CLAUDIA MARÍA CARPIO BONILLA

**RADIOTERAPIA ATIVA E INIBIDORES DE PROTEASES INATIVAM MMPs,
NA JUNÇÃO AMELODENTINÁRIA DE DENTES PERMANENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria, área de Concentração em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Orientada: Claudia María Carpio Bonilla

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz

Ribeirão Preto

2016

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Carpio Bonilla, Claudia María.

Radioterapia ativa e inibidores de proteases inativam MMPs, na junção amelodentinária de dentes permanentes. Ribeirão Preto, 2016.

143p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP – Programa de Pós-graduação em Odontopediatria.

Orientadora:. Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz

1. Junção Amelodentinaria.
2. Esmalte dentário.
3. Radioterapia.
4. Metaloproteinases da matriz.
5. Neoplasias de cabeça e pescoço.
6. Desmineralização dentaria.
7. Fluoreto de Sódio.
8. Digluconato de Clorexidina.
9. Polifenol epigallocatequina 3-galato

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carpio-Bonilla, CM. **Radioterapia ativa e inibidores de proteases inativam MMPs, na Junção amelodentinária de dentes permanentes.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria, área de Concentração em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Data da defesa: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

CLAUDIA MARÍA CARPIO BONILLA

Nascimento 16 de Junho de 1987- Guatemala/Guatemala

Filiação Julio César Carpio Elías
Irma Judith Bonilla Gornzalez

2005-2012 Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia da Universidade de San Carlos de Guatemala-
USAC

2014-2016 Curso de Aperfeiçoamento no Atendimento Odontológico a Pacientes
Especiais.

2014-2015 Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP
Curso de Aperfeiçoamento Dor Orofacial e Disfunção Têmporo Mandibular.

2013-2015 Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP
Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Odontologia
Área de concentração: Odontopediatria
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP
Bolsa: PEC-PG/Cnpq

*"A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas e daí?
Nós devemos ter perseverança e sobretudo a confiança em nós.
Devemos acreditar que nós seremos agraciados por algo e que esta coisa deve ser alcançada."
Marie Skłodowska-Curie*

Dedicatória

DEDICATÓRIA

À DEUS

Por ser essencial em minha vida, meu guia, socorro presente na hora da angústia, por ter me permitido buscar meus objetivos e realizar meus sonhos.

“Se pedires, Deus te dará. Se buscares, Deus te fará encontrar. Se bateres, Deus te abrirá a porta. Pois tudo o que pedes, recebes de Deus. O que buscas, encontras em Deus e para quem bate, Deus abrirá as portas”.

Ao meu país Guatemala

A quem espero ajudar com todo o aprendizado durante meu mestrado.

Aos meus pais, Julio César Carpio Elías e Irma Judith Bonilla González

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

Ao meus irmãos Pedro Julio Carpio Bonilla e Javier Carpio Bonilla

Que por mais difícil que fossem as circunstâncias, sempre me transmitiram força e coragem, vocês são meu motor nos momentos de dificuldades. Quero ser sempre um bom exemplo para vocês, pois vocês são o que mais amo na vida.

À minha querida família

Que iluminaram de maneira especial os meus pensamentos.

Agradecimento Especial

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora. **Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz**, a quem agradeço infinitamente, por que sem me conhecer me abriu as portas da sua casa e me apoiou no processo de adaptação, tornando minha estadia no Brasil mais fácil. Obrigada por sem me conhecer, me dar a oportunidade de começar um projeto juntas, obrigada por acreditar na minha capacidade e me receber como aluna. Ao longo deste tempo acredito que com seu exemplo, não fui orientada unicamente na minha investigação, também fui orientada a ser uma melhor mulher e pessoa. Admiro à senhora, não só como professora e pesquisadora, se não também como pessoa, seu carisma para ensinar, me inspiram a seguir seus passos. Muito Obrigada de coração, sempre serei grata a você e levarei o aprendizado na minha memória e no meu coração. Que Deus sempre cuide de você e da sua família.

Ao meu co-orientador. **Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva**, a quem agradeço infinitamente por me conceder o privilégio de ser sua aluna. O senhor sempre será para mim um exemplo de erudição, sabedoria e dedicação, tanto para a teoria como para a prática. Agradeço pela orientação, contribuindo de forma imensurável para meu aprendizado científico e clínico como profissional. Obrigada pela disponibilidade que sempre teve e sobre todo pela paciência e dedicação para explicar as coisas e fazer com que ficasse claro e entendível. Este trabalho não teria acontecido sem sua ajuda. Muito obrigada de coração, sempre serei grata a você e levarei o aprendizado na minha memória e no meu coração. Que Deus sempre cuide de você e da sua família.

"Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes."

Isaac Newton.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

À **DEUS**, por nunca me deixar sozinha e porque acredito que continuará abrindo portas para mim.

INSTITUCIONAIS

À **Universidade de São Paulo**, na pessoa do atual reitor, **Prof. Dr. Marco Antonio Zago** e do vice-reitor, **Prof. Dr. Vahan Agopyan**.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, na pessoa da Diretora **Prof. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva** e o Vice – Diretor **Prof. Dr. Arthur Belem Novaes Júnior**.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da coordenadora, **Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato** e da vice-coordenadora, **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**.

À **PEC-PG** e **Cnpq** pela bolsa concedida.

À FAMÍLIA ODONTOLÓGICA

Aos professores da disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Profa. Dra. Lea Assed Bezerra da Silva**, **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, **Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato**, **Profa. Dra. Adelvina Campos de Freitas**, **Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz**, **Profa. Dra. Andiará de Rossi Daldegan**, **Profa. Dra. Kranya Victoria Díaz Serrano**, **Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto**, **Profa. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva**, **Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho**, por repassarem seus conhecimentos e por sua colaboração e incentivo durante minha formação acadêmica, sendo meu exemplo de excelência e dedicação.

À **Profa. Dra. Regina Guenka Palma-Dibb**, pela orientação e disposição na realização deste trabalho. Muito obrigada.

À **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, exemplo de profissional e professor, obrigada por todos os conhecimentos transmitidos e pelas orientações que me tornaram com certeza, uma melhor profissional. Se algum dia chegar a ser pelo menos um pouquinho do que o senhor é, me sentirei muito grata. Muito obrigada.

À **Profa. Dra. Kranya Victoria Díaz Serrano**, por sua amizade, disponibilidade e preocupação, por ser um orgulho e exemplo para todos os estrangeiros que saímos de nossos pais em procura de um sonho. Obrigada pela sua amizade e por todos os conhecimentos transmitidos durante meu mestrado. Se algum dia chegar a ser pelo menos um pouquinho do que a senhora é, me sentirei muito grata. Muito obrigada.

Ao **Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho**, pela orientação e disposição na realização do meu mestrado. Muito obrigada.

Às **Dra. Talitha De Siqueira Mellara** e **Dra. Ligia Maria Napolitano Gonçalves**, por doar os dentes para a realização desta investigação. Obrigada especialmente à Talitha pelo apoio quando necessitei.

Aos funcionários do Departamento da Clínica Infantil, **Dra. Marilia Pacífico Lucisano**, **Marco Antonio do Santos**, **Fatima Aparecida Jacinto Daniel**, **Filomena Leli Placciti**, **Matheus Morelli Zanela**, **Rosemary Alves**, por formar parte da minha família durante estes dois anos, por me oferecer sempre um sorriso em cada cumprimento, obrigada pela convivência, pelo carinho e disposição, de cada um de vocês levo um aprendizado. Levarei vocês sempre no meu coração.

Um agradecimento em especial para **Nilza Letícia Magalhães**, pela orientação, disponibilidade e paciência, na realização deste trabalho, o trabalho do seu lado é mais leve. Acima de tudo, muito obrigada pela amizade.

À secretária da pós-graduação **Micheli Cristina Leite Rovanholo**, porque nada teria sido possível sem sua ajuda. Obrigada por ser essa mãe dentro da faculdade, pelo carinho e amizade, pelos abraços fortes e sua ajuda incondicional. Muito Obrigada.

Aos Funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora, à **Dra. Juliana Jandiroba Faraoni Romano** e à **Patrícia Marchi**, pela orientação e disposição na realização deste trabalho. Muito obrigada.

Aos Funcionários do Centro de Formação de Recursos Humanos Especializados no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais CAOPE, **Dra. Carolina Torres Mantovani**, **Benedita Viana Rodrigues (Ditinha)**, **Fátima Aparecida Rizoli (Cuquinha)**, **José Carlos Ferreira Junior (Zé)**, **Ana Paula, Jaciara, Daniel, Vilma, Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto**, pelo apoio, disposição e sobre tudo pelo carinho durante as minhas atividades nas clínicas dos pacientes especiais, realmente eu sinto que foi meu lar durante estes dois anos. Não tenho palavras para expressar meu agradecimento, levo vocês no meu coração.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, **Isabel Cristina Galino Solá**, **Mary Carmessano**, **Regiane Cristina Moi Sacilotto**, **José Aparecido Neves do Nascimento**, **Benedito Aparecido Silva**, **Karina Dadalt**, por todo o carinho e atenção e sobre tudo pelo apoio durante as minhas atividades nas Clinicas da Faculdade.

A todos os **alunos de Pós Graduação do Programa de Odontopediatria**, muito obrigada pelos conhecimentos compartilhados, pelos conselhos e momentos de alegria, por formar parte da minha família todo este tempo e me fazer sentir em casa. Obrigada por todos os momentos bons e ruins que passamos juntos, estarão sempre na minha memória e no meu coração.

Aos **meus pacientes**, a quem amo e respeito com todo meu coração, obrigada pela paciência e pelo carinho durante a realização deste sono, sem eles não tivesse motivação pela minha profissão.

AOS AMIGOS

À minhas **famílias brasileiras**, que me receberam como um membro da família, pelos lindos momentos compartilhados. Obrigada pelas palavras de força, pelos abraços apertados e pelo carinho recebido.

Às minhas queridas **amigas e amigo do mestrado e doutorado**, obrigada por todas suas lesões e o aprendizado, por fazerem toda a diferença durante meu tempo no mestrado, por serem o motivo dos meus sorrisos, por serem minha fortaleza nos momentos difíceis, vocês são parte do melhor que tenho aqui no Brasil. Obrigada sempre por seus carinhos, parceria e amizade sincera.

À minha família de **CADBI**, que até agora se faz presente em cada área da minha vida, levo de cada um de vocês um aprendizado. Muito obrigada.

À minha **família de estrangeiros e amigos**, obrigada por fazerem parte do meu tempo no Brasil, por me trazerem as melhores lembranças, por todo esse intercâmbio cultural e pelos laços de amizade eternos. Amigos é a família que escolhemos e agradeço a Deus por ter conhecido cada um de vocês, aprendi muitas coisas e sei que nossa amizade perdurará e vencerá distâncias.

À **Marco Aurélio Assugeni**, por ser minha motivação durante todo este tempo e por me ensinar o Brasil desde outra perspectiva. Muito obrigada pela parceria, eu te amo!

AO MEU PAÍS GUATEMALA

À minha Alma máter **Faculdade de Odontología da Universida de San Carlos de Guatemala, Dra. Alma Lucrecia Chinchilla, Dr. Henry Cheesman, Dr. Guillermo Barreda e Dr. Otto Guerra**, pelo apoio durante a realização do meu mestrado.

À **Guatefuturo**, por serem os primeiros em acreditar e pôr fé em mim e neste projeto, que sem dúvida será retribuído na Guatemala. Muito obrigada.

Aos meus padrinhos **Dr. Jorge Estrada, Dra. Vilma Terraza e Lic. Gabriela Ramírez**, porque desde o começo da minha formação como Dentista vocês acreditaram em mim. Muito obrigada.

À minha família e amigos guatemalatecos, por ser o pilar da minha vida. Muito obrigada.

À **Dra. Gaby Flores Bracho mi Chiki**, por me ajudar a crescer como pessoa, como mulher, amiga e irmã. Com teu profissionalismo você me deu sempre o melhor exemplo, sem dúvida não seria a profissional que sou hoje se não tivesse tido teu apoio. Aliviou cada momento aqui no Brasil, fez mais leve minha estadia e se transformou na minha irmã. Levarei no meu coração e na memória sempre todo o que aprendemos juntas. Sei que Deus tem os melhores planos para nós e a distancia nunca vai ser um impedimento para estarmos juntas, porque nossos laços agora são para sempre. Te amo muito.

Resumo

RESUMO

Carpio-Bonilla, CM. **Radioterapia ativa e inibidores de proteases inativam MMPs, na Junção amelodentinária de dentes permanentes.** Ribeirão Preto, 2016. 143p. [Dissertação de mestrado]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, São Paulo.

O tratamento radioterápico para pacientes com neoplasias de cabeça e pescoço pode trazer consequências secundárias graves como alterações da estrutura dental, com consequente prejuízo da função oral, a qual influencia negativamente a qualidade de vida. Recentemente trabalhos de pesquisa tem demonstrado que a radiação induz a expressão e ativação das metaloproteinases da matriz (MMPs), consideradas as principais enzimas responsáveis pela remodelação da matriz orgânica, incluindo os componentes e estruturas da junção amelodentinária (JAD). Questiona-se então se as alterações dentais observadas em pacientes pós-radioterapia poderiam ser causadas também pela ativação das MMPs que se encontram na JAD. O presente estudo apresentou três avaliações: a ativação e expressão das MMPs, a implementação de inibidores de proteases como método de inibição das MMPs e a ativação das MMPs devido a um desafio ácido. Para as medições foram utilizados 178 fragmentos dentais de molares, divididos aleatoriamente em 2 grupos (decíduos e permanentes) / 4 subgrupos experimentais (irradiados e não-irradiados). Os fragmentos foram expostos à radiação com Co-60, com fração de dose de 2 Gy, 5 dias consecutivos, até atingirem a dose total de 60 Gy, com um total de 30 ciclos, durante 6 semanas. Com o objetivo de determinar a expressão e atividade das MMPs, foram realizados os ensaios de imunofluorescência e zimografia *in situ*, nos fragmentos dentais de 0,6mm, analisando os tecidos duros do esmalte, dentina e JAD. Para avaliar se produtos odontológicos inativam as MMPs, os dentes foram imersos em 0,5ml de digluconato de clorexidina a 0,12%, fluoreto de sódio a 0,05%, polifenol epigallocatequina 3-galato 400µM e água destilada (grupo controle), por 1 hora. Assim também com objetivo de avaliar se em um ambiente ácido, as MMPs apresentariam maior atividade, os dentes foram colocados em contato com 20µl de solução desmineralizadora com pH de 4,8, por um minuto, e posteriormente lavados com 20µl de água deionizada, por um minuto. De maneira geral pudemos observar que a irradiação ativa as MMPs na JAD e estes efeitos foram mais evidentes nos dentes permanentes que nos decíduos. Com relação à expressão das diferentes MMPs, foi observada uma maior expressão das MMPs-9 e -20 para dentes decíduos, e para dentes permanentes as MMPs-2, -9 e -20 apresentaram expressão semelhante. Tendo em vista que a irradiação foi capaz de ativar as MMPs expressas na JAD de dentes permanentes, e em busca de soluções capazes de inibi-las, observamos que o Digluconato de Clorexidina, o Fluoreto de Sódio e o Polifenol Epigallocatequina 3-galato inibiram a atividade das MMPs na JAD em dentes permanentes. Por último ao investigar o efeito de um desafio ácido, na atividade das MMPs, observamos que a desmineralização não aumentou a atividade das MMPs em dentes não irradiados, porém aumentou a atividade das MMPs em dentes irradiados. Comparando dentes irradiados submetidos ou não à desmineralização, observou-se que a desmineralização incrementou a atividade das MMPs, já induzida pela irradiação.

Palavras-chave: Junção Amelodentinária; Esmalte dentário; Radioterapia; Metaloproteinases da matriz; Neoplasias de cabeça e pescoço; Desmineralização dentária; Fluoreto de Sódio; Digluconato de Clorexidina; Polifenol epigallocatequina 3-galato.

Abstract

ABSTRACT

Carpio-Bonilla, CM. **Radiotherapy activates and protease inhibitors inactivate MMPs in dentinoenamel junction of permanent teeth.** Ribeirão Preto, 2016. 143p. [Dissertation]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, São Paulo.

Radiotherapy for patients with head and neck cancer can have serious secondary consequences such as changes in tooth structure, with consequent loss of oral function which negatively influences an individual's quality of life. Recently research work has shown that radiation induces the expression and activation of matrix metalloproteinases (MMPs) which are considered the major enzymes responsible for the remodeling of the organic matrix, including the components and structures of the dentinoenamel junction (DEJ). It is questionable if the dental changes observed in post-radiotherapy patients could also be caused by the activation of MMPs that are in the DEJ. The present study has three assessments: the activation and expression of MMPs, the implementation of protease inhibitors such as method of inactivating MMPs and the activation of MMPs due to an acid challenge. The measurements that were used were 178 molar dental fragments randomly divided into 2 groups (deciduous and permanent) / 4 experimental subgroups (irradiated and non-irradiated). The samples were exposed to radiation using Co-60 at a cumulative dose of 2 Gy fraction, 5 consecutive days, until they reached a total dose of 60 Gy, with a total of 30 cycles for 6 weeks. In order to determine the expression and activity of MMPs immunofluorescence assays were performed and in situ zymography, the dental fragments of 0.6mm, analyzing the DEJ in three areas of the tooth (cervical, cuspal and groove of pit). To assess whether MMPs inactivate dental products, the teeth were immersed in 0.5 ml of chlorhexidine digluconate at 0.12%, sodium fluoride 0.05%, polyphenol epigallocatechin-3 gallate 400µM and distilled water (control group) for 1 hour. To evaluate effects in an acidic environment, MMPs have higher activity, the teeth were put in contact with 20µl of demineralizing solution with pH 4.8, for a minute, and then washed with 20µl of deionized water, one minute. In general we observed that the radiation active MMPs in DEJ and these effects were more evident in the permanent teeth than in the primary teeth. Regarding the expression of different MMPs, showed the greatest expression of MMP-9 and -20 for deciduous teeth, and permanent teeth MMPs-2, -9 and -20 showed similar expression. Given that the irradiation was able to activate MMPs expressed in the DEJ permanent teeth, and looking for solutions that inactivate them, we observed that the digluconate Chlorhexidine, the Sodium Fluoride and Polyphenol Epigallocatechin-3-gallate inhibited activity of MMPs in the DEJ in permanent teeth. Finally, to investigate the effect of an acid challenge, in the activity of MMPs, we observed that the demineralization did not increase the activity of MMPs in non-irradiated teeth but increased the activity of MMPs in irradiated teeth. Comparing irradiated whether subjected to demineralization teeth or not, it was found that demineralization increased activity of MMPs, induced by the radiation.

Keywords: Dentinoenamel junction; Dental enamel; Radiotherapy; Matrix metalloproteinase; Head and neck neoplasm; Tooth demineralization; Fluoride; Chlorhexidine; Polyphenol epigallocatechin-3gallate.

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	37
2. PROPOSIÇÃO.....	51
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.1. Aspectos Ético.....	57
3.2. Delineamento Experimental.....	57
3.3. Seleção dos dentes.....	57
3.4. Preparo dos dentes.....	59
3.5. Quantificação da expressão e atividade das MMPs.....	59
3.5.1 Zimografia <i>in situ</i>	59
3.5.2 Imunofluorescência (Free'floating).....	61
4. RESULTADOS.....	65
5. DISCUSSÃO.....	109
6. CONCLUSÕES.....	121
REFERÊNCIAS.....	125
ANEXOS.....	139

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas localizadas no trato aerodigestivo, ou seja, na cavidade bucal, faringe e laringe são denominadas de “câncer de cabeça e pescoço” (Dobrossy, 2005; Ferlay et al., 2010; Gaudet et al., 2015). Este é o sétimo tipo de câncer mais comum (Rettig e D’Souza, 2015) sendo o carcinoma de células escamosas, o tipo histológico mais frequente, presente em mais de 90% dos casos (Casiglia e Woo, 2001). Mais de 600.000 casos de câncer de cabeça e pescoço são diagnosticados ao redor do mundo a cada ano (McGuire et al., 2014a) e a prevalência de câncer na região de cabeça e pescoço é de 29,2 a cada 100.000 pessoas segundo o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US National Cancer Institute, 2013).

A incidência de câncer na região de cabeça e pescoço tende a ser maior conforme o aumento da idade do indivíduo, sendo os principais fatores de risco o hábito de fumar e o consumo de álcool (Llewelly et al., 2004). Entretanto, a incidência em pessoas jovens tem aumentado nas últimas décadas (Myers et al., 2000; Pitman et al., 2000; Iamarrom et al., 2004), podendo este aumento estar associado a infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) (Sivasithamparam et al., 2013).

Embora a ocorrência de câncer de cabeça e pescoço em crianças seja mais rara, podem ocorrer casos de tumores do sistema nervoso central, neuroblastoma, retinoblastoma, algumas neoplasias de células germinativas, tumores ósseos e sarcomas de partes moles, dentre outros (INCA, 2009). Ainda, de acordo com de Pearce et al. (2012) crianças submetidas a exames de tomografia computadorizada com dose cumulativa em torno de 60mGy tem o triplo de chance de desenvolver tumores cerebrais e como os exames desse tipo tem se tornado cada vez mais frequentes, provavelmente, esse tipo de tumor tende a aumentar no futuro (Albright et al., 2002).

O tratamento para indivíduos com câncer de cabeça e pescoço pode ser a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia ou a combinação destas formas de tratamento (Hong et al.,

2001; Lyons, 2006; INCA 2014). A radioterapia, uma modalidade de tratamento que utiliza a radiação ionizante como agente terapêutico (Novaes, 1998; Chaachouay et al., 2011), destrói os tecidos neoplásicos, interagindo com os tecidos do corpo, dando origem a elétrons que ionizam o meio e criam efeitos químicos, como a hidrólise da água e a ruptura das cadeias de Ácido Desoxirribonucleico (ADN ou DNA). Desses efeitos químicos pode resultar a incapacidade de divisão da célula até a sua morte por inativação. Para isso, utilizam-se elementos radioativos e radiações produzidas por equipamentos de raios-X e aceleradores de partículas (Novaes, 1998; Chaachouay et al., 2011; INCA, 2014).

Pacientes irradiados na região de cabeça e pescoço são suscetíveis a efeitos colaterais que incluem infecções fúngicas, mucosite, xerostomia, disfagia e disgeusia, alterações microvasculares, necrose de tecidos moles, atrofia dos músculos da região da mandíbula, trismo, osteorradionecrose, perda progressiva do ligamento periodontal, mudanças da microbiota bacteriana e lesões de cárie relacionadas a radiação (Beumer et al., 1996; Ramirez-Amador et al., 1997; Sulaiman et al., 2003; Vissink et al., 2003a; Kielbassa et al., 2006; Jham e da Silva Freire, 2006; Faria et. al., 2014).

A cárie dental relacionada à irradiação, ou "cárie de radiação", é uma doença complexa e destrutiva, de origem multifatorial (Vissink et al., 2003b; Kielbassa et al., 2006; Silva et al., 2009a; b) que prejudica a qualidade de vida (Silva et al., 2009a) sendo uma das principais complicação de pacientes com câncer de cabeça e pescoço (Al-Nawas et al., 2006). De acordo com Kielbassa et al. (2006), após radioterapia o risco para o desenvolvimento da cárie de radiação estará presente por toda a vida.

De acordo com diferentes estudos (Jansma et al., 1990; Kielbassa, 2000; Vissink et al., 2003a; Kielbassa et al., 2006; Silva et al., 2009a; b) os efeitos indiretos da irradiação, que incluem alterações na qualidade e na quantidade da saliva, dificuldade em realizar uma higiene bucal adequada em função do desenvolvimento de mucosite e da rigidez muscular, aumento do consumo de alimentos cariogênicos e alterações na microbiota bucal, sendo a

Cândida albicans o micro-organismo predominantemente associado a infecções sintomáticas (Stokman et al., 2003), são os principais agentes causais da cárie de radiação. Contudo, atualmente, existem evidências científicas que permitem observar que a radiação, por si só, tem a capacidade de alterar a estrutura dental ocasionando efeitos diretos (Jervoe, 1970; Soares et al., 2010; 2011), como diminuição (Jansma et al., 1988; Kielbassa et al., 1997; Walker et al., 2011) ou aumento da microdureza (De Siqueira Mellara et al., 2014; Gonçalves et al., 2014), aumento da solubilidade (Markitziu et al., 1986), perda da estrutura dos prismas de esmalte (Grötz et al., 1998), aumento na porcentagem de cálcio e redução do oxigênio no esmalte (De Siqueira Mellara et al., 2014), desorganização de esmalte e dentina (De Siqueira Mellara et al., 2014; Gonçalves et al., 2014) e presença de fendas e túbulos dentinários destruídos e/ou colabados (Gonçalves et al., 2014).

As lesões de cárie relacionadas à radiação diferem das lesões de cárie clássicas quanto à localização, aparência e progressão (Vissink et al., 2013b). As lesões clássicas ocorrem em fossas e fissuras e nas regiões interproximais, enquanto que as lesões relacionadas à radiação tendem a ocorrer na cervical (junção entre a coroa e a raiz), na região de cúspides e nas áreas incisais, os quais são locais que são expostos a maior carga oclusal (incisal/cúspide) e flexão (cervical) (Walker et al., 2011). Lesões pós radiação se desenvolvem como uma fratura de cisalhamento inicial de esmalte, resultando numa parcial delaminação do esmalte, seguido pela decomposição subsequente da dentina subjacente exposta (Jervoe, 1970; Jansma et al., 1993). Pioch et al. (1992) observaram, por meio de testes de resistência ao cisalhamento e por microscopia eletrônica de varredura, significativa redução da estabilidade da região da junção amelodentinária de incisivos bovinos após radiação (dose de 70 Gy) e Grötz et al. (1997) sugeriram que as alterações na junção amelodentinária de dentes submetidos à radiação ocorrem em virtude da atrofia dos processos odontoblásticos, seguida pela obliteração dos túbulos dentinários. Já, Walker et al. (2011) demonstraram o efeito direto da radiação na incidência de fratura dental unitária e

que as alterações na estrutura dental são diretamente proporcionais ao aumento das doses de radiação.

Os dentes são compostos por três tecidos mineralizados: cemento, dentina e esmalte. O cemento é encontrado ao longo da raiz e serve principalmente para manter o dente em posição por meio de fibras de colágeno (fibras de Sharpey) (Nanci, 2003). A dentina é uma matriz semelhante ao osso, que constitui a maior parte do dente, sendo caracterizada pela presença dos túbulos dentinários. A dentina tem uma qualidade elástica que proporciona flexibilidade e impede a fratura do esmalte que a recobre (Nanci, 2003). O esmalte recobre a coroa do dente, sendo o único tecido calcificado derivado de epitélio em vertebrados, o mesmo é a substância mais dura do corpo, porém tem uma elasticidade elevada (Cole e Eastoe, 1988).

O esmalte contém cerca de 96% de minerais e menos de 1% de matriz orgânica e seu desenvolvimento pode ser dividido em quatro fases. Durante a fase pré-secretória, os ameloblastos atravessam e removem a lâmina basal e começam a secretar proteínas da matriz de esmalte formando a junção amelodentinária (JAD). São três as proteínas estruturais e duas as proteinases. As proteínas estruturais são amelogenina (principal componente estrutural da matriz do esmalte), ameloblastina e enamelina. As proteinases são a metaloproteinase da matriz -20 (MMP-20 ou enamelisina) e a calicreína relacionada com a peptidase-4 (KLK4). Nesta fase, antes da formação de minerais, também acontece a deposição de pré-dentina por odontoblastos (Slavkin, 1979). Isso ocorre primeiramente nas pontas de cúspides e progride para as regiões cervicais. A pré-dentina é composta principalmente de colágeno, mas também contém proteínas não colágenas. A pré-dentina é o primeiro tecido que se mineraliza (Mjor e Ole, 1986) começando pelo que vai se tornar a JAD, tornado se mais grossa ao longe da JAD até chegar no que num futuro será a câmara pulpar. No entanto, quase imediatamente após o início do processo da mineralização perto da JAD, os pré-ameloblastos se transformam em ameloblastos que entram numa fase de

secreção, alongando-se para formar células cilíndricas altas chamadas processos de Tomes. Em seguida, os ameloblastos começam a secretar proteínas na matriz do esmalte que iniciam rapidamente a mineralização e a formação da JAD (Nanci, 2003). Os primeiros cristais de esmalte formados, crescem entre os cristais de dentina, como se fosse uma mineralização em torno de proteínas de colágeno (Rönholm, 1962). Uma vez que o esmalte atinge a espessura total, os ameloblastos sofrem uma transição e passam a reabsorver o componente orgânico, iniciando a fase da maturação. Ao final desta fase o esmalte atingirá sua dureza final. Embora a matriz extracelular biológica do esmalte seja em grande parte removida depois da maturação, uma pequena quantidade de proteína permanece na região interna do tecido pós-erupção (Dusevich et al., 2012); ainda estruturas histológicas distintas conhecidas como “tufts” de esmalte também se estendem verticalmente a partir da JAD (Weatherel et al., 1968). Acredita-se que estas fissuras hipomineralizadas, sejam fonte primária das fraturas que se desenvolvem no esmalte durante sobrecargas oclusais (Chai et al., 2009; Myoung et al., 2009).

Em comparação com a matriz orgânica do esmalte, a matriz dentinária é uma rede complexa de estruturas fibrilares e globulares constituindo o andaime orgânico da dentina (Marshall et al., 1997). O colágeno do tipo I é o principal componente da matriz dentinária, enquanto proteoglicanos e outras proteínas não-colagênicas completam a sua porção orgânica (Linde e Goldberg, 1993; Butler, 1995; Embery et al., 2001; Goldberg e Smith, 2004). Durante a dentinogênese, estas proteínas são sintetizadas e secretadas por odontoblastos e após a organização estrutural da camada de pré-dentina, a mineralização ocorre por formação de cristais de hidroxiapatita (Butler, 1995).

Esmalte e dentina estão firmemente unidos por meio da JAD (Nanci, 2003). A remoção da membrana basal em dentes é única entre os outros tecidos e parece coincidir com a deposição da matriz e/ou mineral ao longo do desenvolvimento da JAD. McGuire et al. (2014d) especulam que a mineralização e o desenvolvimento da JAD poderia ocorrer pelas

proteínas macromoleculares residuais incorporadas na membrana basal, por exemplo, colágeno tipo IV e tipo VII. Evidência científica suporta que o colágeno tipo IV apresenta um papel funcional para o desenvolvimento da JAD (Nagai et al., 2001), e o colágeno tipo VII para amelogênese (Umemoto et al., 2012). A degradação da membrana basal e proteínas da matriz de esmalte por metaloproteinases da matriz-2, -9 (gelatinases do tipo IV), e pelas proteases -20 (MMP-20) e KLK4, antes e durante a fase de maturação, foi demonstrada (Simmer e Hu, 2001).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) fazem parte de uma importante família de endopeptidases metalo-dependentes, consideradas as principais enzimas responsáveis pela remodelação dos componentes da matriz extracelular, que incluem diferentes tipos de colágeno nativo e desnaturado, fibronectina, laminina e elastina. As MMPs são secretadas na forma de proenzimas inativas, denominadas zimógenos e são ativadas no tecido pela segmentação dos propeptídeos. Todas as MMPs contêm Zn^{++} no sítio catalítico e requerem a presença de Ca^{++} para sua estabilidade e atividade (Birkedal-Hansen, et al., 1993; Krane, 1994; Krane e Inada, 2008). Estas proteinases são expressas, em resposta a estímulos específicos, pelas células residentes do tecido conjuntivo, bem como por células inflamatórias recrutadas durante os processos de remodelação tecidual ou eventos inflamatórios (Birkedal-Hansen, 1993; Krane, 1994; Paula-Silva et al., 2009a, 2010).

Existem pelo menos 24 tipos distintos de MMPs, dos quais 23 são encontrados em humanos e, com base na especificidade com o substrato, podem ser divididas em 6 subgrupos: collagenases, estromelisinases, matrilisina, metaloelastase, MMPs do tipo de membrana e gelatinases ou collagenases do tipo IV. Sendo que as principais gelatinases ou collagenases do tipo IV identificadas nos odontoblastos, nos compartimentos de pré-dentina/dentina e no esmalte são a collagenase MMP-8, as gelatinases MMP-2 e MMP-9 (conhecidas também como gelatinases A e B, respectivamente), estromelisina-1 (MMP-3 ou

proteoglicanase), MMP-2 MMP-ativadores 14 (MT1-MMP), MMP-13 e enamelisina (MMP-20) (Visse et al., 2003; Nuttall et al., 2004; Hannas et al., 2007).

Dentinogênese e mineralização são fenômenos de desenvolvimento complexos que requerem controle enzimático ativo. Algumas proteases, principalmente pertencentes à família das MMPs, desempenham papéis cruciais durante estas fases (Tjäderhane et al., 2001). As MMPs estão envolvidas no desenvolvimento do esmalte e nas fluoroses (Caterina et al., 2002; Bartlett et al., 2004) e também estão associadas com a remodelação da matriz orgânica da dentina (Hall et al., 1999; Sulkala et al., 2002). Foi demonstrado que as MMPs têm um papel crucial na degradação do colágeno dentinário em lesões de cárie (Tjäderhane et al., 1998; Sulkala et al., 2001) e desempenham um papel importante na progressão da erosão dental (Buzalaf et al., 2014). Têm sido ainda identificadas na inflamação pulpar e periapical (Gusman et al., 2002; Wahlgren et al., 2002), bem como correlacionadas com doenças periodontais (Mäkelä et al., 1994; Ejeil et al., 2003; Birkedal-Hansen et al., 2006). As MMPs são componentes essenciais no crescimento e invasão de tumores orais (Sorsa et al., 2004) e finalmente, podem ser importantes na perda de adesão das restaurações (Pashley et al., 2004; Tay e Pashley, 2004).

A MMP-20 (enamelisina) é conhecida por ser quase exclusivamente expressa por células formadoras de dente, apresentam propriedades estruturais e enzimáticas únicas, sendo capaz de degradar amelogenina, exercendo um papel importante durante o desenvolvimento do esmalte (Caterina et al., 2002; Bartlett et al., 2004). A MMP-20 é produzida durante a dentinogênese primária e incorporada na dentina, podendo ser liberada durante a progressão da cárie (Sulkala et al., 2002).

Por outro lado, as gelatinases (MMPs-2 e -9) tem a capacidade de degradar o colágeno, e são de particular interesse devido aos seus importantes papéis na formação do dente e mineralização (Sahlberg et al., 1999; Bourd-Boittin et al., 2005), bem como no processo de progressão da lesão de cárie (Tjäderhane et al., 1998; Chaussain-Miller et al.,

2006) e degradação da camada híbrida (Pashley et al., 2004; Stanislawczuk et al., 2011). Boushell et al. (2008) verificaram que na dentina humana, a MMP-2 foi identificada em toda a sua profundidade, mas estava altamente concentrada na área subjacente à pré-dentina e na junção amelodentinária.

Mazzoni et al. (2007) identificaram a presença de MMP-9 nos túbulos dentinários e na dentina intertubular. Já Chibinski et al. (2014) compararam a expressão das metaloproteinases da matriz (MMPs-2, -8 e -9), colágeno tipo I e sialoproteína óssea (BSP) em dentina infectada de dentes decíduos e verificaram que a expressão da MMP-9 foi considerada moderada, entretanto mais elevada do que a de MMP-2, apesar de alguns estudos reportarem que a MMP-2 é a principal gelatinase em dentina (Niu et al., 2011).

A importância da JAD para a estabilidade mecânica dos dentes tem sido demonstrada (Marshall et al., 2003). A JAD associada com o esmalte interno são conhecidos por inibir a propagação de fissuras, exibindo uma maior tenacidade à fratura (Imbeni et al., 2005) e raramente é acometida por falhas mecânicas, mesmo decorrente da intensa carga mastigatória e hábitos parafuncionais, por longos períodos (Paine et al., 2001). No entanto, pacientes com câncer bucal submetidos à radioterapia apresentaram lesões dentárias pós-radiação que se iniciam com a fratura de esmalte de cisalhamento, que resultam em delaminação total desse substrato, sugerindo instabilidade da JAD (Jongebloed et al., 1988; Pioch et al., 1992; Jansma et al., 1993). A delaminação total de esmalte, destacando-se da dentina, é um padrão único de destruição dental associado à radioterapia (McGuire et al., 2014a).

Recentemente, tem sido demonstrado a atividade de uma protease específica de tecidos dentais importante durante a amelogênese, a MMP-20, nas regiões externas da dentina coronária e na JAD (McGuire et al., 2014a).

Uma vez que a radiação pode causar alterações líticas em polipeptídios de colágeno, é possível que esta possa estimular a transcrição e ativação de MMPs nos dentes expostos

(Strup-Perrot et al., 2006), o que poderia resultar na degradação de componentes orgânicos da matriz de esmalte e da JAD desestabilizando-a, e assim levando-a a delaminação. Com isso em mente, pesquisadores realizaram uma série de recentes estudos *in situ* com inibidores de proteases, como o *chá verde ou polifenol epigallocatequina 3-galato (EGCG;* Demeule et al, 2000; Kato et al. 2010a; Kato et al. 2012; Buzalaf et al. 2014), a clorexidina (CHX; Gendron et al., 1999; Kato et al., 2010; Scaffa et al., 2012; Kato et al. 2012), o sulfato ferroso (Kato et al., 2010b) e o fluoreto de sódio em diferentes concentrações (Kato et al., 2014) na tentativa de prevenir a perda de dentina causada pela erosão.

Em 1986, Markitziu et al. avaliaram, *in vitro*, os efeitos da radiação com Co-60 na solubilidade e dureza do esmalte e dentina de dentes permanentes humanos pré tratados ou não com flúor. A exposição à radiação não afetou a solubilidade do esmalte dos dentes pré-tratados ou não tratados com flúor. Entretanto, a solubilidade da dentina dos dentes não tratados com flúor diminuiu. Com relação à microdureza, não foram observadas alterações nos espécimes de esmalte irradiados, com ou sem pré-tratamento com flúor. No entanto, a radiação diminuiu a dureza da dentina, quando não ocorreu o pré-tratamento com flúor.

Kielbassa et al. (1997) realizaram um estudo, *in vitro*, com o objetivo de avaliar os efeitos da radiação com doses de 60 Gy (2 Gy/dia, 5 dias/semana) na microdureza da dentina de dentes bovinos, em presença ou ausência de flúor. Os autores concluíram que a dentina foi severamente afetada pela radiação e que a fluoretação com géis ácidos diminuiu a microdureza da superfície dentinária e não preveniu seu amolecimento. Segundo os autores esta poderia ser uma explicação para a formação de "gaps" na JAD, perda de esmalte dental e lesões de cárie cervicais, que acometem indivíduos submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço.

Kato et al. (2012) avaliaram a redução da degradação da matriz orgânica pelo pré-tratamento com inibidores de proteases e a eficácia contra a perda de matriz de dentina. Verificaram que os géis contendo inibidores de proteases apresentaram desempenho

superior quando comparado com os que contém flúor. A concentração de hidroxiprolina em solução e a perda de dentina observada no grupo tratado com fluoreto foi significativamente maior do que a observada nos grupos tratados com os géis contendo inibidores de proteases, mas significativamente menor do que as observadas para o placebo e os grupos não tratados. O efeito do fluoreto na prevenção da erosão tem sido sugerido principalmente devido à redução da desmineralização pela proteção mecânica de precipitados como CaF_2 , e na sua capacidade de remineralização, que é dependente da manutenção da matriz orgânica (Ganss et al., 2010a). Isto sugere que os produtos que combinam flúor e inibidores de proteases podem ter um grande potencial para prevenir a erosão dentinaria.

Kato et al. (2014) recentemente avaliaram a capacidade do flúor em inibir gelatinases (MMP-2 e -9) humanas purificadas da saliva. Os autores verificaram que o flúor diminuiu a atividade de formas pró ativas e ativas de MMPs. Gelatinases purificadas foram completamente inibidas por 200 ppm de flúor, e MMP-9 salivar foi inibida por 275 ppm de F. A inibição foi parcialmente reversível em 250-1,500 ppm de flúor, mas era irreversível a 5000 ppm de flúor. Este foi o primeiro estudo a descrever a capacidade do fluoreto de sódio em inibir completamente as MMPs.

Questiona-se então se as alterações dentais denominadas de “cárie de radiação” observadas em pacientes pós-radioterapia de cabeça e pescoço poderiam ser causadas em parte pela ativação das MMPs que se encontram na JAD, e se substâncias capazes de promover a inativação das MMPs, seriam capazes de inativá-las também em dentes submetidos a radioterapia. Questiona-se ainda se frente a um desafio ácido ocorreria uma ativação ainda maior das MMPs, tanto em dentes hígidos, como em dentes pós-irradiação, acelerando ainda mais o processo de formação da “cárie de radiação”.

Na literatura, apenas um estudo avaliou, em dentes pós radioterapia, a atividade da MMP-20 (McGuire et al., 2014a) e outro verificou a redução do colágeno tipo IV (McGuire et al., 2014c), estes dois estudos foram realizados em dentes permanentes e nenhum foi

realizado em dentes decíduos. Com relação a inativação das MMPs, por meio do uso de inibidores de proteases, clorexidina (CHX), o fluoreto de sódio (NaF) e o polifenol epigallocatequina 3-galato (EGCG) nenhum estudo foi encontrado na literatura, assim como nenhum estudo avaliou se frente a um desafio ácido as MMPs apresentariam-se mais ativas em dentes pós-radioterapia, em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Assim justificamos a necessidade de realizar a presente investigação.

2. Proposição

2. PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

- Investigar a atividade e expressão das metaloproteinases da matriz em dentes decíduos e permanentes, antes e após radioterapia.
- Investigar se inibidores de proteases (fluoreto de sódio a 0,05%, o digluconato de clorexidina a 0,12%, e o polifenol epigallocatequina 3-galato - 400µM) poderiam inativar as MMPs em dentes decíduos e permanentes após radioterapia.
- Avaliar o efeito de um desafio ácido na ativação de MMPs em dentes decíduos e permanentes, antes e após radioterapia.

3. Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

Inicialmente, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CAAE nº: 43861415.0.0000.5419), tendo sido aprovado (Anexo).

3.2 Delineamento Experimental

O presente estudo apresentou três avaliações: a ativação e expressão das MMPs, a implementação de inibidores de proteases como método de inibição das MMPs e a ativação das MMPs devido a um desafio ácido. Para as medições foi realizado um estudo em esmalte e dentina contíguos a JAD e a própria JAD em três regiões (cervical, cúspide e fundo do sulco) (Figura 1), de dentes decíduos e permanentes de humanos, comparando dentes irradiados com não irradiados. As unidades experimentais foram 178 fragmentos dentais, divididos aleatoriamente em 2 grupos (decíduos e permanentes) / 4 subgrupos experimentais (irradiados e não irradiados).

3.3 Seleção dos Dentes

A amostra foi constituída de 178 fragmentos de molares permanentes e decíduos de humanos, superiores e inferiores, irradiados ou não irradiados, obtidos de dois estudos anteriores do Programa de Odontopediatria (De Siqueira Mellara et al., 2014; Gonçalves et al., 2014), junto ao Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, armazenados em água destilada, à temperatura de 4º C.

Os dentes, no estudo prévio, foram inicialmente seccionados 1 mm abaixo da junção amelocementária, com disco diamantado adaptado em máquina de corte (Miniton, Struers A/S, Copenhagen, Dinamarca), sob refrigeração, para remoção do remanescente

radicular. Em seguida foram seccionados no sentido méseo/distal, obtendo-se duas metades, sendo uma correspondente à hemisseção vestibular e outra à hemisseção lingual ou palatina.

Os espécimes, no estudo prévio, foram irradiados em placas de acrílico para cultura de células de 24 poços (Cellstar®, ref. 657160, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Germany), possibilitando que todas recebessem a mesma irradiação direta por unidade de área. Com o intuito de manter as hemisseções dentais em um ambiente úmido, simulando as características da cavidade bucal, durante a irradiação, cada poço foi preenchido com 10 mL de saliva artificial, pH = 7,0 (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil), recobrindo totalmente as hemisseções.

A seguir as hemisseções dentais foram expostas à radiação com Co-60 em aparelho de telecolterapia (Siemens modelo Gammatron 580, Munich, Germany), no Serviço de Radioterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, com distância da fonte de 80 cm, com dose de 1 Gy/min. As hemisseções dentais foram irradiadas com fração de dose de 2 Gy, 5 dias consecutivos, até atingirem a dose total de 60 Gy, com um total de 30 ciclos, durante 6 semanas (Kielbassa et al., 2000; Açil et al., 2007; Bulucu et al., 2009; Aggarwal, 2009; Soares et al., 2010, Soares et al., 2011, De Siqueira Mellara, 2014; Gonçalves, 2014) (Tabela 1).

Entre os ciclos de irradiação os espécimes foram mantidos em saliva artificial, renovada diariamente, em estufa a 37 °C (Olidef, Indústria e Comércio de Aparelhos Hospitalares Ltda., Ribeirão Preto, Brasil).

Tabela 1 - Número de ciclos de irradiação, períodos de tempo e doses totais empregadas.

Número de ciclos de irradiação	Período de tempo (dias)	Dose total (2 Gy por ciclo)
5	5	10 Gy
10	10	20 Gy
15	15	30 Gy
20	20	40 Gy
25	25	50 Gy
30	30	60 Gy

3.4 Preparo dos Dentes

Cada coroa dental foi então seccionada no sentido méso/distal e vestibulo-lingual, em fatias de 0,6 mm, obtendo-se duas secções, num total de 178 fragmentos (Figuras 2, 3, 4 e 5) com auxílio de máquina de corte (Isomet 1000 Buehler Ltda, Lake Bluff, Illinois, EUA).

3.5 Quantificação da expressão e atividade das MMPs

Com o objetivo de determinar a possível expressão e atividade das MMPs, foram realizados os ensaios de Imunofluorescência e Zimografia *in situ*, nos fragmentos dentais de 0,6mm, analisando esmalte e dentina contíguos a JAD e a própria JAD em três regiões (cervical, cúspide e fundo do sulco) (Figura 1).

3.5.1 Zimografia *in situ*

As MMPs são sintetizadas e secretadas na forma latente e precisam ser clivadas para se tornarem ativas e exercer sua função. A avaliação da presença e a localização das formas ativas das MMPs foi realizada por meio da zimografia *in situ* em esmalte e dentina contíguos a JAD e a própria JAD em três regiões (cervical, cúspide e fundo do sulco).

No procedimento da zimografia *in situ*, um substrato específico para determinada protease é depositado sobre um tecido e durante o período de incubação o substrato será degradado de modo tempo e dose dependente, por enzimas em sua localização nativa. Após

a lise do substrato marcado por radioisótopos ou fluoróforos, os produtos da degradação podem ser detectados por radiografias ou microscopia de fluorescência, respectivamente. A natureza do substrato determina a protease a ser identificada (Yan e Blomme, 2003; Frederiks e Mook, 2004; Lombard et al., 2005; Snoek-van Beurden e Von den Hoff, 2005).

Com o objetivo de avaliar se produtos odontológicos inativam MMPs, os dentes foram imersos em 0,5mL de digluconato de clorexidina a 0,12%, ou fluoreto de sódio a 0,05%, *polifenol epigallocatequina 3-galato* a 400µM, e água destilada (grupo controle), por 1 hora, a temperatura ambiente.

Com o objetivo de avaliar se sob um desafio ácido a atividade das MMPs seria intensificada, os dentes foram postos em contato com 20µl de solução desmineralizante de Marquezan (ácido acético - 2,86mL; CaCl₂ - 0,3235g; NaH₂PO₄ - 0,343g; NaOH - pH ajustável; água destilada e deionizada q.s.p. 1000mL) (Marquezan et al., 2009), pH de 4,8%, por um minuto a temperatura ambiente e, posteriormente, lavados com 20µl de água deionizada, por um minuto a temperatura ambiente.

As secções com 0,6 mm de espessura foram imersas em borohidreto de sódio (1mg/mL; Sigma) por 15 minutos (3x), lavadas em PBS e incubadas com um substrato gelatinoso ligado ao isotiacianato de fluoresceína (DQTM Gelatin, Molecular Probes, Eugene, EUA) dissolvido em salina fosfatada tamponada (PBS), na concentração de 1mg/mL, por 3 horas, a 37°C, em uma câmara escura umidificada. Lâminas controle foram pré-incubadas em ácido etilenodiaminotetracético a 20 mM (EDTA, Sigma) por 2 horas e o EDTA foi adicionado ao meio de incubação.

A atividade gelatinolítica foi avaliada no esmalte e dentina contíguos a JAD e a própria JAD em três regiões (cervical, cúspide e fundo do sulco), na mesma profundidade e área. Primeiramente, as regiões foram fotografadas em microscopia de fluorescência em aumento de 1.25x e 5x, utilizando o filtro Alexa Fluor 43HE (FT570, BP550/25, BP605/70, Carl Zeiss, Alemanha). Posteriormente, as imagens foram analisadas por meio de

densitometria óptica utilizando o programa Image J. (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). Para quantificação da atividade gelatinolítica nos cortes, inicialmente foi estabelecida uma área na qual foram quantificados os *spots* de fluorescência, em áreas representativas, no aumento de 1,25x, e expressas como unidades arbitrárias de fluorescência por mm². Os dados foram submetidos a análise de normalidade por meio do teste D'Agostino-Person. Uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal, os grupos foram comparados entre si, por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós teste de Dunn ($\alpha = 0,05$). Para comparação entre amostras pareadas foi utilizado o teste de Wilcoxon ($\alpha = 0,05$).

Todas as análises descritas neste trabalho, incluindo os gráficos apresentados, foram realizadas através do software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

3.5.2 Imunofluorescência (*Free'floating*)

As MMPs são consideradas as principais enzimas responsáveis pela remodelação dos componentes da matriz extracelular nos dentes, e são expressas em resposta a estímulos específicos. A avaliação da presença e da localização das metaloproteinases da matriz foi realizada por meio da imunofluorescência em esmalte e dentina contíguos a JAD e a própria JAD em três regiões (cervical, cúspide e fundo do sulco).

Com o objetivo de avaliar se as MMPs foram expressas, as secções de dentes foram imersos em solução salina fosfatada tamponada (PBS) por 30 minutos. A seguir foram imersos em solução de borohidreto de sódio (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema, SP, Brasil) a 1 mg/mL por 15 minutos (3×). Os sítios de ligação não-específica foram bloqueados com albumina de soro bovino (Sigma) a 1% por 45 minutos. A imunomarcagem foi realizada utilizando anticorpo primário para MMP-2 (sc-8835, anticorpo policlonal produzido em cabras, Santa Cruz, Biotechnology Inc., Dallas, Texas, EUA), MMP-9

(sc-6840, anticorpo policlonal produzido em cabras, Santa Cruz, Biotechnology Inc.) e MMP-20 (sc-26926, anticorpo policlonal produzido em cabras, Santa Cruz, Biotechnology Inc.) à 4°C na geladeira, *overnight*. Em seguida, o fragmento foi lavado em PBS por 30 minutos e incubado com anticorpo secundário anti-cabra conjugado ao fluoróforo Texas Red® (sc-2783, produzido em macacos, Santa Cruz, Biotechnology Inc.), por 30 minutos, em câmara escura. Os fragmentos foram lavados em PBS novamente. Lâminas-controle foram utilizadas para testar a especificidade da imunomarcação, nas quais o anticorpo primário foi omitido e os fragmentos incubados com PBS.

A porcentagem de fluorescência foi avaliada em esmalte e dentina contíguos a JAD e a própria JAD em três regiões (cervical, cúspide e fundo do sulco). Primeiramente, as regiões foram fotografadas em microscopia de fluorescência em aumento de 1,25x e 5x, utilizando o filtro Texas Red® 64HE (FT605, BP647/70, BP587/25, Carl Zeiss, Alemanha). Posteriormente, as imagens foram analisadas subjetivamente por dois avaliadores calibrados, sem o conhecimento do grupo ao que pertencia cada espécime. Os resultados foram expressos por meio de análise descritiva.

Figura 1. Imagem das regiões avaliadas no estudo. (A) cervical, (B) cúspide e (C) fundo do sulco; em esmalte e dentina contíguos a JAD e a própria JAD. E, esmalte; D, dentina; JAD, junção amelodentinária.

Figura 2. Fluxograma demonstrativo da distribuição dos dentes utilizados no experimento, para avaliar o efeito da radiação na atividade das MMPs.

Figura 3. Fluxograma demonstrativo da distribuição dos dentes utilizados no experimento, para avaliar a expressão e localização de MMPs.

Figura 4. Fluxograma demonstrativo da distribuição dos dentes utilizados no experimento, para avaliar o efeito de soluções de NaF 0,05%, Diglucuronato de Clorexidina 0,12% e Polifenol Epigallocatequina 3-galato 400 µM na atividade das MMPs.

Figura 5. Fluxograma demonstrativo da distribuição dos dentes utilizados no experimento, para avaliar o efeito da desmineralização na atividade das MMPs.

4. Resultados

4. RESULTADOS

A radiação ativa MMPs na JAD

De maneira geral pudemos observar que a radiação ativa as MMPs na JAD e estes efeitos foram mais evidentes nos dentes permanentes, quando comparados com os decíduos.

Especificamente com relação aos dentes decíduos, a intensidade de fluorescência/mm² não apresentou diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo dos dentes não irradiados, quando analisadas as regiões do fundo do sulco e cúspide. Porém houve diferença estatisticamente significativa com relação aos dentes não irradiados ($p < 0,05$) na região de cervical, apresentando maior intensidade de fluorescência/mm² nos dentes irradiados (Figuras 6 e 7).

Figura 6. Comparação da atividade gelatinolítica das MMPs em dentes decíduos irradiados e dentes controles não irradiados, realizada por meio da zimografia *in situ*. A intensidade de fluorescência/mm² na região cervical, na cúspide e no fundo do sulco foi mensurada na mesma profundidade e área. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$; $n=6$ dentes irradiados e $n=6$ dentes não irradiados pareados).

Figura 7. Microscopia de fluorescência revela atividade gelatinolítica na junção amelodentinária, em dente decíduo humano. **(A)** Coroa seccionada irradiada (1,25x) mostrando a atividade das MMPs nas regiões de esmalte (E), dentina (D) e na junção amelodentinária (JAD). **(B)** Região cervical, **(C)** Cúspide e **(D)** Região de fundo do sulco em maior aumento (5x). Reatividade baixa é evidente na matriz do esmalte e túbulos dentinários adjacentes a JAD. **(E)** Imagem de coroa seccionada não irradiada (1,25x) mostrando menor atividade das MMPs nas regiões de esmalte (E), dentina (D) e junção amelodentinária (JAD). **(F)** Região cervical, **(G)** Cúspide e **(H)** Região de fundo do sulco em maior aumento (5x). Barra = 2mm **(A)** e **(E)**; 0,5mm **(B, C, D, F, G e H)**.

Com relação aos dentes permanentes, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo irradiado e ao grupo dos dentes não irradiados com relação à intensidade de fluorescência/mm². A ativação das MMPs pela radiação aconteceu nas três regiões estudadas, cervical, cúspide e fundo do sulco (Figuras 8 e 9).

A marcação observada não foi devido à autofluorescência do tecido (Figura 10 A-D) e a incubação com gelatina mais EDTA inibiu a atividade de MMPs (Figura 10 E-H) demonstrando que a enzima responsável pela degradação da gelatina era do grupo das MMPs.

Figura 8. Comparação da atividade gelatinolítica das MMPs em dentes permanentes irradiados e dentes controles não irradiados, realizada por meio da zimografia *in situ*. A intensidade de fluorescência/mm² na região cervical, na cúspide e no fundo do sulco foi mensurada na mesma profundidade e área. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$; $n=6$ dentes irradiados e $n=6$ dentes não irradiados pareados).

Figura 9. Microscopia de fluorescência revela atividade gelatinolítica na junção amelodentinária, em dente permanente humano. **(A)** Coroa seccionada irradiada (1,25x) mostrando a atividade das MMPs nas regiões de esmalte (E), dentina (D) e na junção amelodentinária (JAD). **(B)** Região cervical, **(C)** Cúspide e **(D)** Região de fundo do sulco em maior aumento (5x). Reatividade baixa é evidente na matriz do esmalte e túbulos dentinários adjacentes a JAD. **(E)** Imagem de coroa seccionada não irradiada (1,25x) mostrando menor atividade das MMPs nas regiões de esmalte (E), dentina (D) e junção amelodentinária (JAD). **(F)** Região cervical, **(G)** Cúspide e **(H)** Região de fundo do sulco em maior aumento (5x). Barra = 2mm **(A)** e **(E)**; 0,5mm **(B, C, D, F, G e H)**.

Figura 10. Microscopia de fluorescência que não revela atividade gelatinolítica na junção amelodentinária, em dente permanente humano. (A) Coroa seccionada irradiada (1,25x) mostrando sua autofluorescência nas regiões de esmalte (E), dentina (D) e fortemente marcadas na junção amelodentinária (JAD). (B) Região cervical, (C) Cúspide e (D) Região de fundo do sulco em maior aumento (5x). (E) Imagem de coroa seccionada irradiada incubada com gelatina mais EDTA (1,25x) mostrando reatividade baixa nas regiões de esmalte (E), dentina (D) e junção amelodentinária (JAD). (F) Região cervical, (G) Cúspide e (H) Região de fundo do sulco em maior aumento (5x). Barra = 2mm (A) e (E); 0,5mm (B, C, D, F, G e H).

MMPs -2, -9 e -20 são expressas na JAD em dentes decíduos e permanentes

Com objetivo de investigar possíveis MMPs presentes na JAD, dentes irradiados e não irradiados foram utilizados para avaliar a expressão e localização de MMPs gelatinolíticas (MMP-2 e MMP-9) e de uma MMP específica de tecidos dentais e importante durante a amelogênese (MMP-20).

Nos dentes decíduos, a expressão da MMP-2 foi difusa pela dentina coronária, e presente nas regiões de cúspide, sulco e cervical, sem diferenças entre dentes irradiados e não irradiados (Figura 11).

Figura 11. Microscopia de fluorescência revela expressão da MMP-2 localizada nas regiões de esmalte (E), dentina (D) e junção amelodentinária (JAD), em dente decíduo humano não irradiado submetido a imunofluorescência. (A) Coroa seccionada num aumento de 1,25x. (B) Região cervical, (C) Cúspide e (D) Região de fundo do sulco em maior aumento (5x). Reatividade baixa é evidente na matriz do esmalte e túbulos dentinários adjacentes a JAD. Barra = 2mm (A); 0,5mm (B, C e D).

A expressão de MMP-9 nos dentes decíduos foi mais intensa do que a expressão de MMP-2, na dentina coronária e na JAD, nas três regiões analisadas. Não houve diferença entre dentes irradiados e não irradiados (Figura 12).

Figura 12. Microscopia de fluorescência revela expressão da MMP-9 localizada nas regiões de esmalte (E), dentina (D) e fortemente marcadas na junção amelodentinária (JAD), em dente decíduo humano não irradiado submetido a imunofluorescência. **(A)** Coroa seccionada num aumento de 1,25x. **(B)** Região cervical, **(C)** Cúspide e **(D)** Região de fundo do sulco em maior aumento (5x). Reatividade baixa é evidente na matriz do esmalte e túbulos dentinários adjacentes a JAD. Barra = 2mm **(A)**; 0,5mm **(B, C e D)**.

Com relação à MMP-20 em dentes decíduos, a marcação foi positiva, porém difusa na dentina coronária, com maior expressão na JAD na regiões cervical, sulco e cúspide. Não houve diferença entre dentes irradiados e não irradiados (Figura 13).

Figura 13. Microscopia de fluorescência revela expressão da MMP-20 localizada nas regiões de esmalte (E), dentina (D) e fortemente marcadas na junção amelodentinária (JAD), em dente decíduo humano não irradiado submetido a imunofluorescência. **(A)** Coroa seccionada num aumento de 1,25x. **(B)** Região cervical, **(C)** Cúspide e **(D)** Região de fundo do sulco em maior aumento (5x). Reatividade baixa é evidente na matriz do esmalte e túbulos dentinários adjacentes a JAD. Barra = 2mm **(A)**; 0,5mm **(B, C e D)**.

Com relação aos dentes permanentes, MMP-2 foi expressa na dentina coronária e na região de esmalte. A fluorescência estava bem delimitada na JAD, nas região de cervical, cúspide e fundo do sulco. (Figura 13).

Figura 14. Microscopia de fluorescência revela expressão da MMP-2 localizada nas regiões de esmalte (E), dentina (D) e fortemente marcadas na junção amelodentinária (JAD), em dente irradiado permanente humano submetido a imunofluorescência. **(A)** Coroa seccionada num aumento de 1,25x. **(B)** Região cervical, **(C)** Cúspide e **(D)** Região de fundo do sulco em maior aumento (5x). Reatividade baixa é evidente na matriz do esmalte e túbulos dentinários adjacentes a JAD. Barra = 2mm **(A)**; 0,5mm **(B, C e D)**.

MMP-9 também foi marcada na dentina coronária e na região do esmalte, similarmente à MMP-2. Esta marcação estava bem delimitada na JAD, na cervical, cúspide e fundo do sulco. Em alguns casos foi observado a presença de linhas de deposição de MMP-9 na dentina (Figura 15).

Figura 15. Microscopia de fluorescência revela expressão da MMP-9 localizada nas regiões de esmalte (E), dentina (D) e fortemente marcadas na junção amelodentinária (JAD), em dente permanente humano não irradiado submetido a imunofluorescência. (A) Coroa seccionada num aumento de 1,25x. (B) Região cervical, (C) Cúspide e (D) Região de fundo do sulco em maior aumento (5x). Reatividade baixa é evidente na matriz do esmalte e túbulos dentinários adjacentes a JAD. Barra = 2mm (A); 0,5mm (B, C e D).

A expressão de MMP-20 foi semelhante a da MMP-9, inclusive nas linhas de deposição observadas na dentina. (Figura 16).

Figura 16. Microscopia de fluorescência revela expressão da MMP-20 localizada nas regiões de esmalte (E), dentina (D) e fortemente marcadas na junção amelodentinária (JAD), em dente permanente humano não irradiado submetido a imunofluorescência. **(A)** Coroa seccionada num aumento de 1,25x. **(B)** Região cervical, **(C)** Cúspide e **(D)** Região de fundo do sulco em maior aumento (5x). Reatividade baixa é evidente na matriz do esmalte e túbulos dentinários adjacentes a JAD. Barra = 2mm **(A)**; 0,5mm **(B, C e D)**.

Digluconato de Clorexidina, Fluoreto de Sódio e Polifenol Epigallocatequina 3-galato inibem a atividade de MMPs na JAD em dentes permanentes

Tendo em vista que a irradiação foi capaz de ativar as MMPs expressas na JAD, outro objetivo deste estudo foi testar o efeito de diferentes soluções de uso odontológico (Digluconato de Clorexidina 0,12% e Fluoreto de Sódio a 0,05%) ou uma solução experimental (Polifenol Epigallocatequina 3-galato 400 μ M) para investigar se era possível inativar as MMPs.

Observamos que as três soluções utilizadas não alteraram a intensidade de fluorescência/mm² nas regiões cervical, cúspide e fundo do sulco nos dentes decíduos irradiados, quando comparados ao grupo controle no qual os dentes foram imersos em água destilada (Figura 17, 18 e 19). Estes resultados mostram que nenhuma das soluções foi, portanto, capaz de inativar as MMPs nos dentes decíduos.

Figura 17. Comparação da atividade gelatinolítica das MMPs em dentes decíduos irradiados, realizada por meio da zimografia *in situ*. A intensidade de fluorescência/mm² na região cervical, na cúspide e no fundo do sulco foi mensurada na mesma profundidade e área, após o tratamento com solução de Digluconato de Clorexidina a 0,12% (CHX 0,12%), Fluoreto de Sódio a 0,05% (NaF 0,05%), Polifenol Epigallocatequina 3-galato 400µM (EGCG 400µM) ou água destilada (controle) (n=24 dentes irradiados).

Figura 18. Microscopia de fluorescência revela atividade gelatinolítica nas regiões de esmalte (E), dentina (D) e junção amelodentinária (JAD), em dentes decíduos humanos irradiados. **(A)** Coroa seccionada (1,25x) mostrando a atividade das MMPs, **(B)** Coroa seccionada (1,25x), previamente tratada com Fluoreto de Sódio a 0,05% (NaF 0,05%), mostrando uma atividade baixa das MMPs, **(C)** Coroa seccionada (1,25x), previamente tratada com Clorexidina a 0,12% (CHX 0,12%), mostrando uma atividade baixa das MMPs e **(D)** Coroa seccionada (1,25x), previamente tratada com Polifenol Epigallocatequina 3-galato 400 μ M (EGCG 400 μ M), mostrando uma atividade baixa das MMPs. Barra = 2mm **(A, B, C e D)**.

Figura 19. Microscopia de fluorescência revela atividade gelatinolítica nas regiões de esmalte (E), dentina (D) e junção amelodentinária (JAD), em dentes decíduos humanos irradiados. **(A)** Região cervical (5x), mostrando a atividade das MMPs. **(B)** Região cervical (5x), previamente tratada com Fluoreto de Sódio a 0,05% (NaF 0,05%), mostrando uma atividade baixa das MMPs, **(C)** Região cervical (5x), previamente tratada com Clorexidina a 0,12% (CHX 0,12%), mostrando uma atividade baixa das MMPs e **(D)** Região cervical (5x), previamente tratada com Polifenol Epigallocatequina 3-galato 400µM (EGCG 400µM), mostrando uma atividade baixa das MMPs, **(E)** Cúspide (5x), mostrando a atividade das MMPs. **(F)** Cúspide (5x), previamente tratada com Fluoreto de Sódio a 0,05% (NaF 0,05%), mostrando uma atividade baixa das MMPs, **(G)** Cúspide (5x), previamente tratada com Clorexidina a 0,12% (CHX 0,12%), mostrando uma atividade baixa das MMPs e **(H)** Cúspide (5x), previamente tratada com Polifenol Epigallocatequina 3-galato 400µM (EGCG 400µM), mostrando uma atividade baixa das MMPs, **(I)** Região de fundo do sulco (5x), mostrando a atividade das MMPs. **(J)** Região de fundo do sulco (5x), previamente tratada com Fluoreto de Sódio a 0,05% (NaF 0,05%), mostrando uma atividade baixa das MMPs **(K)** Região de fundo do sulco (5x), previamente tratada com Clorexidina a 0,12% (CHX 0,12%), mostrando uma atividade baixa das MMPs e **(L)** Região de fundo do sulco (5x), previamente tratada com Polifenol Epigallocatequina 3-galato 400µM (EGCG 400µM), mostrando uma atividade baixa das MMPs. Barra = 0,5mm (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K e L).

Nos dentes permanentes, por outro lado, o tratamento com as diferentes soluções alterou a intensidade de fluorescência/mm² nos espécimes irradiados com relação ao grupo controle (água destilada) ($p < 0,05$). Nas regiões cervical e de cúspide, as três soluções utilizadas CHX 0,12%, NaF 0,05% e EGCG 400μM inibiram a atividade das MMPs. Porém na região do fundo do sulco, a solução a base de EGCG 400μM não apresentou diferença estatisticamente significativa, quando comparado com o grupo controle (água destilada) (Figura 20, 21 e 21).

Figura 20. Comparação da atividade gelatinolítica das MMPs em dentes permanentes irradiados, realizada por meio da zimografia *in situ*. A intensidade de fluorescência/mm² na região cervical, na cúspide e no fundo do sulco foi mensurada na mesma profundidade e área, após o tratamento com solução de Digluconato de Clorexidina a 0,12% (CHX 0,12%), Fluoreto de Sódio a 0,05% (NaF 0,05%), Polifenol Epigallocatequina 3-galato 400μM (EGCG 400μM) ou água destilada (controle negativo). * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$; n=24 dentes irradiados).

Figura 21. Microscopia de fluorescência revela atividade gelatinolítica nas regiões de esmalte (E), dentina (D) e junção amelodentinária (JAD), em dentes permanentes humanos irradiados. **(A)** Coroa seccionada (1,25x) mostrando a atividade das MMPs. **(B)** Coroa seccionada (1,25x), previamente tratada com Fluoreto de Sódio a 0,05% (NaF 0,05%), mostrando uma atividade baixa das MMPs, **(C)** Coroa seccionada (1,25x), previamente tratada com Clorexidina a 0,12% (CHX 0,12%), mostrando uma atividade baixa das MMPs e **(D)** Coroa seccionada (1,25x), previamente tratada com Polifenol Epigallocatequina 3-galato 400 μ M (EGCG 400 μ M), mostrando uma atividade baixa das MMPs. Barra = 2mm **(A, B, C e D)**.

Figura 22. Microscopia de fluorescência revela atividade gelatinolítica nas regiões de esmalte (E), dentina (D) e junção amelodentinária (JAD), em dentes permanentes humanos irradiados. **(A)** Região cervical (5x), mostrando a atividade das MMPs. **(B)** Região cervical (5x), previamente tratada com Fluoreto de Sódio a 0,05% (NaF 0,05%), mostrando uma atividade baixa das MMPs, **(C)** Região cervical (5x), previamente tratada com Clorexidina a 0,12% (CHX 0,12%), mostrando uma atividade baixa das MMPs e **(D)** Região cervical (5x), previamente tratada com Polifenol Epigallocatequina 3-galato 400µM (EGCG 400µM), mostrando uma atividade baixa das MMPs, **(E)** Cúspide (5x), mostrando a atividade das MMPs. **(F)** Cúspide (5x), previamente tratada com Fluoreto de Sódio a 0,05% (NaF 0,05%), mostrando uma atividade baixa das MMPs, **(G)** Cúspide (5x), previamente tratada com Clorexidina a 0,12% (CHX 0,12%), mostrando uma atividade baixa das MMPs e **(H)** Cúspide (5x), previamente tratada com Polifenol Epigallocatequina 3-galato 400µM (EGCG 400µM), mostrando uma atividade baixa das MMPs, **(I)** Região de fundo do sulco (5x), mostrando a atividade das MMPs. **(J)** Região de fundo do sulco (5x), previamente tratada com Fluoreto de Sódio a 0,05% (NaF 0,05%), mostrando uma atividade baixa das MMPs, **(K)** Região de fundo do sulco (5x), previamente tratada com Clorexidina a 0,12% (CHX 0,12%), mostrando uma atividade baixa das MMPs e **(L)** Região de fundo do sulco (5x), previamente tratada com Polifenol Epigallocatequina 3-galato 400µM (EGCG 400µM), mostrando uma atividade baixa das MMPs. Barra = 0,5mm **(A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K e L).**

A desmineralização exacerba a atividade de MMPs em dentes permanentes irradiados, porém não a exacerba dentes decíduos

Considerando que a radiação é capaz de ativar as MMPs expressas na JAD e que existem algumas substâncias (CHX 0,12%, NaF 0,05% e EGCG 400 μ M) capazes de inibi-las, nosso terceiro objetivo foi investigar o efeito ou um desafio ácido, por meio de um ataque ácido, na atividade das MMPs.

Observamos que o desafio ácido não alterou a atividade de MMPs nos dentes decíduos não irradiados quando comparado aos dentes hígidos, nas regiões cervical, cúspide e fundo do sulco. Similarmente, para os dentes decíduos irradiados, não houve nenhuma alteração na intensidade de fluorescência/mm², quando foram comparados aos dentes submetidos ou não ao desafio ácido (Figura 23 e 24)

Figura 23. Comparação da atividade gelatinolítica das MMPs em dentes decíduos irradiados e/ou desmineralizados, realizada por meio da zimografia *in situ*. A intensidade de fluorescência/mm² na região cervical, na cúspide e no fundo do sulco foi mensurada na mesma profundidade e área (n=6 dentes irradiados e n=6 dentes não irradiados pareados).

Figura 24. Microscopia de fluorescência revela atividade gelatinolítica nas regiões de esmalte (E), dentina (D) e junção amelodentinária (JAD), em dente decíduo humano. **(A)** Região cervical (5x), mostrando a atividade baixa das MMPs, **(B)** Região cervical (5x) previamente desmineralizada a um pH de 4,8%, mostrando atividade baixa das MMPs, **(C)** Região cervical de uma coroa seccionada irradiada (5x) mostrando a atividade das MMPs, **(D)** Região cervical de uma coroa seccionada irradiada (5x), previamente desmineralizada a um pH de 4,8% mostrando uma atividade das MMPs, **(E)** Cúspide (5x) mostrando a atividade baixa das MMPs, **(F)** Cúspide(5x) previamente desmineralizada a um pH de 4,8%, mostrando atividade baixa das MMPs, **(G)** Cúspide de uma coroa seccionada irradiada (5x) mostrando a atividade das MMPs, **(H)** Cúspide de uma coroa seccionada irradiada (5x) previamente desmineralizada a um pH de 4,8%, mostrando uma atividade das MMPs, **(I)** Região fundo do sulco (5x) mostrando a atividade baixa das MMPs, **(J)** Região fundo do sulco (5x), previamente desmineralizada a um pH de 4,8%, mostrando atividade baixa das MMPs, **(K)** Região fundo do sulco de uma coroa seccionada irradiada (5x), previamente desmineralizada a um pH de 4,8%, mostrando uma atividade das MMPs, **(L)** Região fundo do sulco de uma coroa seccionada irradiada (5x), mostrando a atividade das MMPs. Barra = 0,5mm **(A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K e L).**

Nos dentes permanentes irradiados, o desafio ácido aumentou a atividade de MMPs medida pela intensidade de fluorescência/mm², exibindo uma diferença estatisticamente significativa quando os dentes foram comparados com o grupo não irradiado ($p < 0,05$), nas três regiões estudadas, cervical, cúspide e fundo do sulco. Dentre os dentes irradiados, naqueles submetidos o desafio ácido, a intensidade de fluorescência foi maior nas regiões cervical e cúspide ($p < 0,05$).

Nos dentes permanentes não irradiados, a atividade de MMPs não foi influenciada pela desmineralização, em nenhuma das três áreas estudadas, cervical, cúspide e fundo do sulco da JAD (Figura 25 e 26).

Figura 25. Comparação da atividade gelatinolítica das MMPs em dentes permanentes irradiados e/ou desmineralizados, realizada por meio da zimografia *in situ*. A intensidade de fluorescência/mm² na região cervical, na cúspide e no fundo do sulco foi mensurada na mesma profundidade e área. *,# indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$; n=6 dentes irradiados e n=6 dentes não irradiados pareados).

Figura 26. Microscopia de fluorescência revela atividade gelatinolítica nas regiões de esmalte (E), dentina (D) e junção amelodentinária (JAD), em dente permanente humano. **(A)** Região cervical (5x), mostrando a atividade baixa das MMPs, **(B)** Região cervical (5x) previamente desmineralizada a um pH de 4,8%, mostrando atividade baixa das MMPs, **(C)** Região cervical de uma coroa seccionada irradiada (5x) mostrando a atividade das MMPs, **(D)** Região cervical de uma coroa seccionada irradiada (5x), previamente desmineralizada a um pH de 4,8% mostrando uma atividade das MMPs, **(E)** Cúspide (5x) mostrando a atividade baixa das MMPs, **(F)** Cúspide (5x) previamente desmineralizada a um pH de 4,8%, mostrando atividade baixa das MMPs, **(G)** Cúspide de uma coroa seccionada irradiada (5x) mostrando a atividade das MMPs, **(H)** Cúspide de uma coroa seccionada irradiada (5x) previamente desmineralizada a um pH de 4,8%, mostrando uma atividade das MMPs, **(I)** Região fundo do sulco (5x) mostrando a atividade baixa das MMPs, **(J)** Região fundo do sulco (5x), previamente desmineralizada a um pH de 4,8%, mostrando atividade baixa das MMPs, **(K)** Região fundo do sulco de uma coroa seccionada irradiada (5x), mostrando a atividade das MMPs **(L)** Região fundo do sulco de uma coroa seccionada irradiada (5x), previamente desmineralizada a um pH de 4,8%, mostrando uma atividade das MMPs,. Barra = 0,5mm **(A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K e L).**

5. *Discussão*

5. DISCUSSÃO

No presente estudo observou-se que a radiação ativou as MMPs na região da JAD, tanto em dentes decíduos como em dentes permanentes. Com base na zimografia, a ativação das MMPs nos dentes decíduos foi mais evidente na região cervical da JAD. Já nos dentes permanentes a radiação ativou as MMPs na JAD nas três regiões estudadas (cervical, cúspide e fundo de sulco). O estudo, embora *in vitro*, objetivou simular as condições clínicas do tratamento radioterápico em pacientes com neoplasias da região de cabeça e pescoço, tendo como objetivo principal a compreensão dos efeitos induzidos pela radiação na estrutura dental, e a investigação de possíveis tratamentos para reduzir esses efeitos, prevenindo ou minimizando sequelas comuns a esses pacientes, como a cárie relacionada a radiação, culminando com o objetivo principal de melhoraria da qualidade de vida destas pessoas.

A maioria dos estudos existentes na literatura analisaram a alteração da estrutura dental após radiação por cobalto 60 (Jansma et al., 1988; Pioch, Golfels e Staehle, 1992; Al-Nawas et al., 2000; Soares et al., 2010; Soares et al., 2011; De Siqueira Mellara et al., 2014; Gonçalves et al., 2014), por ser este aparelho, ainda hoje, um dos mais utilizados pelos hospitais a nível nacional. Assim, no presente estudo a radiação dos dentes também foi realizada por meio desta fonte. Foram efetuadas doses incrementais de 2 Gy diárias, até um total de 60 Gy (Anneroth et al., 1985; Jansma et al., 1993; Jham e da Silva Freire, 2006; Otmani, 2007) e os dentes foram mantidos em saliva artificial (Soares et al., 2011), tanto durante a radiação, como nos períodos entre elas, com a finalidade de simular o mais precisamente possível as condições clínicas da cavidade bucal.

No presente estudo foram realizadas hemisseções dentais de molares decíduos e permanentes de humanos (espécimes tomados de 2 estudos prévios: De Siqueira Mellara et al., 2014; Gonçalves et al., 2014). A utilização apenas de dentes molares vai de acordo aos resultados observados por Morais-Faria et al. (2015), que verificaram por meio de avaliação

dosimétrica, que em tratamento radioterápico de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, dentre os diversos grupos de dentes, os dentes molares são os que recebem a maior dose de radiação. Cada hemisseção de 0,6 mm foi avaliada em três regiões (cervical, cúspide e fundo de sulco). Estas regiões foram as escolhidas com base nas características apresentadas pelas lesões de cárie relacionadas a radiação, que geralmente progridem após um processo inicial de colapso da estrutura dental, com a delaminação do esmalte da dentina subjacente, possivelmente ocasionada pela desestruturação da JAD. Ainda, os dentes de pacientes pós-radioterapia de cabeça e pescoço costumam se apresentar mais friáveis em áreas expostas a maiores cargas oclusais (incisal/cúspide) e maiores intensidades de flexão (cervical) (Walker et al., 2011), sendo assim mais um motivo para a análise destas regiões.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o efeito da radiação foi menos intenso nos dentes decíduos que nos permanentes. Uma das possíveis razões pode ser pelos níveis mais baixos de Ca^{2+} e P^{3-} encontrados num dente decíduo (De Menezes, et al., 2010). O nível mais baixo de Ca^{2+} pode resultar numa menor estabilidade da MMPs e consequentemente uma menor atividade delas, devido ao fato de que para elas serem ativadas no sítio catalítico requerem da presença do Ca^{2+} (Birkedal-Hansen et al., 1993; Krane, 1994; Krane e Inada, 2008).

Outros estudos, que avaliaram dentes decíduos após radioterapia (Nalla et al., 2006; De Siqueira Mellara, 2014; De Sá Ferreira et al., 2015), concluíram que esta produz danos na matriz orgânica e na substância interprismática do esmalte, podendo fazer que reações químicas com as moléculas de água, alterem as propriedades de difusão, podendo levar a uma desidratação que afeta as propriedades mecânicas do esmalte. No presente estudo, nos dentes decíduos, observamos que a única região onde ocorreu a expressão das MMPs foi na região cervical. Sabe-se que a espessura do esmalte num dente decíduo é menor que a do dente permanente (De Menezes et al., 2010), sendo esta espessura ainda

menor na região cervical, talvez esta característica possa ter contribuído em parte para esse resultado.

A ativação e expressão das MMPs induzidas pela radiação foi demonstrada previamente em carcinomas de língua, revelando um papel importante da MMP-20 na patogênese do tumor e não somente na remodelação da matriz dental como amplamente estudado (Slavkin, 1979; Caterina et al., 2002; Sulkala et al., 2002; Bartlett et al., 2004). Recentemente McGuire et al. (2014a), num esforço para identificar o mecanismo responsável pela delaminação de esmalte associada com altas doses de radioterapia em pacientes com câncer oral, realizaram um estudo para avaliar se dentes humanos irradiados poderiam conter MMPs ativas. Os resultados sugeriram que a MMP-20 foi um componente resistente à radiação em esmalte e dentina, e sua forma cataliticamente ativa (23 kDa) degradou a matriz orgânica nestes sítios, podendo ser este fato responsável pela delaminação do esmalte. Dentre os substratos que são degradados pela MMP-20, está a amelogenina, principal componente estrutural da matriz do esmalte durante a amelogênese (Slavkin, 1979). Estudos sobre o desenvolvimento do esmalte bovino demonstraram que a porcentagem de proteína em peso caiu de 30% durante a fase secretória a 2% durante a fase de maturação (Fukae e Shimizu, 1974) e em incisivos de ratos, um declínio semelhante foi associado a uma alteração significativa na composição total de aminoácidos das proteínas da matriz do esmalte (Robinson et al., 1977), entretanto mesmo em dentes formados, parece que proteínas residuais exercem uma função importante.

Em virtude da pequena quantidade de substrato para MMP-20 num dente já formado, no presente estudo, além de avaliarmos a expressão da MMP-20, foram avaliadas também outras MMPs capazes de degradar a matriz orgânica do esmalte, da JAD e da dentina coronária, como as MMPs -2 e -9. Estas estão parcialmente em forma ativa, e podem degradar colágeno tipo I, IV e VII (Chaussain-Miller et al., 2006).

A região do esmalte foi avaliada, neste trabalho, devido à camada de matriz orgânica que permanece no tecido dental após a erupção, sendo notavelmente mais expressa nas regiões de cúspide/oclusal, a qual começa na JAD e se estende em direção à superfície exterior do dente por 200-300 μm (McGuire et al., 2014d). Outra região avaliada foi a JAD, que também contém fibras de colágeno tipo IV e VII, além das fibras de colágeno tipo I, que atravessam da dentina ao esmalte. As fibras de colágeno tipo VII incorporadas ao esmalte podem contribuir não só para a resistência estrutural à fratura e dureza do esmalte adjacente à JAD, como também desempenharem um papel na ligação do esmalte com a dentina (McGuire et al., 2014b). Seguindo a mesma linha de pesquisa foi demonstrado que a JAD enriquecida por colágeno tipo IV pode, em parte, explicar a sua tenacidade e resistência à propagação da fratura e a sua estabilidade. Em contraste, a perda de colágeno tipo IV pode representar uma possível explicação bioquímica para a instabilidade observada na JAD após radioterapia. Outra região avaliada foi a dentina coronária por esta conter colágeno tipo I e por nesta região ser bem conhecida a atividade das MMPs -2 e -9 em processos como lesões de cárie e erosão dental (McGuire et al., 2014c).

Com base no exposto acima, fica evidente que há uma colocalização entre a matriz orgânica, o substrato para MMPs e a atividade gelatinolítica observada neste trabalho. Dessa forma, é de suma importância conhecer o padrão de expressão das MMPs-2, -9 e -20 nas diferentes regiões do dente, pós-irradiação, uma vez que essas enzimas podem contribuir para a delaminação do esmalte e assim produzir lesões similares a cárie.

A literatura relata que a MMP-2 foi identificada em toda a profundidade da dentina humana em dentes permanentes, sendo altamente concentrada na área subjacente a pré-dentina e na JAD. A MMP-9 foi identificada nos túbulos dentinários e na dentina intertubular em dentes permanentes. Em dentes decíduos, a concentração de MMP-9 foi considerada moderada na dentina infectada, entretanto mais elevada do que a de MMP-2. Já a MMP-20, em dentes permanentes, está localizada na matriz do esmalte, na JAD e na dentina (Mazzoni

et al., 2007; Boushell et al., 2008; Niu et al., 2011; Chibinski et al., 2014 e McGuire et al., 2014a).

Ao comparar nosso trabalho com os existentes na literatura, observamos semelhanças na localização da expressão das MMPs. A expressão das MMPs-2, -9 e -20 foi avaliada por meio da imunofluorescência, sem encontrar diferença entre dentes irradiados e não irradiados. Nos dentes decíduos, a expressão da MMP-2 foi difusa nas regiões estudadas, diferentemente da expressão da MMP-9 que foi mais marcada na dentina coronária e na JAD, na regiões cervical, sulco e cúspide. A MMP-20, por outro lado, foi difusamente expressa na dentina coronária, com maior expressão na JAD nas três regiões analisadas. Com relação aos dentes permanentes, as MMP-2, -9 e -20 foram expressas na dentina coronária, na região de esmalte e na JAD, nas regiões cervical, cúspide e fundo do sulco, onde se encontraram bem marcadas. Em alguns casos foi observado a presença de linhas de deposição na dentina.

Especula-se com estes resultados que a expressão distinta das MMPs nos dentes decíduos e permanentes sejam responsáveis pela diferença na atividade enzimática após a radiação. A menor expressão de MMP-2 e -20 nos dentes decíduos leva a menor atividade gelatinolítica nos dentes decíduos, uma vez que nestes dentes praticamente só está presente a MMP-9. Por outro lado, nos dentes permanentes, existem as MMPs-2, -9 e -20, as quais podem ser ativadas quando da exposição a radiação. Suspeitamos assim, que como a atividade enzimática das MMPs, nessas regiões, foi maior nos dentes permanentes que nos decíduos, os dentes permanentes possam ser mais vulneráveis a delaminação do esmalte e cárie relacionada a radiação.

De acordo com diferentes estudos (Anneroth et al., 1985; Knychalska-Karwan et al., 1988; Wöstmann e Rasche, 1995; Beumer et al., 1996; Jham e Freire, 2006; Kielbassa et al., 2006; Soares et al., 2010) observa-se que a radioterapia, quando aplicada na região de cabeça e pescoço, pode ocasionar alterações nas estruturas dentais, sendo mais danosa aos

componentes orgânicos que aos inorgânicos. A radiação ionizante pode causar oxidação não-seletiva de componentes orgânicos, incluindo descarboxilação e, finalmente, a proteólise de proteínas não-colagênicas do esmalte que estão presentes na região interprismática. Este mecanismo proteolítico pode ocorrer de uma maneira semelhante como quando a radioterapia rompe as ligações que mantêm a organização ultra-estrutural de componentes orgânicos em outros tecidos humanos (Mitchell et al., 1998; Hübner et al., 2005; McGuire 2014a).

Como visto na literatura as MMPs ao serem ativadas, estão envolvidas em vários fenômenos complexos. Existe uma ampla gama de substâncias que inativam as MMPs, para fins deste trabalho foram avaliadas três soluções, o Digluconato de Clorexidina 0,12% por ser usado rotineiramente na clínica odontológica, o Fluoreto de Sódio a 0,05% ou 225 ppm por poder ser um bochecho complementar a higiene bucal de uso diário e o Polifenol Epigallocatequina 3-galato 400µM o qual está sendo muito investigado por suas propriedades na Odontologia.

Nos dentes decíduos irradiados, observou-se que as três soluções utilizadas não inativaram as MMPs na JAD (regiões cervical, cúspide e fundo do sulco) quando comparados ao grupo controle no qual os dentes foram imersos em água destilada. Nos dentes permanentes, por outro lado, o tratamento com as diferentes soluções alterou e inativou as MMPs nos espécimes irradiados com relação ao grupo controle (água destilada). Nas regiões cervical e de cúspide, as três soluções utilizadas inibiram a atividade das MMPs, porém na região do fundo do sulco, a solução a base de EGCG 400µM não inativou as MMPs nos espécimes irradiados, quando comparado com o grupo controle (água destilada). Na literatura existem vários trabalhos que investigaram a inativação das MMPs por meio de soluções, porém inexistem estudos que tenham investigado a inativação das MMPs, especificamente a MMP-2, -9 e -20, em dentes irradiados ou em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

Com relação ao Digluconato de Clorexidina 0,12%, tem sido relatado na literatura que este inibidor de protease diminui até 3 vezes a taxa de degradação do colágeno (Kato et al., 2012). O mecanismo de ação envolve a alteração do domínio catalítico das MMPs. A CHX é capaz de interagir com os íons metálicos podendo ser ligada ao cálcio da apatita. Esta, por ser um quelante de zinco (Gendron et al., 1999), impede a ativação de MMPs tornando mais espesso o diâmetro das fibrilas de colágeno (Kim et al., 2011).

O flúor é um inibidor de protease muito estudado e conhecido na literatura, ele é utilizado como controle positivo para os trabalhos de investigação, ainda que o mecanismo pelo qual NaF iniba as MMPs não seja totalmente conhecido. Considerando-se que as MMPs são enzimas dependentes de Zn^{2+} e Ca^{2+} e o F é altamente eletronegativo, o tratamento com F pode tornar os cátions Zn^{2+} e Ca^{2+} indisponíveis para participar no processo catalítico e subsequente ativação das MMPs (Buzalaf et al., 2014).

Com relação ao inibidor de protease EGCG 400 μ M, seu mecanismo parece ser distinto da CHX e do F, cujos íons metálicos podem se ligar a sítios específicos das enzimas, causando alterações conformacionais e inativando a sua função catalítica. Segundo esta teoria, o EGCG se liga ao hidrogênio das collagenases, altera sua estrutura secundária e causa uma interação hidrofóbica e inibitória na atividade das proteases (Demeule et al., 2000; Madhan et al., 2007; Wittenauer et al., 2015).

A literatura relata que as MMPs desempenham papéis importantes em diferentes processos associados aos dentes, entre eles a progressão da erosão. Segundo a revisão de literatura de Buzalaf et al. (2014) as MMPs são secretadas como precursores inativos (proformas) e requerem de ativação para degradar componentes da matriz extracelular. MMPs humanas purificadas e salivares (-2, -8, -9) são ativadas em pH baixo (4,5). O pH baixo provoca a desmineralização da dentina e exposição das fibrilas de colágeno, concomitantemente, as MMPs da dentina e/ou salivares são ativadas. No pH baixo, as MMPs tem pouca atividade, conforme vai aumentando o pH, a atividade das MMPs aumenta,

quebrando a matriz de colágeno exposta pela desmineralização, permitindo a progressão e perda de dentina.

Considerando que, se além do dente ter sido exposto a radiação, ele for submetido a um desafio ácido, como ocorre geralmente em pacientes pós-radioterapia de cabeça e pescoço, que apresentam aumento da ingestão de comidas ricas em carboidratos, mudanças da microbiota bucal, diminuição do fluxo salivar e pobre higiene bucal, as sequelas às estruturas dentais podem ser ainda mais graves. Assim, resolvemos submeter os dentes pós-radiação a um desafio ácido e comparar com dentes não irradiados. Foi observado que o desafio ácido não alterou a atividade de MMPs nos dentes decíduos irradiados, similarmente ao que aconteceu nos dentes decíduos não irradiados.

O trabalho de De Sá Ferreira et al. (2015) difere do nosso, pois foi observado que o esmalte em dentes decíduos submetidos a radioterapia é afetado pela ciclagem de pH por 7 dias. Eles sugerem que estes resultados causam algum dano estrutural para o esmalte a partir do componente de fosfato, podendo ser por que a molécula de fósforo que está presente na estrutura da hidroxiapatita está localizada mais externamente, o que faz com que seja mais instável e susceptível a se danificar (Oliveira e Mansur, 2007; De Carvalho et al., 2011). Em nosso estudo, os dentes foram expostos ao ácido por 1 minuto, em uma única exposição.

Já para os dentes permanentes, em nosso estudo o desafio ácido aumentou a atividade das MMPs nos dentes irradiados, mas não aumentou a atividade nos dentes não irradiados. E comparando dentes irradiados submetidos ou não à desmineralização, observou-se que a desmineralização incrementou a atividade das MMPs, já induzida pela irradiação, nas regiões cervical e cúspide. Este achado concorda de novo com a patogênese da cárie relacionada à radiação e pode significar que em um dente que primeiramente sofreu delaminação de esmalte, a presença de um ambiente bucal ácido pode contribuir ainda mais

para o incremento da atividade de MMPs e o aparecimento de lesões de cárie caracterizadas por rápida progressão e acometimento de regiões normalmente consideradas de baixo risco.

Em resumo nossos resultados mostraram, que a ativação das MMP-2, -9 e -20 se produz nas regiões de alto conteúdo orgânico do esmalte, dentina contígua a JAD e JAD, esta ativação sugere a degradação de colágeno tipo I, IV e VII, responsáveis pela tenacidade e resistência à propagação da fratura, sugerindo que as MMPs quebram o colágeno na região da JAD, podendo levar à delaminação do esmalte da dentina, esta delaminação se encontra mais evidente na região de cervical e cúspide, seguindo a etiopatologia singular da cárie relacionada a radiação. Os dados aqui apresentados suportam que o Digluconato de Clorexidina 0,12%, o Fluoreto de Sódio a 0,05% e o Polifenol Epigallocatequina 3-galato 400µM são substâncias capazes de inibir as das MMP-2, -9 e -20. Efetuando a translação dos resultados do presente estudo *in vitro* para uma situação clínica seria de fundamental importância a aplicação de CHX, NaF, EGCG, quando da realização de tratamentos restauradores e endodônticos em pacientes pós-radioterapia, ou seja após a confecção do preparo cavitário ou cirurgia de acesso, com a finalidade de inativar as MMPs ativadas previamente pela radiação.

Finalmente, devemos estar atentos ao fato de que, na etiopatogenia da cárie relacionada a radiação, parecem interagir fatores diretos relacionados a ação da radiação nas estruturas dentais e fatores indiretos relacionados a xerostomia e mudanças de hábitos de higiene e alimentares. Assim, como conseguimos, até o presente momento, avaliar apenas a modulação dos fatores indiretos, o cirurgião dentista deve ser enfático no sentido de alertar aos pacientes submetidos radioterapia de cabeça e pescoço a necessidade de adoção de um programa rigoroso de promoção de saúde bucal, associado a visitas frequentes ao consultório odontológico e outras medidas complementares. Acreditamos que exista a necessidade de mais estudos abordando esse tema, tanto *in vitro*, como *ex vivo* e *in vivo*, visto que esta área de pesquisa encontra-se ainda com várias lacunas na literatura.

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados, e segundo nossos questionamentos e discussões, podemos concluir que:

1. Os dentes decíduos submetidos a radiação apresentam aumento da atividade das MMPs na JAD, na região cervical do dente. Nos dentes permanentes esse aumento foi observado nas regiões cervical, cúspide e fundo do sulco da JAD.
2. Os dentes decíduos apresentam alta expressão de MMP-9, seguidos por menor expressão de MMP-20, não apresentando expressão de MMP-2 nas três regiões estudadas (cervical, cúspide e fundo do sulco da JAD). Nos dentes permanentes as MMPs-2, -9 e -20 foram expressas similarmente, em todas as regiões avaliadas.
3. As soluções de Digluconato de Clorexidina 0,12%, Fluoreto de Sódio a 0,05% e Polifenol Epigallocatequina 3-galato 400µM não apresentaram efeitos nos dentes decíduos, porém foram capazes de inibir ou inativar as MMPs em dentes permanentes.
4. O desafio ácido não aumentou a atividade das MMPs nos dentes decíduos não irradiados quando comparado aos dentes hígidos, similarmente, para os dentes decíduos irradiados, não aumentou a atividade das MMPs quando foram comparados aos dentes submetidos ou não ao desafio ácido. Já para os dentes permanentes, o desafio ácido não aumentou a atividade das MMPs em dentes hígidos, porém

aumentou a atividade das MMPs em dentes irradiados. Comparando dentes permanentes irradiados submetidos ou não à desmineralização, observa-se que a desmineralização incrementa a atividade das MMPs, já induzida pela irradiação.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Açil Y, Springer IN, Niehoff P, Gassling V, Warnke PH, Açmaz S, Sönmez TT, Kimmig B, Lefteris V, Wiltfang J. Proof of direct radiogenic destruction of collagen in vitro. *Strahlenther Onkol* 2007; 183 (7): 374-9.
2. Adelstein DJ. Systemic chemotherapy for squamous cell head and neck cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2003; 4(12): 2151-63.
3. Aggarwal V. An in vitro evaluation of effect of ionizing radiotherapy on push-out strength of fiber posts under cyclic loading. *J Endod* 2009; 35 (5): 695-8.
4. Al-Nawas B, Grötz KA. Prospective study of the long term change of the oral flora after radiation therapy. *Support Care Cancer* 2006; 14(3): 291-6.
5. Albright JT, Topham AK, Reilly JS. Pediatric head and neck malignancies: US incidence and trends over 2 decades. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002; 128(6): 655-9.
6. Anneroth G, Holm LE, Karlsson G. The effect of radiation on teeth. A clinical, histologic and microradiographic study. *Int J Oral Surg* 1985; 14(3): 269-74.
7. Anneroth G, Holm LE, Karlsson G. The effect of radiation to the teeth. *Int J Oral Surg* 1985; 14: 269-274.
8. Arnold WH, Dorow A, Langenhorst S, Ginter Z, Bánóczy J, Gaengler P: Effect of fluoride toothpastes on enamel demineralization. *BMC Oral Health* 2006; 6: 1-6.
9. Bartlett JD, Beniash E, Lee DH, Smith CE. Decreased mineral content in MMP-20 null mouse enamel is prominent during the maturation stage. *J Dent Res* 2004; 83: 909-13.
10. Beumer J, Curtis ThA, Marunick MT. Maxillofacial rehabilitation, prosthodontic and surgical considerations, 1st edn. Medico Dental Media International, 1996; 43-71.
11. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993; 4(2): 197-250.
12. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993; 64: 474-Oncogene 2006; 25: 4230-4.
13. Bourd-Boittin K, Fridman R, Fanchon S, Septier D, Goldberg M, Menashi S. Matrix metalloproteinase inhibition impairs the processing, formation and mineralization of dental tissues during mouse molar development. *Experimental Cell Research* 2005; 304: 493-505.
14. Bourd-Boittin K, Septier D, Hall R, Goldberg M, Menashi S. Immunolocalization of enamelysin (matrix metalloproteinase-20) in the forming rat incisor. *J Histochem Cytochem*. 2004; 52(4): 437-45.

15. Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Bagnell R, Yamauchi M. Immunohistochemical localization of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin. *Archives of Oral Biology* 2008; 53: 109–16.
16. Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Yamauchi M. Distribution and relative activity of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin. *Int J Oral Sci.* 2011 ;3 (4): 192-9.
17. Braakhuis BJ, Brakenhoff RH, Leemans CR. Head and neck cancer: molecular carcinogenesis. *Ann Oncol.* 2005; 16 Suppl 2:ii249-50.
18. Bruno Correia Jham, Addah Regina da Silva Freirev. Oral complications of radiotherapy in the head and neck. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2006; 72(5): 704–708.
19. Bulucu B, Avsar A, Demiryürek EO, Yesilyurt C. Effect of radiotherapy on the microleakage of adhesive systems. *J Adhes Dent.* 2009; 11(4): 305-9.
20. Burlage FR, Coppes RP, Meertens H, Stokman MA, Vissink A. Parotid and submandibular/sublingual salivary flow during high dose radiotherapy. *Radiother Oncol.* 2001 ;61(3): 271-4.
21. Butler WT. Dentin matrix proteins and dentinogenesis. *Connect Tissue Res.* 1995; 33: 59-65.
22. Buzalaf MA, Kato MT, Hannas AR. The role of matrix metalloproteinases in caries dentin in primary teeth. *Caries Res.* 2014; 48(4): 312-9.
23. Caron C, Xue J, Sun X, Simmer JP, Barlett JD. Gelatinase A (MMP-2) in developing tooth tissues and amelogenin hydrolysis. *J Dent Res* 2001; 80: 16604.
24. Casiglia J, Woo SB. A comprehensive review of oral cancer. *Gen Dent.* 2001 ; 49(1): 72-82.
25. Caterina JJ, Skobe Z, Shi J, Ding Y, Simmer JP, BirkedalHansen H, et al. Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfect phenotype. *J Biol Chem* 2002; 277: 49598-604.
26. Caufield PW, Griffen AL. Dental caries. An infectious and transmissible disease. *Pediatr Clin North Am.* 2000; 47: 1001-1019.
27. Chaachouay H, Ohneseit P, Toulany M, Kehlbach R, Multhoff G, Rodemann HP. Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation. *Radiother Oncol* 2011; Jun 29.
28. Chai H, Lee J, Constantino P, Lucas P, Lawn B. Remarkable resilience of teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 7289–93.
29. Chaussain C, Boukpepsi T, Khaddam M, Tjaderhane L, George A, Menashi S. Dentin matrix degradation by host matrix metalloproteinases: inhibition and clinical perspectives toward regeneration. *Front Physiol.* 2013.

30. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *Journal of Dental Research* 2006; 85: 22–32.
31. Chibinski AC, Gomes JR, Camargo K, Reis A, Wambier DS. Bone sialoprotein, Cole A. S. e J. E. Eastoe, Eds., *Biochemistry and Oral Biology*, Butterworth, London, UK, 1988.
32. De Carvalho Filho ACB, Sanches RP, Martin AA, Espírito Santos AM, Soares LES Energy dispersive X-ray spectrometry study of the protective effects of fluoride varnish and gel on enamel erosion. *Microsc Res Tech*. 2011; 74: 839–844.
33. De Menezes Oliveira MA, Torres CP, Gomes-Silva JM, Chinelatti MA, De Menezes FC, Palma-Dibb RG, Borsatto MC. Microstructure and mineral composition of dental enamel of permanent and deciduous teeth. *Microsc Res Tech*. 2010.
34. De Pearce MS, Salotti JA, Little MP, McHugh K, Lee C, Kim KP, Howe NL, Ronckers CM, Rajaraman P, Sir Craft AW, Parker L, Berrington de González A. Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2012; 4; 380(9840): 499-505.
35. De Sá Ferreira EM, Soares LE, Antunes HS, Uemura ST, da Silva Barbosa P, Salmon HA Jr, de Sant'Anna GR. Effect of therapeutic doses of radiotherapy on the organic and inorganic contents of the deciduous enamel: an in vitro study. *Clin Oral Investig*. 2015.
36. De Siqueira Mellara T, Palma-Dibb RG, de Oliveira HF, Garcia Paula-Silva FW, Nelson-Filho P, da Silva RA, da Silva LA, de Queiroz AM. The effect of radiation therapy on the mechanical and morphological properties of the enamel and dentin of deciduous teeth--an in vitro study. *Radiation Oncology*. 2014;9:30.
37. Deakins M. and J. F. Volker, "Amount of organic matter in enamel from several types of human teeth," *Journal of Dental Research*. 1941; 20: 117-121.
38. Demeule M, Brossard M, Page M, Gingras D, Beliveau R. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochim Biophys*. 2000; 1478: 51-60.
39. Döbrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev*. 2005; 24(1): 9-17.
40. Dusevich V, Xu C, Wang Y, Walker M, Gorski J. Identification of a protein-containing enamel matrix layer which bridges with the dentine–enamel junction of adult human teeth. *Arch Oral Biol* 2012; 57:1585–94.
41. Ejeil A, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, God-eau G, Gogly B. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingival. *J Period-ontol* 2003;74:188-95.
42. Ekstrand KR, Ricketts DN, Kidd EA. Occlusal caries: pathology, diagnosis and logical management. *Dent Update*. 2001; 28: 380-387.
43. Embery G, Hall R, Waddington R, Septier D, Goldberg M. Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001; 12(4): 331-49.

44. Faria K. M. et. al., Micromorphology of the Dental Pulp Is Highly Preserved in Cancer Patients Who Underwent Head and Neck Radiotherapy. JOE. 2014; 40:1553-9.
45. Ferlay, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN Int J Cancer. 2008; 127: 2893-917, Dec 15 2010.
46. Frederiks WM, Mook OR. Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on in situ zymography of gelatinases: review and protocols. J Histochem Cytochem. 2004; 52(6): 711-22.
47. Fukae M. e Shimizu M., "Studies on the proteins of develop- ing bovine enamel," Archives of Oral Biology. 1974; 19: 5: 381-386.
48. 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. 2009a;Sci117:255-260.
49. 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; 43:422-429.
50. Ganss C, Lussi A, Sommer N, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of fluoride compounds and stannous chloride as erosion inhibitors in den- tine. Caries Res. 2010; 44:248-252.
51. Ganss C, Schlueter N, Hardt M, von Hinckeldey J, Klimek J. Effects of toothbrushing on eroded dentine. Eur J Oral Sci. 2007; 115:390-396.
52. Gaudet, M. et al. Anthropometry and head and neck cancer:a pooled analysis of cohort data. Int J Epidemiol. 2015; 44: 673-81. ISSN 0300-5771.
53. 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: 437-43.
54. Goldberg M, Smith AJ. CELLS AND EXTRACELLULAR MATRICES OF DENTIN AND PULP: A BIOLOGICAL BASIS FOR REPAIR AND TISSUE ENGINEERING. Crit Rev Oral Biol Med. 2004; 15(1): 13-27.
55. Gonçalves LMN, Palma-Dibb RG, Paula-Silva FWG, Oliveira HF, Nélon-Filho P, Silva LAB, Queiroz AM. Radiation therapy alters microhardness and microstructure of enamel and dentin of permanent human teeth. J Dent 2014; 42: 986–992.
56. Grötz KA, Duschner H, Kutzner J, Thelen M, Wagner W. Histotomography studies of direct radiogenic dental enamel changes. Mund Kiefer Gesichtschir 1998; 2(2): 85-90.
57. Grötz KA, Duschner H, Kutzner J, Thelen M, Wagner W. New evidence for the etiology of so-called radiation caries. Proof for directed radiogenic damage od the enamel-dentin junction. Strahlenther Onkol 1997; 173(12): 668-76.

58. Grötz KA, Riesenbeck D, Brahm R, Seegenschmiedt MH, al-Nawas B, Dörr W, Kutzner J, Willich N, Thelen M, Wagner W. Chronic radiation effects on dental hard tissue (radiation caries). Classification and therapeutic strategies. *Strahlenther Onkol* 2001; 177(2): 96-104.
59. Gusman H, Santana RB, Zehnder M. Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. *Eur J Oral Sci* 2002; 110: 35-7.
60. Hall R, Septier D, Embury G, Goldberg M. Stromelysin-1 (MMP-3) in forming enamel and predentine in rat incisor-coordinated distribution with proteoglycans suggests a functional role. *Histochem J* 1999; 31: 761-70.
61. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand*. 2007.
62. Hong SH, Cho YS, Chung WH, Koh SJ, Seo IS, Woo HC. Changes in external ear resonance after ventilation tube (Grommet) insertion in children with otitis media with effusion. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2001; 58(2): 147-52.
63. Imbeni V, Kruzic JJ, Marshall GW, Marshall SJ, Ritchie RO. The dentin-enamel junction and the fracture of human teeth. *Nat Mater* 2005; 4: 229-232.
64. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>. Acesso em 29/11/2009.
65. Jansma J, Borggreven JM, Driessens FC, 's-Gravenmade EJ. Effect of X-ray irradiation on the permeability of bovine dental enamel. *Caries Res* 1990; 24(3): 164-8.
66. Jansma J, Buskes JA, Vissink A, Mehta DM, Gravenmade EJ. The effect of X-ray irradiation on the demineralization of bovine dental enamel. A constant composition study. *Caries Res* 1988; 22(4): 199-203.
67. Jansma J, Vissink A, Jongebloed WL, et al. Natural and induced radiation caries: A SEM study. *Am J Dent*. 1993; 6: 130-136.
68. Jervoe P. X-ray diffraction investigation on the effect of experimental and in situ radiation on mature human teeth. A preliminary report. *Acta Odontol Scand* 1970; 28(5): 623-31.
69. Jham, B. C.; Da Silva Freire, A. R. Oral complications of radiotherapy in the head and neck. *Braz J Otorhinolaryngol* 2006; 72: 5: 704-8.
70. Jongebloed WL, 's-Gravenmade EJ, Retief DH. Radiation caries. A review and SEM study. *Am J Dent* 1988;1:139-146.
71. Jongebloed WL, Gravenmade EJ, Retief DH. Radiation caries. A review and SEM study. *Am J Dent*. 1988; 1:139-146.

72. Karmiol M, Walsh RF. Dental caries after radiotherapy of the oral regions. *J Am Dent Assoc.* 1975; 91:838–845.
73. Kato MT, Bolanho A, Zarella BL, Salo T, Tjäderhane L, Buzalaf MA. Sodium fluoride inhibits MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res.* 2014 Jan;93(1):74-7. doi: 10.1177/0022034513511820.
74. Kato MT, Hannas AR, Leite AL, Bolanho A, Zarella BL, Santos J, et al. Activity of matrix metalloproteinases in bovine versus human dentine. *Caries Res* 2011; 45: 429-434.
75. Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MA. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. *J Dent Res* 2010a; 89: 468-472.
76. Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Calabria MP, Magalhães AC, Pereira JC, Buzalaf MA. Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase. *J Dent Res.* 2012; 91(12): 1119-23.
77. Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Oliveira RC, Pereira JC, Tjäderhane L, et al. Effect of iron on matrix metalloproteinase inhibition and on the prevention of dentine erosion. *Caries Res.* 2010b; 44: 309-316.
78. Kato MT, Magalhães AC, Rios D, Hannas AR, Attin T, Buzalaf MA. Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. *J* 2009; *Appl Oral Sci* 17:560-564.
79. Kielbassa AM, Hinkelbein W, Hellwig E, Meyer-Lückel H. Radiation-related damage to dentition. *Lancet Oncol.* 2006 Apr;7(4):326-35.
80. Kielbassa, A. M. et al., Irradiation effects on microhardness of fluoridated and non-fluoridated bovine dentin. *Eur J Oral Sci*, 1997; v. 105, n. 5 Pt 1, p. 444-7.
81. Kielbassa, A. M. In situ induced demineralization in irradiated and non-irradiated human dentin. *Eur J Oral Sci*, 2000; v. 108, n. 3, p. 214-21.
82. Kim DS, Kim J, Choi KK, Kim SY. The influence of chlorhexidine on the remineralization of demineralized dentine. *J Dent* 2011; 39: 855-862.
83. Kim YB, Kim GE, Cho NH, Pyo HR, Shim SJ, Chang SK, Park HC, Suh CO, Park TK, Kim BS. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with a poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation and concurrent chemotherapy. *Cancer.* 2002; 95(3): 531-9.
84. Kinney JH, Balooch M, Haupt DL Jr, Marshall SJ, Marshall GW Jr. Mineral distribution and dimensional changes in human dentin during demineralization. *J Dent Res.* 1995; 74:1179-1184.
85. Kleter GA, Damen JJ, Everts V, Niehof J, ten Cate JM. The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin in vitro. *J Dent Res* 1994; 73: 1523-1529.

86. Klozar J, Tachezy R, Rotnaglova E, Koslabova E, Salakova M, Hamsikova E. Human papillomavirus in head and neck tumors: epidemiological, molecular, and clinical aspects. *Wien Med Wochenschr.* 2010; 160: 305-309. 21.
87. Knychalska-Karwan Z, Pawlicki R, Karwan T. Structural and microanalytical changes in dentition after radiotherapy applied in cases of tumour in the oral cavity region. *Folia Histochem Cytobiol* 1988; 26(1): 25-32.
88. Knychalska-Karwan Z, Pawlincki R, Karwan T Structural and micronanalytical changes in dentition after radiotherapy applied in cases of tumour in the oral cavity region. *Folia Histochem Cytobiol* 1988; 26: 25–32.
89. Krane SM, Inada M. Matrix metalloproteinases and bone. *Bone.* 2008; 43(1):7-18.
90. Krane SM. Clinical importance of metalloproteinases and their inhibitors. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 Sep 6;732:1-10.
91. LeFevre M. L. and Manly R. S., "Moisture, inorganic and organic contents of enamel and dentin from carious teeth," *Journal of the American Dental Association*, 1938; 24: 233-242.
92. Lieshout HF, Bots CP. The effect of radiotherapy on dental hard tissue-a systematic review. *Clin Oral Investig*; 2013.
93. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4(5): 679-728.
94. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. *J Oral Pathol Med.* 2004.
95. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986; 50: 353-380.
96. Lombard C, Saulnier J, Wallach J. Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: a review. *Biochimie.* 2005; 87(3-4): 265-72.
97. Lyons A. Current concepts in the management of oral cancer. *Dent Update.* 2006; 33(9): 538-9, 542-5.
98. Madhan B, Krishnamoorthy G, Rao JR, Nair BU. Role of green tea polyphenols in the inhibition of collagenolytic activity by collagenase. *Int J Biol Macromol.* 2007; 41(1): 16-22.
99. Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MA. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. *J Dent* 2009; 37: 994-998.
100. Mäkelä M, Salo T, Uitto V-J, Larjava H. Matrix metallo- proteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res* 1994; 73: 1397-406.

101. Markitziu A, Gedalia I, Rajstein J, Grajover R, Yarshanski O, Weshler Z. In vitro irradiation effects on hardness and solubility of human enamel and dentin pretreated with fluoride. *Clinical Prevent Dent* 1986; 8(4): 4-7.
102. Marquezan M, Corrêa FN, Sanabe ME, Rodrigues Filho LE, Hebling J, Guedes-Pinto AC, Mendes FM. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. *Arch Oral Biol*. 2009 Dec; 54(12): 1111-7.
103. Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent*. 1997.
104. Marshall SJ, Balooch M, Habelitz S, Balooch G, Gallagher R, Marshall GW . The dentin-enamel junction - a natural, multilevel interface. *J Eur Ceram Soc* 2003; 23: 2897-2904.
105. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol*. 2010; 11: 781-789.
106. Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GA, Papa S, Mazzotti G, Di Lenarda R, Pashley DH, Breschi L. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res*. 2007; 86 (5): 436-40.
107. McGuire JD, Gorski JP, Dusevich V, Wang Y, Walker MP. Type IV collagen is a novel DEJ biomarker that is reduced by radiotherapy. *J Dent Res*. 2014c; 93(10): 1028-34.
108. McGuire JD, Mousa AA, Zhang BJ, Todoki LS, Huffman NT, Chandrababu KB, et al. Extracts of irradiated mature human tooth crowns contain MMP-20 protein and activity. *J Dent* 2014a; 42: 626-636.
109. McGuire JD, Walker MP, Dusevich V, Wang Y, Gorski JP. Enamel organic matrix: potential structural role in enamel and relationship to residual basement membrane constituents at the dentin enamel junction. *Connect Tissue Res*. 2014d.
110. McGuire JD, Walker MP, Mousa A, Wang Y, Gorski JP. Type VII collagen is enriched in the enamel organic matrix associated with the dentin-enamel junction of mature human teeth. *Bone* 2014b; 63: 29-35.
111. Mjor I. A. e Ole F., *Human Oral Embryology and Histology*, Munksgaard, Copenhagen, Denmark, 1986.
112. Morais-Faria K, Menegussi G, Marta G, Fernandes PM, Dias RB, Ribeiro AC, Lopes MA, Cernea CR, Brandão TB, Santos-Silva AR. Dosimetric distribution to the teeth of patients with head and neck cancer who underwent radiotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2015 Sep; 120(3): 4169.
113. Myoung S, Lee J, Constantino P, Lucas P, Chai H, Lawn B. Morphology and fracture of enamel. *J Biomech* 2009; 42: 1947-51.
114. Nagai N, Nakano K, Sado Y, Naito I, Gunduz M, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Ninomiya Y, Siar CH. Localization of type IV collagen alpha 1 to alpha 6 chains in basement membrane during mouse molar germ development. *Int J Dev Biol* 2001; 45: 827-31.

115. Nagler RM. The enigmatic mechanism of irradiation-induced damage to the major salivary glands. *Oral Dis.* 2002; 8(3): 141-6.
116. Nalla RK, Kinney JH, Tomsia AP, Ritchie RO Role of alcohol in the fracture resistance of teeth. *J Dent Res* 2006; 85(11): 1022–1026.
117. Nanci A. Ten Cate's Oral Histology, Development, Structure, and Function, Mosby, St. Louis, Mo, USA, 2003.
118. Niu LN, Zhang L, Jiao K, Li F, Ding YX, Wang DY, Wang MQ, Tay FR, Chen JH. Localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. *J Dent.* 2011; 39(8): 536-42.
119. Novaes PERS. Radioterapia. In: Brentani MM, Coelho FRG, Iyeyasu H, Kowalski LP, editors. *Bases da oncologia*. 1 ed. São Paulo: ED. Marina;1998.
120. Nuttall RK, Sampieri CL, Pennington CJ, Gill SE, Schultz GA, Edwards DR. Expression analysis of the entire MMP and TIMP gene families during mouse tissue development. *FEBS Letters* 2004; 563: 12934.
121. Ohrn KE, Wahlin YB, Sjöden PO. Oral status during radiotherapy and chemotherapy: a descriptive study of patient experiences and the occurrence of oral complications. *Support Care Cancer* 2001; 9(4): 247-57.
122. Oliveira M, Mansur HS Synthetic tooth enamel: SEM characterization of a fluoride hydroxyapatite coating for dentistry applications. *Mater Res* 2007; 10: 115–118.
123. Otmani, N. Oral and maxillofacial side effects of radiation therapy on children. *J Can Dent Assoc* 2007; v. 73, n. 3:257-61.
124. Overman VP. The oral cancer foundation. *International Journal of Dental Hygiene* 2013; 7:229–30.
125. Paine ML, White SN, Luo W, Fong H, Sarikaya M, Snead M. Regulated gene expression dictates enamel structure and tooth function. *Matrix Biol* 2001; 20: 273-292.
126. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *Journal of Dental Research* 2004; 83: 216–21.
127. Paula-Silva FW, da Silva LA, Kapila YL. Matrix metalloproteinase expression in teeth with apical periodontitis is differentially modulated by the modality of root canal treatment. *J Endod.* 2010 Feb; 36(2): 231-7.
128. Paula-Silva FW, Ghosh A, Silva LA, Kapila YL. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. *J Dent Res.* 2009 Apr; 88(4): 339-44.
129. Perez-Ordoñez B, Beauchemin M, Jordan RC. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol.* 2006; 59: 445-453.

130. Pioch T, Golfels D, Staehle HJ. An experimental study of the stability of irradiated teeth in the region of the dentinoenamel junction. *Endod Dent Traumatol* 1992; 8(6): 241-4.
131. Ramirez-Amador V, Silverman S Jr, Mayer P, Tyler M, Quivey J. Candidal colonization and oral candidiasis in patients undergoing oral and pharyngeal radiation therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997; 84(2): 149-53.
132. Robinson C., Lowe N. R., e Weatherell J. A., "Changes in amino acid composition of developing rat incisor enamel," *Calcif Tissue International*, 1977; vol. 23, no. 1, pp. 19-31.
133. Rönholm E., "An electron microscopic study of the amelogenesis in human teeth. I. The fine structure of the ameloblasts," *Journal of Ultrastructure Research*, 1962; vol. 5, no. 2, pp. 229-248.
134. Sahlberg C, Reponen P, Tryggvason K, Thesleff I. Timp-1, -2 and -3 show coexpression with gelatinases A and B during mouse tooth morphogenesis. *European Journal of Oral Sciences* 1999; 107:121-30.
135. Scaffa PMC, 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: 420-425.
136. Silva AR, Alves FA, Antunes A, Goes MF, Lopes MA. Patterns of demineralization and dentin reactions in radiation-related caries. *Caries Res* 2009a; 43(1): 43-9.
137. Silva AR, Alves FA, Berger SB, Giannini M, Goes MF, Lopes MA. Radiation-related caries and early restoration failure in head and neck cancer patients. A polarized light microscopy and scanning electron microscopy study. *Support Care Cancer* 2009b; 17.
138. Simmer J, Hu J-C. Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry. *J Dent Educ* 2001; 65: 896-905.
139. Sivasithamparan J, Visk CA, Cohen EE, King AC. Modifiable risk behaviors in patients with head and neck cancer. *Cancer*. 2013 ; 119(13): 2419-26.
140. Slavkin H. C. *Developmental Craniofacial Biology*, Lea and Febiger, Philadelphia, Pa, USA. 1979.
141. Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*. 2005; 38(1): 73-83.
142. Soares CJ, Castro CG, Neiva NA, Soares PV, Santos-Filho PC, Naves LZ, Pereira PN. Effect of gamma irradiation on ultimate tensile strength of enamel and dentin. *J Dent Res* 2010; 89(2): 159-64.
143. Soares CJ, Neiva NA, Soares PB, Dechichi P, Novais VR, Naves LZ, Marques MR. Effects of chlorhexidine and fluoride on irradiated enamel and dentin. *J Dent Res* 2011; 90(5): 659-64.

144. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases/(MMPs) in oral diseases. *Oral Dis* 2004; 10: 311-8.
145. Springer IN, Niehoff P, Warnke PH, Böcek G, Kovács G, Suhr M, Wiltfang J, Açil Y. Radiation caries--radiogenic destruction of dental collagen. *Oral Oncol* 2005; 41(7): 723-8.
146. Stanislawczuk R, Reis A, Loguercio AD. A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin-dentin interfaces. *Journal of Dentistry* 2011; 39: 40-7.
147. Stokman MA, Spijkervet FK, Burlage FR, Dijkstra PU, Manson WL, de Vries EG, Roodenburg JL. Oral mucositis and selective elimination of oral flora in head and neck cancer patients receiving radiotherapy: a double-blind randomized clinical trial. *Br J Cancer*. 2003; 88(7): 1012-6.
148. Strup-Perrot C, Vozenin-Brotons MC, Vandamme M, Benderitter M, Mathe D. Expression and activation of MMP-2, -3, -9, -14 are induced in rat colon after abdominal Xirradiation. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2006; 41: 60-70.
149. Sulaiman F, Huryn JM, Zlotolow IM. Dental extractions in the irradiated head and neck patient: a retrospective analysis of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center protocols, criteria, and end results. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003; 61(10): 1123-31.
150. 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: 6037.
151. Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, et al. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *J Dent Res* 2001; 80:1545-1549.
152. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ* 2001; 65: 1028-1037.
153. Tay FR, Pashley DH. Dentin bonding is there a future? *J Adhes Dent* 2004; 6: 263.
154. 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. *Journal of Dental Research* 1998; 77: 1622-9.
155. Tjäderhane L, Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Salo T. Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). *Adv Dent Res* 2001; 15: 55-58.
156. Toledano M, Nieto-Aguilar R, Osorio R, Campos A, Osorio E, Tay FR, Alaminos M. Differential expression of matrix metalloproteinase-2 in human coronal and radicular sound and carious dentine. *J Dent*. 2010; 38(8): 635-40.

157. Umemoto H, Akiyama M, Domon T, Nomura T, Shinkuma S, Ito K, Asaka T, Sawamura D, Uitto J, Uo M, Kitagawa Y, Shimizu H. Type VII collagen deficiency causes defective tooth enamel formation due to poor differentiation of ameloblasts. *Am J Pathol* 2012; 181: 1659–71.
158. Väänänen A, Srinivas R, Parikka M, Palosaari H, Bartlett JD, Iwata K, Grenman R, Stenman UH, Sorsa T, Salo T. Expression and regulation of MMP-20 in human tongue carcinoma cells. *J Dent Res*. 2001; 80(10): 1884-9.
159. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827-39.
160. Vissink A, Burlage FR, Spijkervet FK, et al. Prevention and treatment of the consequences of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003b; 14: 213–25.
161. Vissink A, Jansma J, Spijkervet FK, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 2003a; 14: 199–212.
162. Wahlgren J, Salo T, Teronen O, Luoto H, Sorsa T, Tjanderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpal inflammation and periapical root-canal exudates. *Int Endod J* 2002; 35: 897-904.
163. Walker MP, Wichman B, Cheng AL, Coster J, Williams KB. Impact of radiotherapy dose on dentition breakdown in head and neck cancer patients. *Practical Radiation Oncology* 2011; 1: 142–8.
164. Weatherell J, Weidmann S, Eyre D. Histological appearance and chemical composition of enamel protein from mature human molars. *Caries Res* 1968; 2: 281–93.
165. White SN, Paine ML, Luo W, Sarikaya M, Fong H, Yu Z, et al. The dentino-enamel junction is a broad transitional zone uniting dissimilar bioceramic composites. *J Am Ceram Soc* 2000; 83: 238–40.
166. Wittenauer J, Mäcke S, Sußmann D, Schweiggert-Weisz U, Carle R. Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. *Fitoterapia*. 2015 Mar; 101: 179-87.
167. Wöstmann B, Rasche KR (1995) The influence of radiotherapy on survival time of teeth and restorations. A study on patients with maxillofacial defects. *Zahnärztliche Welt* 104: 627–627.
168. Yan SJ, Blomme EA. In situ zymography: a molecular pathology technique to localize endogenous protease activity in tissue sections. *Vet Pathol*. 2003; 40(3) : 227-36.

Anexos

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA ATIVIDADE E EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES DA MATRIZ NA JUNÇÃO AMELODENTINÁRIA DE DENTES HUMANOS IRRADIADOS

Pesquisador: Claudia María Carpio Bonilla

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 43861415.0.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.043.934

Data da Relatoria: 29/04/2015

Apresentação do Projeto:

O projeto está apresentado de forma correta, cumpre todas as normativas estabelecidas pelo CEP da FORP/USP e CONEP.

Objetivo da Pesquisa:

As alterações estruturais na Junção Amelodentinária, causadas pela radioterapia, são causadas pela ativação das MMPs. Assim, estas alterações estruturais contribuem na patogênese da cárie de radiação, e ainda, existem produtos odontológicos capazes de promover a inativação das metaloproteinases da matriz.

Objetivo Primário:

Assim, visto que até o presente momento, escassos estudos (McGuire et al., 2014a; McGuire et al., 2014b; McGuire et al., 2014c) avaliaram a atividade das metaloproteinases em dentes pós radioterapia, são nossos objetivos, avaliar a expressão e ativação de metaloproteinases em dentes pós radioterapia.

Objetivo Secundário:

Investigar se produtos odontológicos (Clorhexiina 0.12%, Fluoreto de Sódio 0,05%, Polifenol Epigallocatequina 3-galato 400µM) apresentam potencial de inibir a ativação de MMPs, o que poderia resultar em menor risco de delaminação do esmalte.

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

Continuação do Parecer: 1.043.934

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Projeto in vitro. Estudo com dentes que serão doados pelo Biobanco da FORP/USP, após aprovação do projeto pelo CEP da FORP/USP.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para a área da odontologia, apresenta referências bibliográficas atualizadas e os pesquisadores são plenamente habilitados para o desenvolvimento do projeto em tela.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberado na 179ª Sessão Ordinária do CEP, realizada em 29/04/2015.

RIBEIRAO PRETO, 30 de Abril de 2015

Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Comitê de Ética em Pesquisa

Atest.CEP 005/2016

ATESTADO

Atestamos que o Protocolo nº 43861415.0.0000.5419 sobre a pesquisa intitulada **"Análise da atividade e expressão de metaloproteínases da matriz na junção amelodentinária de dentes humanos irradiados"**, sob a responsabilidade de Claudia María Carpio Bonilla, está de acordo com os Princípios Éticos adotados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, foi APROVADO em 29/04/2015.

We certify that the protocol nº 43861415.0.0000.5419 about the research entitled **"Analysis of the activity and expression of matrix metalloproteinases in dentinoenamel junction on irradiated human teeth"**, under responsibility of Claudia María Carpio Bonilla, is in accordance with the Ethical principles adopted by the Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, was approved in 29/04/2015.

Ribeirão Preto, 14 de março de 2016.

Profa. Dra. Simone Cecílio Hallak Regalo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa