28:903-8.

NAGASE H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. **Biol Chem** 1997;378:151-60.

NASCIMENTO F.D.; MINCIOTTI C.L.; GERALDELI S.; CARRILHO M.R.; PASHLEY D.H.; TAY F.R.; et al. **Cysteine cathepsins in human carious dentin**. **J Dent Res** 2011;90:506-11.

NIU L.N.; ZHANG L.; JIAO K.; LI F.; DING Y.X.; WANG D.Y. et al. Localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. **J Dent** 2011;39(8):536-42.

OSORIO R.; YAMAUTI M.; OSORIO E.; RUIZ-REQUENA M.E.; PASHLEY D.H.; TAY F.R. et al. Zinc reduces collagen degradation in demineralized human dentin explants. **J Dent** 2011;39:148-53.

PALOSAARI H.; PENNINGTON C.J.; LARMAS M.; EDWARDS D.R.; 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 D.H.; TAY F.R.; YIU C.; HASHIMOTO M.; BRESCHI L.; CARVALHO R.M.; ITO S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. **J Dent Res** 2004;83:216-21.

PASHLEY D.; TAY F.; BRESCHI L.; TJÄDERHANE L.; CARVALHO R.; CARRILHO M.; TEZVERGIL-MUTLUAY A. State of the art etch-and-rinse adhesives. **Dent Mater** 2011;27:1-16.

SAUNDERS R.H.; MEYEROWITZ C. Dental caries in older adults. **Dent Clin North Am** 2005;49:293-308.

SCAFFA P.M.; VIDAL C.M.; BARROS N.; GESTEIRA T.F.; CARMONA A.K.; BRESCHI L.; PASHLEY D.H.; TJÄDERHANE L.; TERSARIOL I.L.; NASCIMENTO

F.D.; CARRILHO M.R. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. **J Dent Res** 2012;91:420-5.

SCHLUETER N.; GANSS C.; PÖTSCHKE S.; KLIMEK J.; HANNIG C. Enzyme activities in the oral fluids of patients suffering from bulimia: a controlled clinical trial. **Caries Res** 2012a;46(2):130-9.

SCHLUETER N.; GLATZKI J.; KLIMEK J.; GANSS C. Erosive-abrasive tissue loss in dentine under simulated bulimic conditions. **Arch Oral Biol** 2012b; 57(9):1176-82.

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.

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;81:603-7.

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;52:121-7.

SESEOGULLARI-DIRIHAN R.; MUTLUAY M.M.; VALLITTU P.; PASHLEY A.; TEZVERGIL-MUTLUAY A. Effect of pretreatment with collagen crosslinkers on dentin protease activity. **Dent Mater** 2015; 31:941–47.

TERSARIOL I.; GERALDELI S.; MINCIOTTI C.; NASCIMENTO F.; PÄÄKKÖNEN V.; MARTINS M.; CARRILHO M.; PASHLEY D.; TAY F.; SALO T.; TJÄDERHANE L. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. **J Endod** 2010;36:475-81.

TEZVERGIL-MUTLUAY A.; AGEE K.A.; HOSHIKA T.; TAY F.R.; PASHLEY D.H. The inhibitory effect of polyvinylphosphonic acid on functional matrix metalloproteinase activities in human demineralized dentin. **Acta Biomater** 2010b;6:4136-42.

TEZVERGIL-MUTLUAY A.; MUTLUAY M.; SESEOGULLARI-DIRIHAN R.; AGEE K.A.; KEY W.O.; SCHEFFEL D.; et al. Effect of phosphoric acid on the degradation of human dentin matrix. **J Dent Res** 2013;92:87-91.

TOLEDANO M.; YAMAUTI M.; OSORIO E.; OSORIO R. Zinc-inhibited MMP-mediated collagen degradation after different dentine demineralization procedures. **Caries Res** 2012;46:201-7.

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(8):1622-9.

TJÄDERHANE L.; SULKALA M.; SORSA T.; TERONEN O.; LARMAS M.; SALO T. The effect of MMP inhibitor metastat on fissure caries progression in rats. **Ann N Y Acad Sci** 1999;878:686-8.

TJÄDERHANE L.; NASCIMENTO F.D.; BRESCHI L.; MAZZONI A.; TERSARIOL I.L.; 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.

TJÄDERHANE L.; BUZALAF M.A.; CARRILHO M.; CHAUSSAINE C. Matrix Metalloproteinases and Other Matrix Proteinases in Relation to Cariology: The Era of 'Dentin Degradomics'. **Caries Res** 2015; 49:193–208.

TURK B.; BIETH J.G.; BJÖRK I.; DOLENC I.; TURK D.; CIMERMAN N.; et al. Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins. **Bio Chem Hoppe-Seyler** 1995;376:225–30.

TURK B.; TURK D.; TURK V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. **Biochim Biophys Acta** 2000; 1477(1–2): 98–111.

VIDAL C.M.; TJÄDERHANE L.; SCAFFA P.M.; TERSARIOL I.L.; PASHLEY D.; NADER H.B.; NASCIMENTO F.D.; CARRILHO M.R. Abundance of MMPs and cysteine cathepsins in caries-affected dentin. **J Dent Res** 2014;93:269–274.

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

VUOTILA T.; YLIKONTIOLA L.; SORSA T.; LUOTO H.; HANEMAAIJER R.; SALO T.; TJÄDERHANE L. The relationship between MMPs and pH in whole saliva of radiated head and neck cancer patients. **J Oral Pathol Med** 2002;31:329-38.

WIEGAND A.; ATTIN T. Design of erosion/abrasion studies – insights and rational concepts. **Caries Res** 2011;45(suppl 1):53-9.

ZARELLA B.L.; CARDOSO C.A.; PELÁ V.T.; KATO M.T.; TJÄDERHANE L.; BUZALAF M.A. The role of matrix metalloproteinases and cysteine-cathepsins on the progression of dentine erosion. **Arch Oral Biol** 2015;60(9):1340-5.

ZEHNDER M.; WEGEHAUPT F.J.; ATTIN T. A first study on the usefulness of matrix metalloproteinase 9 from dentinal fluid to indicate pulp inflammation. **J Endod** 2011;37:17-20.

Anexos

ANEXO A – Artigo publicado no periódico Archives of Oral Biology – 2015, referente ao subprojeto 1.

ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY 60 (2015) 1340–1345

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/aob>

The role of matrix metalloproteinases and cysteine-cathepsins on the progression of dentine erosion

B.L. Zarella^a, C.A.B. Cardoso^a, V.T. Pelá^a, M.T. Kato^b, L. Tjäderhane^c,
M.A.R. Buzalaf^{a,*}

^a Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Department of Oral Biology, 9-75 Al. Octávio Pinheiro Brisolla, Bauru, SP 17012-901, Brazil

^b University of Sagrado Coração, Department of Dentistry, 10-50 Irmã Arminda ST, Bauru, SP 17011-160, Brazil

^c Institute of Dentistry, University of Oulu, and Medical Research Center Oulu, Oulu University Hospital, PO Box 5281, 90014 Oulu, Finland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 December 2014

Received in revised form

4 May 2015

Accepted 14 June 2015

Available online

Keywords:

Erosion

Dentine

Matrix metalloproteinases

Cysteine cathepsins

Inhibitors

ABSTRACT

Objective: To evaluate *in vitro* the effect of the inhibition of endogenous dentinal enzymes (matrix metalloproteinases-MMPs and cysteine cathepsins-CCs) on dentine erosion.

Design: Dentine blocks (4 mm × 4 mm × 2 mm) from sound human teeth were randomly divided into 7 groups (n = 17) according to the treatment: MMP- and CC-inhibitor chlorhexidine digluconate (CHX, 10 mM); MMP-inhibitor galardin (G, 0.2 mM); specific cathepsin B inhibitor (CCB, 0.2 mM); non-specific CC inhibitor (CCE-64, 0.5 μM); fluoride (F, 1.23% NaF); placebo (P) and untreated (UT). Inhibitors were applied as gels once for 1 min. Specimens were submitted to 5 days of pH cycling including the erosive challenge (Coke, pH 2.64, 90 s/day) and remineralisation (artificial saliva). Demineralised organic surface loss was determined profilometrically. Demineralised organic matrix (DOM) was removed with collagenase and the profile was re-evaluated in the absence of collagen fibrils. The differences in profilometric results and DOM thickness among the groups were analysed with ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$).

Results: Loss of demineralised tissue (μm, mean ± SD) was: CHX 8.4 ± 1.7 b, G 8.6 ± 1.9 b, CCB 9.6 ± 1.4 a, CCE-64 9.9 ± 1.3 a, F 9.9 ± 1.7 a, P 10.9 ± 2.2 a, UT 11.0 ± 1.5 a. Loss of mineralised tissue was: CHX 15.4 ± 2.2 b, G 16.0 ± 1.8 b, CCB 17.6 ± 2.4 a, CCE-64 17.6 ± 2.0 a, F 17.3 ± 2.8 a, P 19.1 ± 2.1 a, UT 18.9 ± 2.4 a. MMP-inhibitors significantly reduced organic matrix and mineral loss in comparison to all the other groups ($p < 0.05$). No statistically significant differences were found in the thickness of the remaining DOM ($p = 0.845$).

Conclusion: Dentine endogenous MMPs seem to be the main enzymes responsible for DOM loss and erosion.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail address: mbuzalaf@fob.usp.br (M.A.R. Buzalaf).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.06.011>

0003-9969/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The marked role of fluoride (F) in preventing dental caries, producing a favourable balance in tooth de- and remineralisation, has been well established.¹ However, its action on the prevention of dentine erosion seems to depend on the maintenance of the demineralised organic matrix (DOM).² The maintenance of the DOM after erosive demineralisation may be important to prevent or reduce further demineralisation, slowing down ionic diffusion to and from the demineralising area.^{3,4} DOM is susceptible to breakdown by host-derived salivary or endogenous dental enzymes, including matrix metalloproteinases (MMPs)^{5–7} and cysteine cathepsins.^{8,9} Indeed, both *in situ* and *in vitro* studies have indicated the protective effect of MMP inhibitors against dentine erosion.^{10–15} However, the role of cysteine cathepsins in dentine erosion progression has not been evaluated so far.

Chlorhexidine (CHX) is perhaps the most well studied inhibitor of endogenous dentine enzymes, especially in relation to the collagen degradation of adhesive composite hybrid layer.¹⁶ CHX has also been shown to reduce erosive wear with and without abrasion with the efficacy comparable to fluoride and MMP-inhibiting green tea extracts.¹⁴ Since CHX is also a potent inhibitor of dentinal cysteine cathepsins,¹⁷ it is possible that dentine cysteine cathepsins⁸ would be at least partly responsible for the loss of DOM after erosive challenge. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of specific MMP and CC on dentine erosion *in vitro*. This will allow to determine the relative role of MMPs and CCs on the progression of dentine erosion.

2. Materials and methods

2.1. Sample preparation

Recently extracted non-carious human third molars were used in this study. The protocol was approved by the Institutional Review Board of Bauri Dental School, University of São Paulo. Teeth were stored in 0.1% buffered thymol solution (pH 7.0) at 4 °C. The crowns were sectioned from the roots with a diamond saw (Isomet 1000; Buehler, Lake Bluff, IL, USA). Dentine slabs (4 × mm 4 mm × 2 mm) were cut from the cervical third of the root under water cooling and ground flat with water-cooled carborundum discs (320, 600 and 1200 grades of Al₂O₃ papers; Buehler), removing around 200 µm of surface tooth. Finally, the specimens were polished with felt paper wet by diamond spray (1 µm; Buehler) on a rotating polishing machine. After polishing, the specimens were cleaned in ultrasound bath (T7 Thornton, Unique Ind. e Com. Ltda., São Paulo, SP, Brazil) for 2 min. The removal of the cement was checked using a microscope (×40 magnification). The specimens were mounted on acrylic blocks with sticky wax and randomly assigned into 7 groups of 17 specimens each that differed according to the treatment gel. Among the 17 specimens in each group, 15 were used for profilometric measurements and two for SEM. In order to establish reference surfaces for lesion depth determination, two thirds of the specimens' outer surface were covered with two layers

of nail varnish to create control areas on both sides, leaving the middle unprotected.

2.2. Treatment and pH cycling model

The enzyme inhibitor concentrations used in this study were based on previous studies. The treatment groups were as follows:

- chlorhexidine (CHX, 10 mM as chlorhexidine digluconate; Sigma, Steinheim, Germany);¹⁷
- galardin, GM 6001 (G, 0.2 mM, Cat. no.364205, Calbiochem, San Diego, USA);¹⁸
- specific cathepsin B Inhibitor II (CATB, 0.2 mM; Cat. no. 219385, Calbiochem, San Diego, CA, USA);¹⁹
- non-specific cysteine cathepsin inhibitor E-64 (E-64, 5 µM; Cat. no. 324890, Calbiochem, San Diego, CA, USA);¹⁷
- fluoride (F, 1.23% NaF, positive control; Sigma, Steinheim, Germany);^{12,15}
- no active compound (P, negative control, placebo gel)
- no treatment (UT, untreated)

All gel formulations, prepared in our laboratory, had essentially the same composition (hydroxyethylcellulose, propylene glycol, methylparaben, imidazolidinyl urea and deionized water),¹² except for the active principle. The gels were applied on the specimens in a thin layer using a microbrush for 1 min only once and carefully removed with a cotton swab.^{12,13,15}

For erosive demineralisation, each specimen was individually immersed in 30 mL of Coca-Cola (Cia de Bebidas Ipiranga, Ribeirão Preto, Brazil, pH 2.6) for 90 s, 4 times per day, during 5 days. After each demineralisation challenge, the specimens were rinsed with deionised water (10 s) and immersed in artificial saliva²⁰ containing 0.2 mM glucose, 9.9 mM NaCl, 1.5 mM CaCl₂·2H₂O, 3 mM NH₄Cl, 17 mM KCl, 2 mM NaSCN, 2.4 mM K₂HPO₄, 3.3 mM urea, 2.4 mM NaH₂PO₄, 0.05 mM ZnCl₂ and traces of ascorbic acid (pH 6.8, 30 mL/specimen, unstirred, 25 °C) for 1 h at 37 °C. The soft drink was changed at each erosive challenge and the artificial saliva was replaced daily. The specimens were also stored in artificial saliva overnight.

2.3. Scanning electron microscopy

After erosive demineralisation, supplementary specimens (n=2 for each group) were rinsed for 10 min in 0.1 M cacodylate buffer (pH = 7.4) at 4 °C, fixed overnight in 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer at 4 °C, rinsed in sodium cacodylate buffer for 10 min at room temperature (RT), and fixed with osmium tetroxide 1% (2 h/ 2 times/RT) and then washed in distilled water for 30 min at RT. Fixed specimens were dehydrated in an ascending ethanol series (50°, 70°, 80°, 90°, 95°, 100°, renewing each solution twice for 30 min at RT). They were then fractured, critical point dried (CPD 030, Balzers, Germany) and gold sputtered (Denton Vacuum Desk IV, New Jersey, USA). Sections were observed using a scanning electron microscope (FEI company, Eindhoven, Holanda) equipped with a tungsten cathode. The acceleration voltage was set to 5 kV. The original magnification of the SEM images was 500-fold.

2.4. Profilometric analyses

The first profilometric measurement allowed the measurement of the level of the demineralised surface compared to an untreated reference area (the loss of both mineral and organic component of dentine).²¹ Measurements were performed with a contact profilometer (Mahr Perthometer, Göttingen, Germany). The nail varnish was carefully removed using a scalpel and acetone solution (1:1 water). Measurement was performed under standardised moisture control²¹ to avoid shrinkage of the dentine. Briefly, specimens surfaces were covered with deionised water for 30 s before the measurement. The water was removed with absorbent tissue without touching the specimens and tracings were immediately obtained. The diamond stylus moved from the first reference to the exposed area and then over to the other reference area (2.5 mm long and 2.0 mm wide). Five profile measurements were performed at intervals of 0.5 mm. The vertical distance between the horizontal line drawn on the reference areas and the horizontal line drawn on experimental area was defined as tooth wear by using the software (Mahr Surf XT20, 2009).

The second profilometric analysis was performed after the removal of the DOM with collagenase. Removal of the DOM was achieved by immersing the specimens in mineral solution containing type VII collagenase from *Clostridium histolyticum* (100 units/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) for 96 h at 37 °C, under agitation. After removing the DOM, profilometric measurement was performed exactly as described above. It revealed the loss of mineral compartment by measuring the demineralisation front.²¹

The thickness of the DOM was calculated as the difference between the second and first profilometric measurements.²¹

2.5. Statistical analysis

The software GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, USA) was used. The assumptions of normal distribution of data and equality of variances were checked for all the variables tested, using the Kolmogorov-Smirnov and Bartlett tests, respectively. For the profilometric measurements, these criteria were satisfied and data were analysed by ANOVA

followed by Tukey's test. For thickness of the DOM, data did not pass normality and were analyzed by Kruskal-Wallis and Dunn's test. The level of significance was set at 5%.

3. Results

The profiles obtained for the first and second profilometric measurements within the groups were quite similar (Table 1). The gels containing 10 mM CHX and 0.2 mM galardin, the MMP inhibitors, significantly reduced the loss of organic surface material and of mineral compartment as compared with the other gels or the untreated group ($F = 5.57$, $p < 0.0001$ and $F = 4.95$, $p = 0.0002$ for the first and second profilometric measurements, respectively). Fluoride gel (positive control), cathepsin inhibitor gels, placebo gel and untreated groups did not show statistically significant differences either in the first or the second profilometric analyses (Table 1). The thickness of remaining organic surface was not significantly different among the groups ($KW = 2.705$, $p = 0.845$) (Table 1).

Fig. 1 shows typical SEM images of specimens of each group, after erosive demineralisation. Despite the DOM can be seen to some extent in all the groups, in the specimens treated with CHX and galardin it appears to be more organised.

4. Discussion

The dentine samples treated with CHX and galardin, both known to inhibit the MMPs, had the lowest rate of erosion. The preservation of the integrity of DOM was significantly better than with non-treated and negative control groups. CC inhibitors had a lower rate of erosion progression than the controls, but the differences between the groups did not reach statistical significance. Therefore the present study indicates that the dentinal endogenous MMPs are the principal group of enzymes responsible for the loss of DOM. Also CHX, known to inhibit also CCs, had the best effect of all groups. Thus the data actually indicates that CCs may have some function in DOM degradation, even if the outcome is not as pronounced as with MMPs. Even though MMPs and CCs relative activities have a

Table 1 – Loss (μm , mean $\pm$ SD) of demineralised organic surface material (DOSM; first profilometric measurement) and of mineralised tissue (MT; second profilometric measurement), as well as thickness of residual DOM (loss of MT – loss of DOSM) on dentine specimens treated with gels containing protease inhibitors or not and submitted to erosive demineralisation.

Inhibition	Treatments	Loss of DOSM ^a	Loss of MT ^a	Thickness of residual DOM ^a
MMP inhibitors	10 mM CHX ^A gel	8.4 $\pm$ 1.7 b	15.4 $\pm$ 2.2 b	7.0 $\pm$ 2.3 a
	0.2 mM galardin	8.6 $\pm$ 1.9 b	16.0 $\pm$ 1.8 b	7.3 $\pm$ 1.8 a
Cathepsin inhibitors	0.2 mM Inhibitor II	9.6 $\pm$ 1.4 a	17.6 $\pm$ 2.4 a	7.9 $\pm$ 1.8 a
	0.5 μM E64	9.9 $\pm$ 1.3 a	17.6 $\pm$ 2.0 a	7.0 $\pm$ 3.0 a
Controls	1.23% NaF gel	9.9 $\pm$ 1.7 a	17.3 $\pm$ 2.8 a	7.1 $\pm$ 2.3 a
	Placebo gel	10.9 $\pm$ 2.2 a	19.1 $\pm$ 2.1 a	8.0 $\pm$ 3.5 a
	No treatment	11.0 $\pm$ 1.5 a	18.9 $\pm$ 2.4 a	7.8 $\pm$ 3.2 a

In each column, means followed by distinct letters are significantly different.
n = 15.

^A Also inhibits cathepsins.

^a ANOVA and Tukey's test ($p < 0.001$).

^b Kruskal-Wallis and Dunn's test ($p = 0.845$).

Fig. 1 – Typical SEM images of specimens of each group, after erosive demineralisation. The treatment groups are represented from 1 to 7 as follows: 1. 10 mM CHX gel; 2. 0.2 mM galardin gel; 3. 0.2 mM Inhibitor II gel; 4. 0.5 µM E64 gel; 5. 1.23% NaF gel; 6. placebo gel; 7. no treatment. The preservation of the DOM is more visible at the specimens treated with CHX and galardin.

significant correlation in dentin⁸, the functional activities may have marked differences. The difference in outcome may be related to the amount of MMPs and CCs in dentine. However, quantitative comparison is difficult and even fruitless, as the amount of enzyme may not be the determining factor, but the activation and the environment allowing the functional activity. Markedly (approximately 10x) higher MMP than CC activity has been demonstrated in demineralised dentine incubated in simulated body fluid (SBF).²² Our data seems to correlate with this finding.

Another aspect affecting the outcome in the present work may be the protocol of pH cycling. The optimum pH for MMPs to function is around neutral conditions. Cathepsin B may have optimum pH around 7.4 for endopeptidase activity,²³ but in general CCs have optimal functional activity in slightly acidic pH, and may be even be irreversibly inactivated at neutral pH.²⁴ For this reason, we believed that MMPs and CCs would play complementary roles in dentine erosion, where cycles of low pH are alternated with cycles of neutral pH, which did not seem to be the case. The denaturation of dentinal CCs by the erosive acidity in this study is highly unlikely, since the exposure of DOM to pH values less than 1 for 15 min is not sufficient to inhibit DOM MMP or CC activities.²² Since the erosive (acidic) exposure in this experiment was short (total of 6 min per day for five days), the duration of the optimum pH for the endogenous CCs to function may have not been long enough to produce excessive DOM degradation. On the other hand, since the time was planned to mimic erosive challenge that would occur clinically,²⁵ it may thus indicate that the role of CCs in erosive DOM degradation is much less significant than that of MMPs.

It is also possible that CCs may activate MMPs during erosive period, as has been suggested to occur in dentinal caries lesions.⁹ At least cathepsin B directly cleaves and inactivates MMP-specific tissue inhibitors TIMP-1 and -2,²⁶ changing the balance between MMPs and their specific inhibitors. Acidic pH in erosion may activate dentinal cysteine cathepsins, which in turn could either proteolytically activate proMMPs or degrade TIMP-inhibiting MMPs, or both, resulting in MMP activation. The MMPs would become functional after neutralisation of pH by salivary buffers. The *in vitro* model used in this study cannot be used to confirm this, since the MMP activation may also occur by low pH itself.⁵ And even if this would be true, the enzymes finally responsible for the DOM degradation would be MMPs. Therefore, if DOM is to be retained, the aim should be in the inhibition of MMPs. This must be kept in mind when new products to prevent dentine erosion are developed.

In the present study, treatment with 1.23% NaF gel slightly reduced dentine loss compared with placebo, but the difference did not reach statistical significance, as reported previously in an *in situ* study.¹² Even though fluoride has MMP-inhibiting effect in addition to the remineralisation potential,^{27,28} 1.23% NaF apparently is not enough to prevent DOM degradation and erosion progression in dentine. Different fluoride compounds, such as stannous or titanium fluoride, may have better protective effect in erosion than sodium fluoride.^{2,29} The effect of stannous fluoride has been proposed to be based on improved acid resistance, as the effect has also been seen in enamel where no organic matrix occurs.^{30,31} The role of metallic ions on dentinal enzyme

function is not well understood, but at least Zn^{32,33} and iron¹² have been suggested to inhibit DOM MMPs.

In conclusion, the present results support the previous studies indicating the role of MMPs in the dentine erosion, and the potential of MMP inhibition in preventing or slowing down the progression of erosion in dentine. The other collagenolytic enzymes present in dentine and saliva, CCs, seem to have less or no significance. Therefore, the future studies should concentrate on finding the optimal MMP inhibitors and delivery modes to allow the development of clinically relevant and effective treatment modes in prevention of erosion. In the present study, the gels were applied only once, before the pH cycles were initiated, following protocols from previous studies.^{12,13} It is possible that even higher degrees of protection could be obtained if the gels had been applied between the cycles, or at least after the first erosion¹⁵, which should be tested in further experiments.

Conflict of interest

The authors declare the following conflict of interest: The University of São Paulo has a patent request in Brazil (INPI) for "Dental products containing matrix metalloproteinases inhibitors and their use".

Acknowledgements

The authors thank CAPES and FAPESP (2013/19657-8) for the concession of scholarships to the first and third authors, respectively. This study was supported by CNPq (401347/2012-5).

REFERENCES

1. Buzalaf MA, Pessan JP, Honório HM, ten Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr Oral Sci* 2011;22:97–114.
2. 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;44:248–52.
3. 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;73:1523–9.
4. 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;49:931–5.
5. 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;77:1622–9.
6. Boushell LW, Nagaoka H, Nagaoka H, Yamauchi M. Increased matrix metalloproteinase-2 and bone sialoprotein response to human coronal caries. *Caries Res* 2011;45:453–9.
7. Buzalaf MA, Kato MT, Hannas AR. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. *Adv Dent Res* 2012;24:72–6.
8. Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Pääkkönen V, Martins MT, et al. Cysteine cathepsins in human dentin–pulp complex. *J Endod* 2010;36:475–81.

9. Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldeli S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. *J Dent Res* 2011;90:506–11.
10. Barbosa CS, Kato MT, Buzalaf MA. Effect of supplementation of soft drinks with green tea extract on their erosive potential against dentine. *Aust Dent J* 2011;56:317–21.
11. 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;17:560–4.
12. Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MA. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. *J Dent Res* 2010;89:468–72.
13. 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* 2010;44:309–16.
14. 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;37:994–8.
15. Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Calabria MP, Magalhães AC, Pereira JC, et al. Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase. *J Dent Res* 2012;91:1119–23.
16. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol ILS, Geraldeli S, et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer – a review. *Dent Mater* 2013;29:999–1011.
17. 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;91:420–5.
18. Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L, et al. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dent Mater* 2010;26:571–8.
19. McConnell RM, York JL, Frizzell D, Ezell C. Inhibition studies of some serine and thiol proteinases by new leupeptin analogues. *J Med Chem* 1993;36:1084–9.
20. Klimek J, Hellwig E, Ahrens G. Fluoride taken up by plaque, by the underlying enamel and by clean enamel from three fluoride compounds in vitro. *Caries Res* 1982;16:156–61.
21. Schlueter N, Glatzki J, Klimek J, Ganss C. Erosive-abrasive tissue loss in dentine under simulated bulimic conditions. *Arch Oral Biol* 2012;57:1176–82.
22. Tezvergil-Mutluay A, Mutluay M, Seseogullari-Dirihan R, Agee KA, Key WO, Scheffel D, et al. Effect of phosphoric acid on the degradation of human dentin matrix. *J Dent Res* 2013;92:87–91.
23. Khouri HE, Plouffe C, Hasnain S, Hirama T, Storer AC, Ménard R. A model to explain the pH-dependent specificity of cathepsin B-catalysed hydrolyses. *Biochem J* 1991;275:751–7.
24. Turk B, Bieth JG, Björk I, Dolenc I, Turk D, Cimerman N, et al. Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins. *Biol Chem* 1995;376:225–30.
25. Wiegand A, Attin T. Design of erosion/abrasion studies – insights and rational concepts. *Caries Res* 2011;45(Suppl. 1):53–9.
26. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997;378:151–60.
27. Mei ML, Li QL, Chu CH, Yiu CK, Lo EC. The inhibitory effects of silver diamine fluoride at different concentrations on matrix metalloproteinases. *Dent Mater* 2012;28:903–8.
28. Kato MT, Bolanho A, Zarella B, Salo T, Tjäderhane L, Buzalaf MAR. Sodium fluoride inhibits MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res* 2014;93:74–7.
29. Magalhães AC, Kato MT, Rios D, Wiegand A, Attin T, Buzalaf MA. The effect of an experimental 4% TiF₄ varnish compared to NaF varnishes and 4% TiF₄ solution on dental erosion in vitro. *Caries Res* 2008;42:269–74.
30. Ganss C, Schlueter N, Hardt M, Schattenberg P, Klimek J. Effect of fluoride compounds on enamel erosion in vitro: a comparison of amine, sodium and stannous fluoride. *Caries Res* 2008;42:2–7.
31. Hove LH, Holme B, Young A, Tveit AB. The protective effect of TiF₄, SnF₂ and NaF against erosion-like lesions in situ. *Caries Res* 2008;42:68–72.
32. Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley DH, Tay FR, et al. Zinc reduces collagen degradation in demineralized human dentin explants. *J Dent* 2011;39:148–53.
33. Toledano M, Yamauti M, Osorio E, Osorio R. Zinc-inhibited MMP-mediated collagen degradation after different dentine demineralization procedures. *Caries Res* 2012;46:201–7.