

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Tese

Metaloproteinases da Matriz Extracelular e Cárie Dentária. Avaliação dos fluoretos TiF_4 , SnF_2 , ZnF_2 e NaF na expressão das MMP-2 e MMP-9 salivares humanas.

Eliana do Nascimento Torre

Pelotas, 2014

Eliana do Nascimento Torre

Metaloproteinases da Matriz Extracelular e Cárie Dentária. Avaliação dos fluoretos TiF_4 , SnF_2 , ZnF_2 e NaF na expressão das MMP-2 e MMP-9 salivares humanas.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Odontologia (área de concentração Dentística).

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Etges

Co-orientadora: Profa. Dra. Elenara Ferreira de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Renato Manzolli Leite

Pelotas, 2014

Dados de Catalogação da Publicação

T689m	Torre, Eliana do Nascimento
<p>Metaloproteinases da matriz extracelular e cárie dentária: avaliação dos fluoretos TiF_4, SnF_2, ZnF_2 e NaF na expressão das MMP-2 e MMP-9 salivares humanas / Eliana do Nascimento Torre; orientadora: Adriana Etges ; co-orientadores: Elenara Ferreira de Oliveira, Fábio Renato Manzolli Leite. - Pelotas: 2014. 84 f.</p>	
<p>Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Dentística, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, 2014.</p>	
<p>1. Metaloproteinases (MMPs). 2. Fluoretos. 3. Saliva. 4. Cárie dentária. 5. Inibidores de MMPs. I. Etges, Adriana (orient.) II. Oliveira, Elenara Ferreira de (co-orient.) III. Leite, Fábio Renato Manzolli (co-orient) IV. Título</p>	
<p>Black: D2</p>	

Bibliotecário: Fabiano Domingues Malheiro CRB -10/1955

Eliana do Nascimento Torre

Metaloproteinases da Matriz Extracelular e Cárie Dentária. Avaliação dos fluoretos TiF_4 , SnF_2 , ZnF_2 e NaF na expressão das MMP-2 e MMP-9 salivares humanas.

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Odontologia (Área de concentração em Dentística) Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 20/12/2014

Banca examinadora:

.....
Prof.a. Dra. Adriana Etges (Orientadora)
Doutora em Patologia Bucal pela USP/SP

.....
Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci
Doutor em Odontologia (Área de concentração Cariologia) pela FOP-UNICAMP

.....
Prof.Dr. Prof. Dr. Josué Martos
Doutor em Odontologia pela Universidade de Granada (UGR)

.....
Prof.a. Dra. Fernanda Nedel
Doutora em Biotecnologia pela UFPel

.....
Prof. Dr. Rodrigo Varella de Carvalho
Doutor em Odontologia (Área de concentração Dentística) pela UFPel

.....
Prof. Dr. Marcos Britto Corrêa (suplente)
Doutor em Odontologia (Área de concentração Dentística) pela UFPel

.....
Dra. Isadora Luana Flores (suplente)
Doutora em Estomatopatologia (Área de Concentração Patologia) pela FOP-UNICAMP
.....

**Dedico este trabalho à Ábio Power
Oliveira, meu grande incentivador,
meu amigo, companheiro
e meu amor.**

Agradecimentos

À **Deus** pela minha vida, por iluminar meu caminho e nele colocar sempre pessoas muito especiais e do bem...

À **minha família e amigos** por todo o incentivo e carinho...

Álbio, agradeço por ser tão especial, tão compreensivo, e estar sempre ao meu lado... Muito obrigada. Te amo tanto!

Aos meus pais, **Paulo e Neiva**, pessoas maravilhosas, exemplos a ser seguido... Me orgulho de dizer: Vocês são meus pais! Muito obrigada por propiciarem toda a minha educação, pelo amor incondicional, e carinho. Agradeço por todo o incentivo, hoje e sempre!!!! Amo vocês!!

A **minha irmã Rosana, Eliézer e Giovanna**, obrigada por fazerem parte de minha vida !!!

À Prof. Dra. **Adriana Etges**...Chefa! Agradecer é pouco... Agradeço por tudo, tudo, tudo, durante todo o período da minha pós-graduação....Agradeço pela confiança em mim depositada, apoio, companheirismo.... Agradeço simplesmente, por ser quem és...Agradeço por sua constante presença (mesmo quando se achava ausente!). Agradeço pelos conhecimentos partilhados, pela vivência agradável, e pelas palavras que confortavam e acalmavam, quando era necessário... Deixo aqui o meu reconhecimento registrado.

À Profa. Dra. **Elenara Oliveira**... minha gratidão por tudo o que você é... Por ter me acolhido com carinho e amizade... por ter compartilhado comigo seu imenso conhecimento... E mesmo em tão pouco tempo de convivência ter despertado em mim, uma grande admiração! Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. **Rodrigo Carvalho**, por toda a amizade, carinho e infinita boa vontade, sempre pronto para ajudar! Obrigada mesmo!

Ao Prof. Dr. **Fábio Leite**, muito obrigada por tudo e pela nossa antiga convivência!

Aos Profs.Drs. (amigos de sempre) **Josué Martos, Luis Eduardo Nova Cruz Neno), Luiz Fernando Silveira, Rudimar Baldissera, Rafael Lund, Oscar Luis V. Ramos, João Batista César Neto e Melissa Damian** pela convivência nas disciplinas, agradeço por todo o incentivo, desde que voltei à esta escola. Minha

enorme admiração pela pessoa e pelo profissional que vocês são!

Às Profs. Dras. **Ana Paula Neutzling, Ana Carolina Vasconcelos e Isadora Luana Flores** por toda a amizade e por dividirem e me acolherem neste laboratório, agradeço suas sempre carinhosas palavras de incentivo, e toda a ajuda! Em especial, agradeço muito a Profa.Dra. **Sandra Beatriz Tarquínio**, que sempre se mostrou disponível, amiga e sem nunca medir esforços para ajudar... Sem palavras para agradecer...

Ao Prof. Dr. **Flávio Fernando Demarco**, o qual é fonte de inspiração e grande exemplo, agradeço minha acolhida aqui no PPGO...

À todos os **professores da Pós-Graduação**, agradeço os ensinamentos e a partilha de grandes experiências profissionais!

À **Fabiana Chiapinotto**, amigona, você foi responsável por eu estar aqui hoje e quero agradecer muito e dividir com você esta conquista! Adoro muito você!!

Aos grandes amigos, **Raquel Venâncio, Hugo Ramalho Sarmento, Francine Madruga, Marília Barbosa e Aline Moraes**, muito obrigada por tudo!!!! Foi muito bom, conviver com vocês...

À **Sônia Luque Peralta**, amiga não tenho palavras para agradecer a convivência que tivemos... obrigada pelo companheirismo nos bons momentos, e também noutros, nem sempre tão fáceis...

À **Laura Pintado**, amiga... obrigada por dividir as alegrias, e também as dificuldades da rotina de um laboratório. Obrigada pelo convívio e toda a amizade!!!

À **Héllen Lacerda**, foi muito bom ter te conhecido, e mesmo com nossa pouca convivência, agradeço muito sua amizade!

Fernanda Voltarelli ! Pessoa ímpar! Muito obrigada por toda a sua amizade, ajuda, e companheirismo, de verdade!

Ao colega **Ricardo Carrillo Cotto**, muito obrigada por toda ajuda neste trabalho!

Aos colegas de laboratório **Fernanda Nedel, Alessandro Menna, Wellinton Luiz O. Da Rosa, Marcus Conde, Aline Almeida, Alexandre Susin, Karine Duarte da Silva, Silene Barbieri, Felipe Brunatto Luz, Felipe Martins, Rafael Karsburg, André R. Schinestsck e José Ricardo Souza Costa**... Obrigada por toda a ajuda e convivência!!! Um especial agradecimento à **Camila Pelleró Ferrúa**, por dividir todo o seu conhecimento e sua amizade...Foi muito bom conviver com você!!!!

Ao **Maicon Selayaran e Tamara Ripplinger**... meu agradecimento pela sua companhia, sua boa vontade, e toda a sua ajuda durante minha trajetória! Muito obrigada também pela amizade de vocês...

À **Rafaella Coi de Araújo**... muito obrigada pela alegre convivência e bom humor...e por me possibilitar partilhar de uma fase tão importante da tua vida!! Não foi só você quem aprendeu... Eu também aprendi muito com você!! Obrigada, mesmo!!

Ao pessoal dos laboratórios... muitíssimo obrigada por toda a ajuda prestada.... em especial ao **Leandro Pelleró Duro**, pela sua amizade e compromisso com seu trabalho.

À **Françoise Hélène van de Sande Leite**, muito brigada pela ajuda no início do delineamento da revisão sistemática!!

Aos colegas **Marcos Britto, Mauro Mesko, Renato Azevedo, Caroline Ely, Sílvia Fontes, Simone Oliveira, Lísia Loréa, Alexandra Rubin Cocco, Tamires Maske, Luíza Corrêa de Oliveira, Gabriela, Studzinski, Aline Ogilari, Cristina Isolan**... E a todos os colegas da pós-graduação, obrigada a cada um pelo convívio agradável!

Ao secretário da PPGO, e colega querido, **Celaniro Junior**...por transcender e muito sua obrigação, sendo amigo, solícito e companheiro, obrigada de verdade!!

Ao Programa de Pós Graduação em Odontologia/UFPel, representado pelo Coordenador Prof. Dr. **Maximiliano Sérgio Cenci**, agradeço a oportunidade única! Um reconhecimento especial pela competência com a qual esta casa continua sendo administrada!

À Faculdade de Odontologia, minha escola, na pessoa da Prof. Dra. **Márcia Bueno**, Diretora, o meu orgulho por estar novamente aqui, e o meu reconhecimento!

A Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela concessão da bolsa de doutorado, grande incentivo para a realização deste trabalho.

Resumo

TORRE, Eliana do Nascimento. **Metaloproteinases da Matriz Extracelular e Cárie Dentária. Avaliação dos fluoretos TiF_4 , SnF_2 , ZnF_2 e NaF na expressão das MMP-2 e MMP-9 salivares humanas.**2014. 84f. Tese. Programa de Pós Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Enzimas bacterianas foram consideradas as principais responsáveis pela degradação da matriz dentinária durante o processo de lesão de cárie dentária. No entanto, a literatura emergente sugere que enzimas derivadas do hospedeiro, e, em particular, as metaloproteinases da matriz (MMPs) contidas na dentina e na saliva podem desempenhar um papel importante neste processo, pela sua capacidade em degradar a matriz orgânica dentinária. Estes fatos possibilitam o estudo de novas opções terapêuticas para a prevenção e tratamento da lesão de cárie dentária. Uma revisão de literatura foi feita, como primeira parte desta tese, para elucidar a presença, localização e o nível de atividade das principais MMPs encontradas no tecido cariado humano, abordando temas relevantes, sobre o papel local das MMPs em relação a este tecido. A seleção dos trabalhos foi feita na base de dados Pubmed, em artigos com idioma inglês, até novembro de 2014. De 411 artigos elegíveis, 14 foram selecionados para o estudo completo, e 08 foram incluídos nesta revisão. A partir desta análise, respeitando os critérios de inclusão/exclusão propostos, pode-se concluir que a literatura possui poucos dados sobre a presença, localização, e nível de atividade enzimática no tecido cariado humano. Além disto, foi encontrada também uma heterogeneidade grande, a respeito das metodologias utilizadas para alcançar os objetivos de cada trabalho, e em relação à classificação do tipo de tecido dentinário cariado estudado. As MMPs mais frequentemente estudadas na dentina cariada humana foram, a MMP-2 e a MMP-9, seguidas pelas MMP-8 e MMP-20. Contudo pode-se sugerir que a MMP-2 parece ser, dentre as metaloproteinases estudadas, a que existe em maior quantidade no tecido dentinário cariado, localizada principalmente nos túbulos dentinários da dentina afetada (interna), próximo ao tecido pulpar. Como segunda parte, foi avaliada a possibilidade de utilização de alguns fluoretos como inibidores de MMPs salivares humanas, para interferir na prevenção ou progressão de lesões de cárie. Os fluoretos de estanho (SnF_2), fluoreto de zinco (ZnF_2) e o tetrafluoreto de titânio (TiF_4), foram testados em comparação com o fluoreto de sódio (NaF), para a inibição de MMPs salivares. Saliva de doadores saudáveis foi usada em ensaio por zimografia e testadas as soluções em concentrações clínicas relevantes. A zimografia mostrou inibição das MMP-2 e MMP-9 em ordem decrescente para os fluoretos ZnF_2 e TiF_4 > NaF e SnF_2 . Com as limitações de um estudo *in vitro*, pode-se sugerir que devido aos fluoretos testados terem mostrado capacidade de inibição de MMP-2 e -9 salivares, uma nova visão e perspectiva se abre, para o estudo destes materiais, na prevenção das lesões de cárie dentária.

Palavras-chave: MMPs; fluoretos; saliva; cárie dentária; inibidores de MMPs

Abstract

TORRE, Eliana do Nascimento. **Matrix Metalloproteinases and Dental Caries. Assessment of the fluorides TiF_4 , SnF_2 , ZnF_2 and NaF in the expression of the MMP-2 ad MMP-9 human salivaries.**2014. 84f. Tesis (Doctor Degree em Odontologia área de concentração Dentística) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2014

Bacterial enzymes were considered the main responsible factor for the degradation of the dentine matrix during the carious lesion. However, the emerging literature suggests that host derived enzymes, and, specially, the matrix metalloproteinases (MMPs) found in the dentine and in the saliva may play an important role in this process, due to their capacity to contribute to degradation of the dentine organic matrix. These facts are important as they enable the study of new therapeutic options for the dental caries lesions prevention and treatment. A literature review was carried out, as the first part of this thesis, to clarify the presence, location and the activity level of the main MMPs found in the human carious tissues, approaching relevant issues, on the local role of the MMPs in regard to this tissue. The selection of the papers done based on the Pubmed database, in the English language, until November 2014. From 411 eligible papers, 14 were selected for the full study, and 8 were included in this review. From this analysis, respecting the inclusion/exclusion criteria proposed, it can be concluded that the literature has little data on the presence, location and enzymatic activity level in the human carious tissue. Besides this, great differences were found concerning the methodologies used to reach the purposes of their work, and in regard to the classification of the type of carious dentinal tissue studied. The MMPs more often studied in the carious lesions in human dentine were the MMP-2, and MMP-9, followed by MMP-8 and MMP-20. Besides this, it can be suggested that the MMP-2 seems to be, among the studied metalloproteinases, the one in larger quantity in the carious dentinal tissue, mainly in the dentinal tubules of the affected dentine (internal), proximity with the pulp tissue. As a second part, the possibility of some fluoride usage as inhibitors of MMPs human salivary has been studied, to interfere in the prevention or progression of carious lesions. The tin fluoride (SnF_2), the zinc fluoride (ZnF_2) and the titanium tetrafluoride (TiF_4), were tested in comparison to the sodium fluoride (NaF), for the inhibition of salivary MMPs. Saliva of healthy donors was used in Zymography, and the solutions were tested in relevant clinical concentrations. The Zymography showed inhibition of the MMP-2 and MMP-9 in decreasing order for the fluorides ZnF_2 and TiF_4 > NaF and SnF_2 . With the limitations of an *in vitro* study, it can be suggested that due to the fact, the fluorides tested have shown the capacity of inhibiting the salivary MMP-2 and MMP-9, a new view and perspective arises for the study of these materials in the prevention of dental caries lesion.

Key-words: MMPs; fluorides; saliva; dental caries; MMPs inhibitors

Lista de figuras

Figura 1 - (Capítulo 1) Fluxograma da revisão.....35

Figura 1 - (Capítulo 2) Inibição das metaloproteinases da matriz (MMPs) salivares, pelos fluoretos TiF_4 e SnF_2 , em relação ao seu controle (c). Efeito sobre a atividade das gelatinases salivares MMP-2 e -9 foi observado nos géis por zimografia. Houve inibição significativa das formas pró e ativas de MMP-2 -9 salivares. TiF_4 inibiu, em todas as concentrações testadas, a atividade das MMP-2 e -9, enquanto o SnF_2 teve influência sobre a MMP-2 nas menores concentrações, mas não nas maiores concentrações (0,5%, 1% e 2%); já para a MMP-9, este fluoreto inibiu de forma dose-dependente, a partir da concentração de 0,2%. A redução nos níveis de cinza no gel, indicam a degradação enzimática.....57

Figura 2 - (Capítulo 2) Inibição das metaloproteinases da matriz (MMPs) salivares, pelos fluoretos NaF e ZnF_2 , em relação ao seu controle (c). Efeito sobre a atividade das gelatinases salivares MMP-2 e -9 foi observado nos géis por zimografia. Houve inibição significativa das formas pró e ativas de MMP-2 -9 salivares. ZnF_2 inibiu em, todas as concentrações testadas, a atividade das MMP-2 e MMP-9, enquanto o NaF teve influência de forma dose-dependente, com significante inibição a partir da concentração de 0,2%. A redução nos níveis de cinza no gel, indicam a degradação enzimática.....58

Lista de tabelas

Tabela 1 -(Capítulo 1)Estudos encontrados, de acordo com critérios de inclusão/exclusão.....	38
Tabela 2 -(Capítulo 1) Distribuição das MMPs triadas neste estudo, de acordo com sua presença, localização e atividade.....	41
Tabela 1 - (Capítulo 2) Percentual de inibição das MMP-2salivares pelos fluoretos NaF, ZnF ₂ , TiF ₄ e SnF ₂ , em relação ao controle.....	55
Tabela 2 - (Capítulo 2) Percentual de inibição das MMP-9 salivares pelos fluoretos NaF, ZnF ₂ , TiF ₄ e SnF ₂ , em relação ao controle.....	55
Tabela 3 - (Capítulo2) pH das soluções testadas, após diluição no tampão de revelação.....	56

Lista de abreviaturas e siglas

%	Percentual
µm	Micrometro
µl	Microlitro
<	Menor
>	Maior
°C	Graus Celsius
ANOVA	Análise de Variância
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Albumina Sérica Bovina)
BSP	Sialoproteína Óssea
Ca ⁺²	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CT	Cisteína Catepsina
CT B	Cisteína Catepsina - B
CT K	Cisteína Catepsina – K
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (Meio Essencial de Eagle modificado por Dulbecco)
Dp	Desvio Padrão
DSP	Sialoproteína Dentinária
DSPP	Sialofosfoproteína Dentinária
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FE-SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura
SnF ₂	Fluoreto de Estanho
FOP	Faculdade de Odontologia de Pelotas
JAD	Junção Amelodentinária
KDa	Kilodalton (unidade de medida de massa)
M	Molaridade
MB	Membrana Basal
MEC	Matriz Extracelular
Mg	Miligrama
Min	Minuto
Mm	Milímetro
mM	Milimolar

MMP	Metaloproteinase da Matriz Extracelular
mRNA	RNA Mensageiro
N	Normalidade
Nm	Nanômetro
NaF	Fluoreto de Sódio
NEM	n-etil-maleimida
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (Tampão Fosfato Salino)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogenio□nico
PI	Inibidor de Proteases
PO	Processos Odontoblásticos
PP	Fosfoforina
S	Segundo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de Poliacrilamida-SDS
SFB	Soro Fetal Bovino
TE	Tratamento Expectante
TGF-β	Fator de Crescimento Transformante-Beta
TiF ₄	Tetrafluoreto de Titânio
TIMPs	Inibidores Teciduais de MMPs
TM-MMP	Metaloproteinase Tipo-Membrana
Tris-HCl	Tri-Hidroximetilamino Metano Cloridrato
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
V	Volume
Zn ⁺²	Zinco
ZnF ₂	Fluoreto de zinco

Sumário

1 Introdução	15
1.2 Objetivos.....	17
1.2.1 Objetivo geral	17
1.2.2 Objetivos específicos.....	17
2 Revisão de Literatura	18
2.1 O processo da lesão de cárie.....	18
2.2 Metaloproteinases da Matriz Extracelular.....	19
2.3 Cárie e MMPs.....	21
3 Cronograma das atividades	26
4 Relatório do trabalho de campo	27
5 Capítulo 1 – O papel das metaloproteinases na dentina cariada humana: Revisão Sistemática	28
5.1 Introdução.....	30
5.2 Materiais e Métodos.....	33
5.3 Resultados.....	36
5.4 Discussão.....	42
5.5 Conclusão.....	47
6 Capítulo 2 - Inibição das MMP-2 e MMP-9 salivares humanas por fluoretos	48
6.1 Introdução.....	50
6.2 Materiais e Métodos.....	52
6.3 Resultados.....	54
6.4 Discussão.....	59
6.5 Conclusão.....	65
7 Considerações Finais	66
Referências bibliográficas	67
Apêndice A	81
Anexo A	83

1 Introdução

A literatura mostra a possibilidade da paralisação da lesão de cárie, em qualquer estágio do seu processo de desenvolvimento, quando for possível a desorganização e interferência no metabolismo do biofilme. No entanto, quando a lesão de cárie evolui para uma cavidade de conformação retentiva, poderá ser impossível o acesso para a desorganização do biofilme, havendo a indicação de uma intervenção mais radical: o tratamento restaurador. Quando não houver nenhum tipo de intervenção, a lesão de cárie pode evoluir do que inicialmente seria uma lesão de esmalte ou cemento até atingir o tecido dentinário, podendo progredir até haver um íntimo contato deste tecido desmineralizado e infectado, com o tecido pulpar (KIDD, 2010).

A desmineralização da dentina nas lesões de cárie, é promovida por ácidos bacterianos, entretanto os microrganismos não são os únicos responsáveis pela degradação do colágeno. Estudos demonstram que as metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs), enzimas endógenas, desempenham um importante papel na progressão da lesão de cárie, destruindo a matriz orgânica da dentina (TJÄDERHANE et al., 1998; SULKALA et al., 2001; HANNAS et al., 2007). A ativação das MMPs salivares e dentinárias está relacionada com a redução do pH (ativação ácida) e promove a degradação do tecido dentário, desmineralizado inicialmente pelas proteases bacterianas (TJÄDERHANE et al., 1998).

De acordo com a literatura, as principais MMPs encontradas na dentina humana são: a MMP-2, MMP-3, MMP-8, e MMP-9 (MARTIN - DE LAS HERAS et al., 2000; BOUKPESSI et al., 2008; SULKALA et al., 2007; MAZZONI et al., 2007). Mas a MMP-2, a chamada gelatinase A, parece ser a MMP mais encontrada na matriz dentinária (MARTIN DE LAS HERAS et al., 2000; BOUSHELL et al., 2008; TOLEDANO et al., 2010; BOUSHELL et al., 2011). Dentre as MMPs presentes na dentina, as MMP-2 e MMP-9 estão incorporadas e mais fortemente ligadas à matriz de dentina mineralizada (SULKALA et al., 2007; NIU et al., 2011). Adicionalmente, a MMP-9 (gelatinase B) é a principal MMP encontrada na saliva total (INGMAN et al., 1994; TJÄDERHANE et al., 1998).

Estas MMPs são secretadas pelos odontoblastos em resposta às agressões frente às lesões de cárie, e principalmente a MMP-2 parece ter um potencial envolvimento nos mecanismos de defesa do complexo dentino-pulpar, os quais

podem resultar em calcificação das regiões afetadas pelo processo cariioso (TOLEDANO et al., 2010; BOUSHELL et al., 2011).

A saliva contém diversas MMPs, incluindo colagenases (MMP-8) e gelatinases (MMP-2 e MMP-9) derivadas tanto do fluido gengival como da secreção das glândulas salivares (BIRKEDAL-HANSEN 1993; INGMAN et al., 1994). Entretanto, as MMPs encontradas na saliva mais envolvidas com o processo das lesões de cárie parecem ser as gelatinases, com destaque para a MMP-9, que parece ser a principal gelatinase na saliva total (INGMAN et al., 1994; MAKELA et al., 1994; TJADERHANE et al., 1998; VAN STRIJP et al., 2003), e sua atividade pode ter um papel importante na degradação da matriz dentinária, junto à MMP-2, (NIU et al., 2011). A literatura também já correlacionou uma maior expressão das MMPs salivares em pacientes com lesões ativas de cárie, quando comparadas com pacientes com lesões inativas (NASCIMENTO et al., 2011), sendo muito possível que as MMPs salivares participem do processo de degradação da matriz de colágeno, desde que o complexo dentina-esmalte permita esta penetração molecular (TJADERHANE et al., 1998).

O tratamento da cárie dentária exige a interferência em vários fatores como a desorganização do biofilme (KIDD et al., 2010), mas considerando o potencial das MMPs para degradação da matriz orgânica dentinária, parece lógico que a inibição das MMPs salivares, quando associada a um controle do desafio cariogênico, ajudaria na intervenção da progressão da desmineralização dentinária. Ajudar a diminuir ou prevenir a destruição irreversível da matriz orgânica poderia permitir tratamentos não invasivos ou minimamente invasivos da lesão de cárie, por remineralização da dentina descalcificada, particularmente no tratamento das lesões de cárie radiculares (KIDD et al., 2010). Nesse contexto, uma estratégia interessante, seria a utilização de inibidores de MMPs salivares.

A literatura atual começa a mostrar um efeito inibidor de MMPs pelos fluoretos. Fluoreto de sódio (NaF), com conhecida ação remineralizadora e redutora de desmineralização nos tecidos dentários, (MARINHO, 2009; TUBERT-JEANNIN et al., 2011; CAREY, 2014; MAGUIRE et al., 2014), já foi demonstrado ser também inibidor de MMPs (MEI et al., 2012; KATO et al., 2014). Existem poucos estudos na literatura sobre a relação das MMPs com os fluoretos, além disto, não foi encontrada nenhuma revisão sistemática sobre a relação das MMPs com a cárie dental, até o presente. Assim, o objetivo do presente estudo foi revisar a literatura em relação à

presença das MMPs nas lesões de cárie, além de avaliar o comportamento relacionado à inibição de MMPs salivares pelo Tetrafluoreto de titânio (TiF_4), Fluoreto de zinco (ZnF_2) e Fluoreto de estanho (SnF_2), comparando-os com o NaF, nas MMPs salivares. A hipótese nula é a de que os fluoretos testados não tenham influência na inibição das MMPs salivares.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

- Estudar a relação entre as MMPs e a degradação da matriz orgânica dentinária e possíveis inibidores exógenos.

1.2.2 Objetivos específicos

- Revisar a literatura abordando as principais MMPs encontradas no tecido cariado dentário;

- Comparar a presença, localização e o nível de atividade das MMPs encontradas no tecido cariado dentário;

- Avaliar o efeito dos TiF_4 , SnF_2 , ZnF_2 , comparando com NaF com relação à inibição das atividades das MMP-2 e MMP-9 salivares humanas.

2 Revisão De Literatura

2.1 O processo da lesão de cárie

A cárie dentária é um processo dinâmico que ocorre na placa dental, na qual uma massa microbiana (biofilme) se deposita sobre a superfície dentária, o que resulta em uma perturbação do equilíbrio entre o dente e o biofilme adjacente. Ao longo do tempo, pode haver uma perda líquida de mineral, levando à dissolução dos tecidos dentários duros e conseqüentemente à uma lesão de cárie, a qual poderá ser vista clinicamente. A desmineralização do esmalte e dentina que pode ser vista como um reflexo dos eventos dinâmicos que ocorrem no biofilme, é chamada lesão de cárie dentária (KIDD, 2004).

O processo de desmineralização nos dentes, que ocorre várias vezes por dia é normalmente equilibrado pelas propriedades da saliva (capacidade tampão, fluxo salivar, conteúdo inorgânico) que permitem que a remineralização ocorra. No entanto, a lesão progride quando este equilíbrio é perdido e fatores patológicos predominam. Uma lesão de cárie pode ser iniciada no esmalte ou no cimento e eventualmente, progredir para a dentina (KIDD, 2004).

Quando a lesão de cárie ocorre, mesmo que inicialmente no esmalte, o complexo dentino-pulpar começa a responder dinamicamente, para proteger os tecidos pulparestas agressões, formando dentina esclerótica, através da calcificação dos túbulos ou promovendo formação de dentina reacional pelos odontoblastos, os quais rapidamente depositam este tecido. Em resposta a uma lesão ou a um estímulo leve, estas células regulam crescentemente sua função secretória com a finalidade de formar uma nova matriz extracelular sobre a qual, novo mineral pode ser cristalizado. Assim, uma dentina terciária é formada, para reparar o tecido parcialmente danificado. Este processo é totalmente dependente da população de células existente e assim, requer que os odontoblastos sobrevivam ao estímulo. Isto ocorre nos casos onde a lesão de cárie é tipicamente mais branda, e uma dentina reacionária é produzida. Este mecanismo não foi completamente elucidado, e é provável que o estímulo possa diretamente provocar a libertação de moléculas de sinalização a partir da dentina danificada, iniciando uma cascata de eventos que levam à secreção de um tecido novo (FERRACANE et al., 2010). Geralmente, quando a agressão é grande e de rápida duração, os odontoblastos

adjacentes morrem e são substituídos por células semelhantes à odontoblastos, as quais se originam de células indiferenciadas presentes na polpa. Estas células parecidas com odontoblastos produzem então dentina reparativa subjacente aos túbulos dentinários afetados. A camada inicial da dentina reparativa é muito irregular, amorfa e atubular (LEE, et al., 2006). Fatores de crescimento, como os da família do Fator de Crescimento Transformante-Beta (TGF- β), mostraram-se relacionados com a diferenciação destas células parecidas com odontoblastos (FERRACANE et al., 2010).

Lee et al., 2006 encontraram grande quantidade de colágeno tipo I, fosfoforina (PP) e sialoproteína dentinária (DSP) em dentes com lesões de cárie, o que mostra a síntese pelos odontoblastos tanto de colágeno, quanto destas duas proteínas não-colagenolíticas, adjacente à lesão de cárie dentinária, concluindo que a DSP assim como PP podem facilitar a rápida mineralização durante a formação de dentina reacionária ou reparativa. Alternativamente, a DSP pode agir como um ativador para as MMPs (Lee et al., 2006). Embora muitos estudos mostrem evidências histológicas, discutindo as reações de defesa do complexo dentino-pulpar, nosso entendimento sobre a progressão das lesões de cárie e seu efeito nas mudanças morfológicas e eventos moleculares adjacentes está ainda incompleto.

2.2 Metaloproteinases da Matriz Extracelular

As MMPs formam uma família de enzimas com identidade estrutural, porém geneticamente distintas, que degradam a matriz extracelular (MEC). Estas proteases constituem uma classe de endopeptidases, que degradam proteínas por clivagem das ligações peptídeas. As MMPs desempenham importante função na fisiologia e patologia dos tecidos. Nos processos normais, estas enzimas participam do remodelamento tecidual, da cicatrização de feridas, embriogênese, apoptose, reações de defesa imunológica do hospedeiro e reprodução. Elas também participam da patogênese de muitas doenças como emdiversas condições inflamatórias envolvendo injúria tecidual, doenças pulmonares, doenças de pele, doenças cardíacas, doenças oftálmicas, artrites, artroses, câncer (STERNLICHT; WERB, 2001; VISSE; NAGASE, 2003). Dentre os diferentes papéis atribuídos às MMPs no ambiente oral, estão vários eventos durante a odontogênese, além da

participação no desenvolvimento de processos patológicos, tais como as doenças periodontais, as doenças pulpares inflamatórias e as cáries (HANNAS et al., 2007).

As MMPs são principalmente sintetizadas na forma latente de zimógenos inativos (pró-MMPs) e requerem a ligação de um íon zinco ao seu sítio catalítico e a clivagem de um domínio pró-peptídeo para tornar-se cataliticamente competentes. A atividade das MMPs é controlada por mudanças no delicado equilíbrio entre a expressão e síntese destas enzimas e seus principais inibidores endógenos, os inibidores teciduais de metaloproteinases da matriz (TIMPs). A expressão destas enzimas é controlada pela ativação de pró-enzimas, e pela inibição da sua atividade pelos TIMPs. Muitas MMPs são ativadas fora das células por outras MMPs ativadas ou proteinases serinas (EGEBLAD; WERB, 2002). Esta família de enzimas é chamada MMPs pelo fato de serem dependentes de íons metálicos para sua atividade catalítica, além de possuírem habilidade de degradar proteínas estruturais da MEC. Esta habilidade é essencial para as células poderem interagir corretamente com o ambiente onde estão localizadas, e para os organismos multicelulares se desenvolverem e desempenharem suas funções (STERNLICHT; WERB, 2001).

Baseado na especificidade do substrato, similaridade de sequência e organização de domínio, as MMPs dos vertebrados podem ser divididas em grupos. Entre eles as colagenases, as gelatinases, as estromelinas, as matrilisinas, as tipo-membrana e outras MMPs. As colagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13) clivam especificamente o colágeno intersticial tipo I, II, III e outras moléculas da matriz extracelular. Já as MMP-2 e MMP-9 (gelatinases A e B, respectivamente), são capazes de degradar os fragmentos de colágeno degradados (gelatina). As estromelinas (MMP-3 e MMP-10) possuem especificidade pelo mesmo substrato, porém a MMP-3 tem uma maior ação proteolítica que a MMP-10. Elas degradam componentes da MEC, entretanto a MMP-3 também ativa algumas pró-MMPs. As matrilisinas (MMP-7 e MMP-26) degradam também componentes da MEC, e são caracterizadas por apresentarem um domínio de hemopexina. Existem seis MMPs tipo-membrana (TM-MMP) (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25). Algumas outras MMPs não são classificadas dentre as anteriormente citadas (MMP-11, MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-22, MMP-23 e MMP-28), e possuem funções distintas (VISSE e NAGASE, 2003).

2.3 Cárie e MMPs

Durante o processo da lesão de cárie, ocorre a desmineralização da parte inorgânica dos tecidos dentais, principalmente a hidroxiapatita, por ácidos produzidos pelas bactérias. Neste processo, após a parte mineral da dentina ser dissolvida, esta expõe a matriz orgânica deste tecido que continua a ser decomposto por enzimas bacterianas (FEATHERSTONE, 2008). No entanto, os microrganismos não são os únicos responsáveis pela degradação do colágeno (TJÄDERHANE et al., 1998). Estudos demonstram que as MMPs, enzimas provenientes do hospedeiro, desempenham um importante papel na progressão da cárie, destruindo a matriz orgânica da dentina (TJÄDERHANE et al., 1998; SULKALA et al., 2001; HANNAS et al., 2007). A contribuição das collagenases bacterianas na degradação da matriz orgânica dental, parece ser menos importante do que se pensava inicialmente (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006).

A proteína mais abundante na matriz orgânica da dentina é o colágeno tipo I, que é produzido na sua grande maioria, pelos odontoblastos. Estas células são capazes de produzir também o colágeno tipo III, embora este quase não apareça na dentina madura. A dentina também contém vários fatores de crescimento, dentre eles, o TGF- β , que parece ter importante papel na regulação da resposta do complexo dentino-pulpar à cárie. Ao invés de regular principalmente a atividade secretora odontoblástica, a principal ação do TGF- β parece ser a indução da diferenciação dos odontoblastos (TZIAFAS et al., 2000). Durante a dentinogênese, proteínas como o colágeno, são sintetizadas e secretadas pelos odontoblastos, e após a sua organização estrutural na camada da pré-dentina, a mineralização ocorre por deposição de cristais de hidroxiapatita. A dentinogênese e a mineralização são fenômenos complexos que requerem o controle de atividade enzimática extracelular. Muitas proteinases, pertencentes principalmente às MMPs, têm importante participação nestes processos (TJÄDERHANE et al., 2001).

As MMPs parecem ter um grande papel na modulação da matriz dentinária, antes e durante a progressão da lesão de cárie. Embora o mecanismo relacionado à expressão das MMPs não esteja totalmente claro, elas participam da organização da matriz orgânica da dentina, antes da mineralização. Os efeitos diferenciais de TGF- β na expressão do RNA mensageiro (mRNA) da MMP e a síntese de proteínas, indicam que os fatores de crescimento podem ter um papel importante na maturação

da matriz através da regulação das MMPs sintetizadas nos odontoblastos. Além disto, as MMPs participam da organização das fibras de colágeno na camada da pré-dentina, degradando as fibrilas que não vão ser incorporadas na matriz orgânica. As metaloproteinases também podem ser necessárias para desnaturar o colágeno tipo III, a partir da pré-dentina. Este colágeno é um componente abundante nas matrizes de tecidos moles, mas não é normalmente observado em osso ou na dentina, e sua remoção pode ser essencial para a mineralização adequada. Naturalmente, outras proteínas presentes na pré-dentina necessitam ser removidas, e as MMPs podem estar envolvidas nestes processos também (TJÄDERHANE et al., 2001).

Contudo o TGF- β não pode induzir a formação da dentina com uma regulação ascendente da síntese de colágeno, por si só. Esta afirmação suporta a hipótese de que a função principal de TGF- β no complexo dentino-pulpar pode ser a indução da diferenciação dos odontoblastos de reposição (TZIAFAS et al., 2000). No entanto, estes fatores de crescimento podem interferir na regulação crescente da formação de dentina por odontoblastos maduros, indiretamente, interferindo na expressão das MMPs nos odontoblastos. Isso por sua vez, pode resultar na formação acelerada de dentina mineralizada, uma vez que a mineralização pode ocorrer antes que a organização da matriz esteja completa. Em situações extremas, como nas lesões de cáries, a organização irregular da matriz, pode resultar em formação de dentina reparadora (TJÄDERHANE et al., 2001).

AS MMPs nas lesões de cárie, quer derivadas da placa dental (SORSA et al., 1995), da saliva ou da própria dentina, podem ser ativadas por proteinases bacterianas. Durante a atividade da lesão de cárie, a liberação de ácidos pelas bactérias, rapidamente diminui o pH, e neste ambiente ácido, as pró-MMPs do hospedeiro derivadas de ambas dentina e saliva, podem ser ativadas. As MMPs, embora ativadas, não podem degradar a matriz orgânica da dentina em pH ácido. No entanto, no processo de cárie, a queda do pH é seguido por neutralização deste, devido aos sistemas de tampão salivares. Por conseguinte, um aumento momentâneo do pH na dentina desmineralizada, permite que as MMPs pH-ativadas degradem a matriz orgânica (TJÄDERHANE et al., 1998).

As evidências das atividades colagenolíticas ou gelatinolíticas em matrizes de colágeno parcialmente desmineralizadas são prova da existência de MMPs na dentina humana. De acordo com a literatura, a dentina humana contém a MMP-2

(MARTIN DE LAS HERAS et al., 2000; BOUSHELL et al., 2008), a MMP-8 (SULKALA et al., 2007), a MMP-9 (MAZZONI et al., 2007, 2009) e a MMP-3 (BOUKPESSI et al., 2008). Embora a MMP-8 tenha sido descrita como a principal MMP na dentina humana, ela pode estar principalmente envolvida na organização da matriz orgânica, antes da mineralização da dentina. Estudos mostram que a gelatinase A (MMP-2) parece estar incorporada e mais fortemente ligada à matriz de dentina mineralizada (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; NIU et al., 2011) e desmineralizada (BOUSHELL et al., 2011). Além disto, a MMP-9 é a principal MMP encontrada na saliva total (INGMAN et al., 1994; TJADERHANE et al., 1998; VAN STRIJP et al., 2003), e sua atividade pode ter um papel importante na degradação da matriz dentinária, junto à MMP-2, só que em uma menor expressão (NIU et al., 2011).

Nascimento e colaboradores(2011) encontraram uma maior expressão das MMPs salivares em pacientes com lesões ativas de cárie, quando comparadas com as de pacientes com lesões crônicas, além de observarem também um leve aumento das MMPs salivares com o aumento da profundidade das lesões, concluindo que possa ser muito possível que as MMPs salivares participem do processo de degradação da matriz de colágeno, desde que o complexo dentina-esmalte permita esta penetração molecular (TJADERHANE et al., 1998).

A MMP-2 parece ser a principal MMP presente na matriz dentinária (MARTIN DE LAS HERAS et al., 2000; MAZZONI et al., 2007; BOUSHELL et al., 2008; TOLEDANO et al., 2010). Esta MMP está presente e fortemente concentrada nos odontoblastos, região de dentina mais profunda, próxima ao limite dentino-pulpar e também na junção amelo-dentinária. Enquanto a MMP-9 está também presente, porém em proporções bem menores nos odontoblastos e pré-dentina, com muito pouca expressão na região da dentina média e superficial (NIU et al., 2011).

As MMPs são secretadas pelos odontoblastos em resposta às agressões das lesões de cárie. Expressão da MMP-2 foi encontrada em ensaio imunohistoquímico em grande quantidade nos túbulos dentinários, na matriz de dentina afetada pela cárie, esta dentina é menos desorganizada e passível de remineralização. Isto indica o potencial envolvimento desta MMP nos mecanismos de defesa, os quais podem resultar em calcificação das regiões afetadas pelo processo cariioso (BOUSHELL et al., 2011). Adicionalmente, Toledano e colaboradores(2010) encontraram um aumento da expressão da MMP-2 na dentina cariada, quando avaliadas ambas,

dentina infectada (necrótica, superficial, não passível de remineralização) e dentina afetada, comparadas à dentina hígida, saudável. Estes autores também encontraram uma maior expressão desta gelatinase, em zonas de dentina infectada por cárie, que em zonas de dentina afetada.

A MEC dos tecidos mineralizados contém três grupos de componentes. Dentre estes, as macromoléculas da matriz estruturais, como o colágeno, determinam a forma e a estrutura do componente mineralizado; as proteínas da matriz não colagenosas, as quais regulam o local de deposição inicial dos cristais e o tipo de cristal mineral depositado, das quais as fosfoproteínas são o grupo dominante no tecido ósseo e na dentina; e finalmente, as proteinases e outras enzimas modificadoras, que têm a capacidade de degradar ou modificar as proteínas da matriz durante o processo de mineralização. A DSP, uma proteína não-colagenosa importante, influencia o local de formação mineral do cristal. Charadram e colaboradores (2012) observaram em seu estudo uma grande densidade de DSP nas fibrilas de colágeno dentinário, o que corresponde em um aumento da regulação da sialofosfoproteína dentinária (DSPP) durante a dentinogênese reacionária. Acréscimo da deposição de DSP sugere um processo modificado de cristalização, com locais de nucleação de hidroxiapatita, em dentinogênese reacionária. As DSPPs podem ser clivadas pela MMP-2, liberando assim, a DSP a partir das moléculas maiores. Tem sido relatado que a MMP-2 tem a capacidade de regular a biodisponibilidade e bioatividade de TGF- β . MMP-2 é sintetizada e liberada por osteoblastos e odontoblastos humanos como uma inativa pró-proteína. Uma maior densidade de DSP detectada em dentina reacionária foi compatível com a expressão aumentada e atividade da MMP-2. O que ocorre na dentinogênese reacionária, é que a MMP-2 facilita a liberação de DSP a partir de DSPP. À medida que o pH na dentina reacionária era demasiadamente alto para a ativação da MMP-2, é provável que a ativação desta MMP tenha sido mediada pela MMP Tipo-membrana-1 (MT1-MMP), que mostrou estar crescentemente regulada em resposta à cárie (CHARADRAM et al., 2012). Este prévio estudo definiu parâmetros essenciais em relação à resposta da polpa dentária para a invasão microbiana na dentina. Os resultados deste recente estudo indicam uma adaptativa e consistente mudança na atividade odontoblástica, levando à formação de uma matriz calcificada modificada, que efetivamente impede a migração de bactérias, ao longo dos túbulos dentinários, protegendo assim a polpa dentária da invasão microbiana. A

uniformidade desta resposta apesar da variação inevitável do estágio da lesão e a etiologia microbiana, sugere fortemente a ativação de um programa alternativo para o estabelecimento de uma matriz calcificada. Uma investigação mais aprofundada, *in vivo* é necessária, levando a melhores protocolos terapêuticos para as lesões de cárie avançadas. Inclusive no que se refere ao papel terapêutico dos materiais forradores, em relação ao comportamento biológico do complexo dentino-pulpar, durante a desmineralização que ocorre na lesão de cárie dentária.

3 Cronograma das atividades

2012												
ATIVIDADES	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
Revisão Bibliográfica	X	X	X	x	X	X	X	X	X	X	X	X
Seleção de Pacientes			X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Coleta das Amostras				X	X	X		X	X	X	X	
Análise das Amostras												
Análise Estatística												
Resultados Parciais												
Redação de Artigo								X	X	X	X	X
Envio para Publicação												

2013												
ATIVIDADES	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Seleção de Pacientes			X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Coleta das Amostras			X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Análise das Amostras	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Análise Estatística						X	X	X	X	X	X	X
Resultados Parciais						X	X	X	X	X	X	X
Redação de Artigo	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Envio para Publicação												

2014												
ATIVIDADES	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
Revisão Bibliográfica												
Seleção de Pacientes												
Coleta das Amostras												
Análise das Amostras												
Análise Estatística	X	X	X	X	X	X						
Resultados parciais	X	X	X	X	X	X						
Redação de Artigo	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Envio para Publicação				X	X	X	X	X	X			

4 Relatório do trabalho de campo

Algumas modificações importantes necessitaram ser realizadas neste trabalho.

O ensaio clínico proposto, não pôde ser finalizado, devido a dificuldades técnicas para executar sua segunda parte, a análise dos tecidos cariados coletados, para a verificação da presença e atividade das MMP-2 e -9, antes e após o selamento de lesões profundas de cárie. A metodologia proposta era o ensaio por zimografia, teste com custo relativamente baixo. Porém na segunda fase do ensaio clínico, houve dificuldade na coleta do tecido remanescente, devido às modificadas características deste, nesta fase (remineralização do tecido dentinário). Assim sendo, após diversos pilotos, não foi possível otimizar a zimografia devido a pequena quantidade de amostra de dentina obtida. Outras metodologias foram pensadas, inclusive sugeridas pela banca na qualificação deste trabalho, como o teste de ELISA, o qual pela menor sensibilidade, poderia detectar níveis proteicos bem baixos ou imunistoquímica, mas estas metodologias são de custo elevado, o que tornou inviável no momento, a finalização deste trabalho.

O estudo com a saliva dos pacientes selecionados no ensaio clínico, antes e após tratamento dentário completo, também se tornou difícil, devido aos pacientes participantes derivarem das diversas clínicas de graduação e de terem necessidade de tratamentos complexos. Muitas vezes havia a necessidade de tratamento cirúrgico, endodôntico, periodontal e ainda tratamento protético e devido às considerações éticas, havia a necessidade do tratamento integral aos participantes, ser assegurado, o que inviabilizou também este trabalho.

A revisão narrativa em relação às MMPs e à cárie dental, teve algumas pequenas modificações na sua metodologia, entretanto, seguindo a mesma linha proposta, optou-se pela revisão sistemática.

Foi inserido um novo trabalho, ainda dentro da pesquisa sobre as MMPs e sua relação com a cárie dental. O ensaio por zimografia foi executado com saliva humana de doadores saudáveis, para acessar o nível de inibição da expressão de atividade das MMP-2 e -9, pelas soluções de três fluoretos (ZnF_2 , SnF_2 e TiF_4), em comparação com o tradicional NaF.

5 Capítulo 1

O papel das metaloproteinases na dentina cariada humana: Revisão Sistemática

Resumo

Enzimas provenientes do hospedeiro, como as metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs), segundo a literatura, são as principais responsáveis pela degradação do colágeno dentinário nas lesões de cárie dental humana. O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão sistemática de estudos que avaliaram a presença, localização, ou o nível de atividade das principais MMPs encontradas no tecido cariado humano. Como critérios de inclusão, foram avaliados estudos *in vitro*, *in situ* e *in vivo*; estudos envolvendo cárie dental em dentes humanos (dentinogênese reparativa ou reacional); estudos envolvendo somente MMPs endógenas humanas ou estudos contendo metodologias que tenham feito avaliação proteica de MMPs e que tenham investigado a presença, localização ou nível de atividade das metaloproteinases. Critérios de exclusão, estudos em modelo animal; que avaliaram qualquer inibidor de MMPs; com avaliação de qualquer método de tratamento de cárie; que investigaram somente o perfil de expressão genética de MMPs, sem sua avaliação proteica ou que avaliaram somente os Inibidores Teciduais (TIMPs), além daqueles trabalhos que não especificassem o tipo de MMP estudada. De 411 artigos elegíveis, 14 foram selecionados para a leitura completa e 08 foram incluídos nesta revisão sistemática. Os seguintes dados foram coletados: tipo de dentina, quais MMPs envolvidas, metodologia utilizada, a adoção de alguma classificação para determinar o tipo de tecido cariado estudado, e principais resultados relacionados. A partir desta análise, pode-se concluir que a literatura possui poucos dados, além de heterogeneidade a respeito do tema. Contudo, a MMP-2 parece ser, seguida da MMP-9, dentre as metaloproteinases estudadas, existente em maior quantidade no tecido dentinário cariado, localizada principalmente nos túbulos dentinários da dentina afetada (interna), com proximidade com o tecido pulpar. A MMP-20 parece estar mais presente no tecido pulpar e proximidades, e a MMP-8 mostrou-se presente na dentina cariada mais externa ou após selamento dentário *in vivo*.

Palavras-chave: MMPs; cárie dentária; dentina afetada; dentina infectada

5.1 Introdução

O processo cárie ocorre inicialmente devido a um desequilíbrio no biofilme, uma comunidade de microorganismos de filosofia coletiva, que responde ao ambiente, no sítio. O resultado desta interação poderá levar a uma perda de minerais, ocasionando uma lesão de cárie (KIDD et al., 2010).

Durante o processo da lesão de cárie, ocorre a desmineralização da parte inorgânica dos tecidos dentais, principalmente a hidroxiapatita, por ácidos produzidos pelas bactérias. Após a parte mineral da dentina ser dissolvida, a matriz orgânica deste tecido é exposta e continua a ser decomposta por enzimas bacterianas (FEATHERSTONE, 2008). No entanto, os microorganismos não são os únicos responsáveis pela degradação do colágeno, (TJÄDERHANE et al., 1998) e colagenases que não de origem bacteriana podem ter participação na decomposição da matriz orgânica dental (TJÄDERHANE et al., 1998). Enzimas chamadas metaloproteinases da matriz (MMPs), derivadas do próprio hospedeiro, poderiam desempenhar um papel de destaque na progressão da lesão de cárie, destruindo a matriz orgânica dentinária (TJÄDERHANE et al., 1998; SULKALA et al., 2001).

As MMPs formam uma família de enzimas, derivadas do próprio hospedeiro, com identidade estrutural, porém geneticamente distintas, as quais possuem a habilidade de degradar a matriz extracelular (MEC). Estas enzimas desempenham importante função na fisiologia e patologia dos tecidos. Dentre os diferentes papéis atribuídos às MMPs no ambiente oral, estão vários eventos durante a odontogênese, além da participação no desenvolvimento de processos patológicos, tais como as doenças periodontais, as doenças pulpares inflamatórias e as lesões de cárie (HANNAS et al., 2007).

As MMPs nas lesões de cárie, quer derivadas da placa dental (SORSA et al., 1995), da saliva ou da própria dentina (TJÄDERHANE et al., 1998; SULKALA et al., 2001), podem ser ativadas por proteinases bacterianas. Durante o desenvolvimento da lesão de cárie, a liberação de ácidos bacterianos, rapidamente faz com que o pH seja diminuído e neste ambiente ácido, as pró-MMPs (inativas) do hospedeiro, podem ser ativadas. As MMPs, embora ativadas, não podem degradar a matriz orgânica da dentina em ambiente ácido. No entanto, neste processo, a queda do pH é seguido por neutralização deste, devido aos sistemas de tampão salivares. Por

consequente, um aumento momentâneo do pH, na dentina desmineralizada, permite que as MMPs pH-ativadas degradem a matriz orgânica (TJÄDERHANE et al., 1998).

Vários trabalhos já demonstraram a atividade das principais enzimas proteolíticas endógenas do tecido dentinário, incluindo as metaloproteinases da matriz MMP-2 (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000), MMP-3 (BOUKPESSI et al., 2008), MMP-9 (MAZZONI et al., 2007) e MMP-8 (SULKALA et al., 2007) e do esmalte, a MMP-20 (LU et al., 2008). Estas MMPs se mostram necessárias para a formação da dentina e do esmalte normais. Uma vez que ocorre a mineralização da matriz no dente neoformado, algumas destas enzimas permanecem fossilizadas na matriz calcificada, quer sob formas ativas ou pró-enzimas (PALOSAARI et al., 2003; SMITH et al., 2012). Com isto, poderia se supor que o processo de desmineralização cariogênico não só re-expõe estas enzimas, mas também poderia induzir a sua ativação.

Durante a dentinogênese, proteínas como o colágeno são sintetizadas e secretadas pelos odontoblastos e após a sua organização estrutural, ocorre na camada da pré-dentina, a mineralização por deposição de cristais de hidroxiapatita (SMITH et al., 2012). A dentinogênese e a mineralização são fenômenos complexos que requerem o controle de atividade enzimática extracelular. Muitas proteinases pertencentes principalmente à família das MMPs tem uma importante participação nestes processos (HANNAS et al., 2007). Em função disso, estas enzimas parecem ter um grande papel na modulação da matriz dentinária, antes e durante a progressão da cárie (TJÄDERHANE et al., 1998).

Quando a lesão de cárie ocorre, mesmo que inicialmente no esmalte, o complexo dentino-pulpar começa a responder dinamicamente, para proteger os tecidos pulparestas agressões, formando dentina esclerótica, através da calcificação dos túbulos ou promovendo formação de dentina reparativa ou reacionária. Em resposta a uma lesão ou a um estímulo leve, os odontoblastos regulam crescentemente sua função secretória com a finalidade de formar nova matriz extracelular sobre a qual, novo mineral pode ser cristalizado. Assim, uma dentina terciária é formada, para reparar o tecido parcialmente danificado. Este processo é totalmente dependente da população de células existente e assim, requer que os odontoblastos sobrevivam ao estímulo. Isto ocorre nos casos onde a lesão de cárie é tipicamente mais branda, e uma dentina reacionária é produzida (SMITH et al., 2012). Geralmente, quando a agressão é grande e de rápida duração,

os odontoblastos adjacentes morrem e são substituídos por células semelhantes aos odontoblastos, as quais se originam de células indiferenciadas presentes na polpa. Estas células parecidas com odontoblastos produzem então dentina reparativa subjacente aos túbulos dentinários afetados. A camada inicial da dentina reparativa é muito irregular, amorfa e atubular (LEE et al., 2006).

Os mecanismos da dentinogênese reparativa ou reacional não foram completamente elucidados, e é provável que o estímulo possa diretamente provocar a libertação de moléculas de sinalização a partir da dentina danificada, iniciando uma cascata de eventos que levam à secreção de um tecido novo (SMITH et al., 2012). Embora existam evidências histológicas e moleculares, discutindo as reações de defesa do complexo dentino-pulpar, durante a lesão de cárie (LEE et al., 2006), o entendimento sobre a presença ou atividade das MMPs durante as mudanças morfológicas e eventos moleculares adjacentes, não está ainda bem esclarecido. Por estas razões, este trabalho objetiva revisar a literatura a respeito da presença, localização ou atividade das principais Metaloproteinases da Matriz (MMPs) encontradas no tecido cariado humano, abordando os temas relevantes, sobre o papel local das MMPs em relação a este tecido.

5.2 Materiais e Métodos

Para esta revisão foi realizada uma busca na base de dados científicos MEDLINE/Pubmed, para pesquisar artigos apropriados que satisfizessem os objetivos do estudo. A busca se deu em estudos completos em idioma inglês, publicados até novembro de 2014. Não houve restrição quanto à data de publicação. A estratégia de pesquisa foi estruturada para incluir todos os artigos publicados que avaliaram a presença, localização ou atividade das principais MMPs na dentina cariada humana. As questões desta pesquisa foram: Quais as principais MMPs relacionadas com as lesões de cárie? Qual é a localização e o nível de atividade das Metaloproteinases da Matriz na dentina cariada humana?

Foram utilizados os seguintes termos de pesquisa detalhados:

(((((metaloproteinases) OR matrix metalloproteinases) OR metalloproteinases, matrix) OR MMP)) AND ((((((dental caries) OR dental decay) OR caries, dental) OR decay, dental) OR carious dentin) OR carious dentin) OR dentin, carious) OR dentin, carious)) OR reparative dentinogenesis OR reactionary dentinogenesis) OR tertiary dentinogenesis OR caries-affect dentin OR caries-infected dentin

Critérios de elegibilidade:

Artigos em idioma inglês, com as características presentes abaixo, seriam considerados:

- estudos *in vitro*, *in situ* e *in vivo*;
- estudos envolvendo cárie dental em dentes humanos (dentinogênese reparativa ou reacional);
- estudos envolvendo MMPs endógenas (provenientes do tecido cariado humano);
- pesquisa de artigos publicados até novembro de 2014;
- estudos contendo avaliação proteica de MMPs e que tenham investigado a presença, localização ou atividade das metaloproteinases.

Desfecho: Agrupar informações referentes à presença, nível de atividade e localização das principais MMPs encontradas na cárie dentinária humana.

Seriam excluídos os trabalhos que não preencherem os critérios acima, além de trabalhos:

- em modelo animal;
- com dentes de origem animal;
- que estudaram qualquer inibidor de MMPs ou Inibidores Teciduais (TIMPs);
- com avaliação de métodos de tratamento da lesão de cárie;
- que investigaram somente o perfil de expressão genética de MMPs, sem sua avaliação proteica;
- que avaliaram somente MMPs no tecido dentário sadio;
- que não especificaram o tipo de MMP estudada.

Além de metodologias que não estejam contempladas nesta revisão.

Seleção dos artigos

Dois revisores (E.N.T. e A.R.S.) pesquisaram de forma independente os títulos e os resumos dos trabalhos elegíveis. Sempre que alguma informação relevante para os critérios de elegibilidade não estava disponível no resumo ou se o próprio resumo não estava disponível, o artigo foi selecionado para a leitura na íntegra. Os artigos que preencheram os critérios de elegibilidade foram incluídos no estudo. Qualquer discordância entre os dois revisores foi resolvida após discussão adicional ou após o julgamento por um terceiro revisor (A.E.). Os trabalhos que preencheram os critérios de inclusão foram analisados (Figura 1).

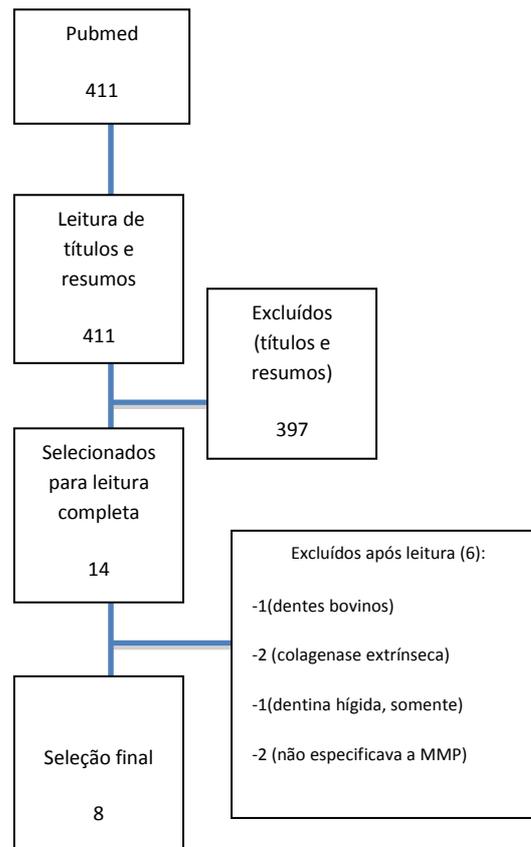


Figura 1- Fluxograma da revisão.

5.3 Resultados

Em razão da natureza dos estudos selecionados, de acordo com os critérios de inclusão/exclusão, sua metodologia e variáveis de resultados, os dados reunidos se mostraram heterogêneos. Em função disto, foi utilizada uma forma de apresentação descritiva a respeito da diferença entre os resultados.

A pesquisa resultou em 411 artigos, como mostrado na figura 1. A triagem através da leitura de títulos e resumos, levou à exclusão de 397 artigos. Dos 14 artigos incluídos para leitura na íntegra, 06 não preenchiam os critérios de inclusão e foram excluídos (2 artigos estudaram colagenases extrínsecas (MAKINEM, 1971; KAWASAK, 1997), 1 artigo avaliou somente MMPs em dentina normal (não-cariada) (NIU et al., 2011), 1 artigo usou dentes bovinos (VAN STRIJP 2003) e outros 2 artigos não especificaram as MMPs estudadas (DAYAN et al., 1983; NASCIMENTO et al., 2011). Totalizando 8 estudos incluídos nesta revisão, os quais foram descritos na tabela 1.

Dentre as principais MMPs endógenas, já estudadas no tecido dentinário, esta revisão encontrou apenas as MMP-2, -8, -9 e -20, de acordo com os critérios de inclusão/exclusão desta pesquisa, no tecido dentinário cariado.

Este trabalho reuniu informações em relação à presença, localização e/ou a atividade catalítica das enzimas estudadas. As metodologias encontradas foram diversas, além disto, foi observada uma grande heterogeneidade com relação às formas de classificação do tecido cariado. Houve trabalhos que especificaram somente a atividade da lesão (cárie ativa ou inativa) (TJADERHANE et al., 1998; SULKALA et al., 2002). Um trabalho mostrou classificação do tipo de dentina cariada de acordo com critérios de coloração e dureza, segundo Bjørndale colaboradores (1997) (CHIBINSKI et al., 2014), outros, classificaram o tecido cariado, dividindo-o em regiões mais externas e mais internas, ou dentina cariada afetada e dentina cariada infectada, de acordo com Fusayama (1979) (SHIMADA et al., 2009; TOLEDANO et al., 2010; BOUSHELL et al., 2011; CHARADRAM et al., 2012; VIDAL et al., 2014).

Foram incluídos 06 trabalhos que analisaram a dentina cariada coronária e 02 trabalhos que investigaram ambas, dentina cariada coronária e radicular (Tabela 1).

Na dentina cariada coronária, independente do tipo de lesão de cárie, foram encontradas as MMPs -2, -8, -9, e -20, enquanto somente a MMP-2 e -20 foram estudadas e se mostraram presentes na dentina cariada radicular, dentre os estudos incluídos na presente revisão.

Os principais resultados encontrados foram reunidos na tabela 1 e 2.

Tabela 1 Estudos encontrados, de acordo com critérios de inclusão/exclusão

Estudos	Dentina	MMP	Dentes Cariados	Dentes hígidos	Idade doador	Tipo de estudo	Objetivo	Metodologia	Principais resultados	Observações
Tjaderhane et al., 1998	Coronária	MMP-2, -8 e -9	(n=37)	--	--	In vitro	Investigar a presença e atividade de MMPs em lesões de cárie dentinária humana e em saliva	Zimografia, <i>Western Blot</i> , Microscopia Eletrônica de Varredura, por emissão de campo (FE-SEM), Ensaio Funcionalde atividades (gelatinolíticos/colagenolíticos)	Todas as MMPs investigadas estavam presentes nas amostras de dentina cariada. Foi confirmada também a atividade das MMP-2 e -9 derivadas de dentina cariada e saliva. E quando houve uma ativação ácida, a atividade das MMPs, aumentou. Todas as MMPs foram ativadas em pH ácido.	Amostras de tecido dentinário cariado (cárie ativa) coletadas de dentes extraídos Desfecho: presença e atividade
Sulkala et al., 2002	Coronária e radicular	MMP-20	(n=16)	(n=12)	(20 a 27 anos)	In vitro	Estudar a presença e localização da MMP-20, em dentes cariados e hígidos, no fluido dentinário e tecido pulpar	Imunoistoquímica (I) e <i>Western Blotting</i> (WB)	Foi encontrada a MMP-20 no tecido dentinário sadio, odontoblastos e tecido pulpar (WB). MMP-20 foi encontrada no nos odontoblastos do tecido sadio e do tecido dentinário cariado, nos túbulos dentinários dilatados e tecido pulpar, mas com mais forte marcação imunoistoquímica em direção à dentina radicular (I). A principal fonte de MMP-20 no complexo dentino-pulpar são os odontoblastos, os quais podem secretar a MMP-20 no fluido dentinário.	Não especificou o tipo de dentina cariada (somente cárie ativa). Para WB, foi usado o fluido dentinário de 68 dentes . WB do tecido dentinário cariado foi negativo para a MMP-20. Desfecho: presença e localização dentina coronária e radicular.
Shimada et al., 2009	Coronária	MMP-2, -9, -8 e -20	(n=5)	--	(32 a 59 anos)	In vitro	Investigar o nível da expressão das MMPs na dentina hígida, comparando com a dentina cariada	Imunomarcacão (ouro) e FE-SEM	Presença de todas MMPs estudadas, em ambas as dentinas (cariada e hígida). Presença de MMP-2 não teve significativa diferença entre dentina cariada externa, interna e dentina hígida. Já as MMP-8 e -9 tiveram marcação diminuída significativamente na dentina cariada interna quando comparada com dentina hígida, mas aumentou novamente sua marcação na dentina cariada mais externa. A MMP-20 teve mais alta marcação na dentina hígida, mas diminuiu em direção a lesão externa, alcançando o mais baixo	Secções inteiras de dentes, congeladas, para evitar deslocamentos. Divisão: dentina externa (infectada por microorganismos) e dentina interna (perda mineral, mas sem infecção bacteriana) e dentina normal (pequena ou nenhuma desmineralização). Desfecho: presença e localização

Toledano et al., 2010	Coronária e radicular	MMP-2	(n=10)	--	(18 a 20 anos)	In vitro	Identificar a diferença entre a expressão de MMP-2 coronária e radicular, na dentina cariada e hígida	Tricômico de Massone e Imunofluorescência	MMP-2 estava presente em ambas coronal/radicular dentina cariada. Baixa intensidade da expressão de MMP-2 em dentina-afetada (menor que na dentina-infectada, mas muito mais alta que na dentina sadia). Padrão semelhante nas dentinas radicular e coronária.	Identificaram diferentes dentinas cariadas, conforme coloração. Dentinas afetada e infectada por cárie, e dentina hígida. Desfecho: presença e localização.
Boushell et al., 2011	Coronária	MMP-2	(n=10)	(n=6)	--	In vitro	Identificar e comparar MMP-2 e Sialoproteína óssea(BSP) em dentina saudável e afetada por cárie	Imunoistoquímica (I) e <i>Western Blot</i> (WB)	Dentes hígidos = MMP-2 - em toda dentina, com aumento na região interna, próximo aos processos odontoblásticos e região de junção amelo-dentinária (JAD); Dentes cariados = MMP-2 - região dentinária interna, semelhante à dentes hígidos, mas intensa detecção próximo à JAD, e significante aumento imunorreatividade de MMP-2 nos túbulos dentinários na dentina afetada por cárie. O nível de MMP-2 não aumentou com o aumento da severidade das cáries.	Desfecho: presença e localização.
Charadram et al., 2012	Coronal	MMP-2	(n=30)	(n=15)	(20 a 35 anos)	In vitro	Investigar a cascata responsável pela formação de dentina reacionária, focando na análise do colágeno e associação com proteínas não colagenosas (NCPs), com enzimas, envolvendo os odontoblastos na dentinogênese	Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH), Imunoistoquímica fluorescente, Microscopia eletrônica de Varredura, PCR-análise do tempo real, Ensaio Funcional de atividades para gelatinases (<i>EnzChek Gelatinase/Collagenas e Assay kit</i>)	Foi encontrado um aumento da densidade e distribuição de Sialoproteína dentinária (DSP) e da MMP-2 na dentina reacionária. Um aumento da regulação da MMP-2 (camada odontoblástica), com paralelo aumento da regulação do Inibidor tecidual-2 (TIMP-2) e da Metaloproteinase tipo membrana-1 (MT1-MMP) em resposta à cárie. MMP-2 estava ativa na dentina cariada.	Amostras de dentina reacionária (tecido dentinário cariado abrangendo 1/3 ou 2/3 de profundidade) (tecido dentinário separado e avaliado em 04 camadas = mais superficial, mais interna, afetada, e dentinalocalizada abaixo da lesão de cárie) Desfecho: presença, localização e atividade.

Chibinski et al., 2014	Coronária	MMP-2, -9, -8	(n=34)	--	(3 a 10 anos)	In vivo	reacionária. Identificar e quantificar a expressão de MMP-2,-8,-9, colágeno tipo I e sialoproteína óssea (BSP) em dentina cariada antes e após selamento dentário.	Imunoistoquímica	MMP-2 e -9 detectadas na dentina cariada antes e após selamento da cavidade, mais concentradas ao redor dos túbulos dentinários e pouco concentradas na matriz intertubular. Houve aumento da expressão de MMPs, colágeno tipo I e BSP, após selamento, mas diferenças estatísticas observadas somente para MMP-8 (concentrada em toda a matriz orgânica), colágeno tipo I e BSP.	Único estudo in vivo; dentes decíduos. Comparou tecido dentinário cariado com macia a média consistência (cárie aguda), antes e após selamento dentário com lonômero de vidro. Sem controle positivo (ética). Desfecho: presença e localização.
Vidal et al., 2014	Coronária	MMP-2 e -9	(n=5)	(n=5)	(25 a 38 anos)	In vitro	Comparar a quantidade de MMPs (além de outras enzimas) na dentina hígida com a dentina afetada. E a interação destas proteases com o colágeno em ambos os tecidos.	Autofluorescência	O colágeno molecularmente bem estruturado foi perdido na dentina afetada por cárie. MMPs estavam mais intensamente presentes na câmara pulpar, pré-dentina e/ou na dentina interna. Todas as proteases testadas estavam marcadamente mais fortes na dentina afetada que na dentina hígida. MMP-2 e -9 estavam presentes 05 e 15 vezes mais fortes, respectivamente, na dentina afetada por cárie que na dentina intacta.	Dentes tinham lesão cavitada não maior que 1/3 da superfície oclusal (dentina afetada por cárie) Desfecho: presença e localização.

Tabela 2 Distribuição das MMPs estudadas, de acordo com sua presença, localização e atividade.

	MMP-2	MMP-9	MMP-8	MMP-20
Presença na dentina hígida	(Shimada 2009; Boushell 2011; Vidal 2014)	(Shimada 2009; Vidal 2014)	(Shimada 2009)	(Sulkala 2002; Shimada 2009)
Localização na dentina hígida	- aumento da sua expressão na região interna, próximo aos processos odontoblásticos (PO) e também região de junção amelodentinária (JAD) (Boushell 2011)			-Dentina hígida- marcação nos odontoblastos e tecido pulpar (Sulkala 2002)
Presença na dentina cariada	(Tjaderhane 1998; Shimada 2009; Chibinsk 2014)	(Tjaderhane 1998; Shimada 2009; Chibinsk 2014)	(Tjaderhane 1998; Shimada 2009; Chibinsk 2014)	- maior marcação próxima aos túbulos dentinários dilatados e tecido pulpar (Sulkala 2002) -maior marcação na dentina região interna (Shimada 2009)
Atividade na dentina cariada	-Ativa na dentina cariada (Tjaderhane 1998; Charadram 2012)	-Ativa na dentina cariada (Tjaderhane 1998)		
Presença na dentina cariada coronária	(Tjaderhane 1998; Shimada 2009; Toledano 2010; Boushell 2011; Charadram 2012; Chibinski 2014; Vidal 2014)	(Tjaderhane 1998; Shimada 2009; Vidal 2014)	(Tjaderhane 1998; Shimada 2009; Chibinsk 2014)	(Sulkala 2002; Shimada 2009)
Presença na dentina cariada radicular	(Toledano 2010)			(Sulkala 2002)
Comparação entre dentina cariada externa, interna e dentina hígida	-Presença não teve diferença significativa entre dentina cariada externa, interna ou na dentina hígida (Shimada 2009) -Presente, com intensa detecção na dentina cariada, também próximo à JAD (Boushell 2011) -na dentina cariada interna, presença semelhante à dentina hígida (Boushell 2011) -presente no tecido cariado mais intensamente na câmara pulpar; predentina e/ou dentina interna (Vidal 2014)	-Dentina cariada interna-presença significativamente menor, comparada com dentina hígida; porém aumentada marcação novamente na dentina cariada externa (Shimada 2009) -presente no tecido cariado mais intensamente na câmara pulpar; predentina e/ou dentina interna (Vidal 2014)	-Dentina cariada interna-presença significativamente menor, comparada com dentina hígida; porém aumentou sua marcação novamente na dentina cariada externa (Shimada 2009)	-Dentina hígida- alta marcação, mas diminuiu em direção a lesão externa, tendo menor presença na dentina cariada externa (Shimada 2009)
Comparação entre dentina cariada afetada, dentina cariada infectada e dentina hígida	-baixa quantidade na dentina afetada, em relação à dentina infectada. (Toledano 2010) -na dentina afetada, sua presença foi muito maior que na dentina hígida (Toledano 2010; Vidal 2014) -Significante aumento junto aos túbulos dentinários na dentina afetada por cárie (Boushell 2011)			
Severidade da lesão	-Seu nível não aumentou com o aumento da severidade da lesão (Boushell 2011)			
Dentina reacionária	-aumento da densidade e distribuição na dentina reacionária (Charadram 2012)			
Presença dentina cariada antes e após selamento dentário	-detectada na dentina cariada coronária, antes e após selamento dentário in vivo, mais concentrada ao redor túbulos dentinários e pouco concentradas na matriz intertubular, porém sem diferenças estatísticas (Chibinski 2014)	-detectada na dentina cariada coronária, antes e após selamento dentário in vivo, mais concentrada ao redor túbulos dentinários e pouco concentradas na matriz intertubular, porém sem diferenças estatísticas (Chibinski 2014)	-detectada na dentina cariada coronária, antes e após selamento dentário in vivo, com aumento significativo em toda a matriz orgânica, após selamento (Chibinski 2014)	

5.4 Discussão

Esta revisão revelou uma grande heterogeneidade nas metodologias empregadas para os estudos, tanto da presença das MMPs no tecido cariado dentinário, quanto para a comprovação de que além de presentes, estas MMPs estavam ativas neste tecido. Assim sendo, não foi possível responder de forma direta as questões idealizadas, sendo evidente que os estudos adotaram diferentes metodologias e diferentes formas de classificação do tecido dentinário cariado, para acessar da melhor forma o seu objetivo. Além disto, com a finalidade de reunir da melhor forma os dados elencados, as nomenclaturas encontradas nos estudos: “dentina cariada afetada” e “dentina cariada infectada”, foram agrupadas com “dentina cariada interna” e “dentina cariada externa”, respectivamente (FUSAYAMA, 1979).

Dois dos estudos excluídos, mostraram atividade enzimática em tecido dentinário desmineralizado (DAYAN et al., 1983; NASCIMENTO et al., 2011), porém o mais recente apenas mostrou presença e atividade de MMPs em lesões de cárie, mas não identificou quais as MMPs poderiam estar presentes. Já Dayan e colaboradores (1983), identificaram claramente a presença e atividade de uma colagenase na matriz dentinária desmineralizada, mas também não a identificaram como uma metaloproteinase.

Toledano e colaboradores (2010) encontraram padrões semelhantes para a MMP-2 radicular e coronária. Entretanto Sulkala e colaboradores (2002) encontraram a MMP-20, nos odontoblastos dos dentes sadios e cariados, mas com mais forte marcação imunoistoquímica em direção à dentina radicular. Estes autores relatam que a dentinogênese primária ocorre da coroa em direção apical, e que os dentes utilizados no estudo, eram terceiros molares de pacientes jovens (20 a 27 anos), ou seja, a dentinogênese primária poderia ainda estar ocorrendo na área de dentina radicular. O resultado deste estudo sugere que a produção dos odontoblastos pode estar alterada de acordo com o estágio de diferenciação, e assim o estágio da dentinogênese primária dos dentes utilizados nos estudos, pode refletir o nível da síntese enzimática.

Sulkala e colaboradores (2002) encontraram a MMP-20, na região de pré-dentina, e nos túbulos dilatados dos tecidos cariados, com imunoistoquímica. Com *Western Blotting* (WB), não foi possível detectar esta MMP no tecido cariado, o que pode ter ocorrido devido à este ensaio poder necessitar de uma quantidade proteica maior. Além disto, os autores presumem que as enzimas estudadas possam ter sido ativadas e fragmentadas em formas não-detectáveis por WB durante eventos prévios, na progressão das cáries, ou durante o seu processamento, ocorrendo a presença desta MMP na

dentina mineralizada, porém parte desta metaloproteinase pode ter sido removida ou perdida durante a desmineralização (SULKALA et al., 2002). A diminuída presença da MMP-20 no tecido cariado, comprovada nos dois estudos que foram reunidos nesta revisão (SULKALA et al., 2002; SHIMADA et al., 2009), pode ter ocorrido pelo fato de que esta MMP possivelmente tenha como substrato preferencial a amelogenina, contribuindo para a degradação desta, a mais comum proteína do esmalte (BOURD–BOITTIN et al., 2004). Contudo, os achados de Sulkala e colaboradores (2002) indicam que a MMP-20 pode ser produzida pelos odontoblastos, e ser alterada conforme o estágio de diferenciação destes. Além disto, estes mesmos autores sugerem que pode existir uma influência da MMP-20 na organização da matriz dentinária, antes e durante a mineralização *in vivo*, concluindo que a desmineralização ou degradação da matriz orgânica da dentina é necessária para a MMP-20 poder ser liberada da mesma, o que poderia ocorrer, por exemplo, durante a progressão da cárie dentinária (SULKALA et al., 2002).

Uma recente publicação mostra um estudo *in vivo*, desenhado como um ensaio clínico, com crianças, que teve como objetivo avaliar a presença das MMPs -2, -8 e -9, além do colágeno tipo I e da sialoproteína óssea (BSP), usando imunistoquímica (CHIBINSKI et al., 2014). Este parece ser o único trabalho *in vivo*, até o momento, que teve como objetivo identificar e quantificar estas proteínas da matriz extracelular, em dentina cariada, antes e após o selamento dentário. Estes autores avaliaram 34 dentes decíduos. As lesões de cárie dentinária eram agudas e abertas (ICDAS 06) (*International Caries Detection and Assessment System*) (ISMAIL et al., 2007), coletadas dos dentes decíduos, imediatamente no início do tratamento e após o período de avaliação. Algumas perdas ocorreram, devido à dificuldade relatada pelos autores em coletar o tecido cariado na segunda fase, já que este se encontrava modificado (CHIBINSKI et al., 2014). A literatura mostra as modificações que ocorrem no tecido cariado dentinário, após o selamento dentário (BJØRNDAL et al., 1997; MALTZ et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006). Na sequência deste estudo *in vivo*, foi utilizada a técnica de Imunistoquímica, porém o tecido cariado coletado teria que ser removido com cuidado, para não haver a perda do arcabouço necessário para a marcação exigida pela técnica. Estes autores não encontraram diferenças estatísticas entre a quantidade de MMP-2, e MMP-9, antes e após o tratamento, porém encontraram um leve aumento da sua marcação, na segunda etapa. Embora não tenha sido usado um controle com dentina normal neste trabalho, devido a questões éticas, a presença das MMP-2 e -9 no tecido cariado, sugere que estas MMPs possam ter origem na dentina hígida, já que vários trabalhos mostraram presença

destas MMPs em dentina normal, de dentes permanentes extraídos (SHIMADA et al., 2009; TOLEDANO et al., 2010; BOUSHELL et al., 2011; NIU et al., 2011; VIDAL et al., 2014), porém com pequenas diferenças de localização, provavelmente devido a diferenças individuais, ao tipo de metodologia empregada, e ao processamento das amostras.

Chibinski e colaboradores (2014) encontraram forte marcação da MMP-8 na segunda etapa do seu estudo, relatando que esta MMP estava concentrada em toda a matriz orgânica. Esta enzima já foi localizada na dentina hígida (SULKALA et al., 2007; SHIMADA et al., 2009) com significativa diminuição de sua marcação em direção à dentina cariada interna (SHIMADA et al., 2009). Estes dois trabalhos (SHIMADA et al., 2009; CHIBINSKI et al., 2014) possuem resultados que diferem entre si. Houve diferença na fase de desenvolvimento dos dentes. O estudo de Chibinski e colaboradores, avaliou amostras retiradas de dentes decíduos e encontrou a presença da MMP-8 em toda a matriz orgânica desmineralizada, o que não pode ser comparado com o trabalho de Shimada e colaboradores, que avaliaram cortes de dentes permanentes inteiros congelados, para preservar melhor a estrutura para o seu processamento (Immunogold labelling e FE-SEM). A MMP-8 também foi encontrada na literatura em trabalhos que avaliaram a presença desta, em tecido dentinário cariado (TJADERHANE et al., 1998; SHIMADA et al., 2009), porém o nível de atividade desta MMP, no tecido cariado, parece não ter sido avaliado até o momento.

Tjaderhane e colaboradores (1998) encontraram as MMP-2, -8 e -9, em todas as amostras de dentina cariada. Estes autores confirmaram também, que a MMP-2 e a MMP-9 derivadas de dentina cariada e da saliva de doadores estavam ativas. Além disto, todas as MMPs estudadas eram ativadas em pH ácido, mas poderiam degradar seu substrato somente em pH neutro, uma típica sequência na placa dental, após ingestão de açúcares (TJADERHANE et al., 1998), porém não especificaram o tipo de tecido cariado estudado. Pelo fato de que bactérias cariogênicas parecerem não possuir sozinhas nenhum efeito gelatinolítico ou colagenolítico, os achados suportam que somente as bactérias, não são suficientes para produzir lesões de cárie dentinária (KATZ et al., 1987; TJADERHANE et al., 1998), sendo sugerido que as principais enzimas envolvidas na degradação do colágeno dentinário desmineralizado sejam realmente, de origem endógena (TJADERHANE et al., 1998). Além disto, a MMP-2 pode ser liberada do esmalte ou da dentina desmineralizada por bactérias cariogênicas ou sintetizada e liberada imediatamente por odontoblastos durante o processo carioso (TJÄDERHANE et al., 1998). A segunda hipótese parece ser mais plausível, e é suportada por vários

estudos que encontraram esta gelatinase em maior quantidade nos túbulos dentinários da dentina afetada, em comparação com a dentina hígida, o que pode indicar seu envolvimento potencial no mecanismo de defesa do complexo dentino-pulpar em resposta ao processo cárie (TOLEDANO et al., 2010; BOUSHELL et al., 2011; CHARADRAM et al., 2012; VIDAL et al., 2014). Charadram e colaboradores (2012) mostraram a partir de seus achados, que a MMP-2 está relacionada com a dentinogênese reacionária, sendo responsável, em parte, pela ativação de um adaptado fenótipo, levando a uma radical reprogramação dos odontoblastos, com a promoção da modulação da síntese de uma alterada matriz dentinária reacionária, porém este mecanismo necessita da interação de um maquinário enzimático complexo, além de proteínas não colagenosas presentes na matriz dentinária.

A MMP-2 foi acessada em 07 artigos encontrados por esta revisão. Os estudos mostravam o uso de dentina cariada humana, proveniente de dentes extraídos de doadores de diversas faixas etárias. Martin-de-Las Heras e colaboradores (2000) mostraram que os níveis da expressão da MMP-2 era diferente, conforme a idade do doador. Quanto maior a idade, menor expressão enzimática era encontrada. Dos estudos elencados, dois não relataram a idade dos doadores (TJADERHANE et al., 1998; BOUSHELL et al., 2011). Alguns artigos utilizaram dentes de doadores mais jovens (TOLEDANO et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2011; CHARADRAM et al., 2012) e outros de doadores de mais idade (SHIMADA et al., 2009; VIDAL et al., 2014), além do estudo *in vivo*, onde a avaliação foi feita em dentes decíduos (voluntários de 3 a 10 anos de idade) (CHIBINSKI et al., 2014). Esta diferença na idade dos doadores pode ter influenciado os resultados.

A MMP-9 foi detectada juntamente à MMP-2 na câmara pulpar, pré-dentina e dentina interna. Esta MMP foi marcadamente mais forte, na dentina afetada por cárie que na dentina hígida (VIDAL et al., 2014). Já Shimada e colaboradores (2009), encontraram maior concentração da MMP-9 na dentina cariada externa (infectada), quando comparado com a dentina hígida. Estes dois trabalhos mostram uma concentração maior da MMP-9 no tecido cariado, porém estas conclusões não corroboram quanto ao local de maior concentração da MMP estudada. Estes resultados poderiam ter sido influenciados pelo diferentes tipos de metodologia empregada.

Estes resultados sugerem que as MMPs estão envolvidas, não somente na progressão da lesão de cárie, mas na reparação e regeneração que ocorre no complexo dentino-pulpar, sendo semelhante às respostas naturais encontradas em muitos dos

sistemas do organismo, nas quais as MMPs têm um papel fundamental (SMITH et al., 2012).

5.5 Conclusão

A literatura ainda é inconclusiva no assunto pesquisado, em relação à compreensão da identidade, da presença, localização ou atividade das MMPs no tecido cariado humano. Contudo, a MMP-2 parece ser, seguida da MMP-9, dentre as metaloproteinases estudadas, a que está presente em maior quantidade no tecido dentinário cariado, localizada principalmente na região dos túbulos dentinários, na dentina afetada (interna), com proximidade com o tecido pulpar. Sua presença e atividade foram encontradas em maior expressão no tecido dentinário desmineralizado, quando comparada com a dentina normal, o que pode indicar seu potencial envolvimento no mecanismo de defesa do complexo dentino-pulpar. A MMP-20 parece estar mais presente no tecido pulpar e proximidades, e a MMP-8 mostrou-se presente na dentina cariada mais externa ou após selamento dentário *in vivo*.

6 Capítulo 2

Inibição das MMP-2 e MMP-9 salivares humanas por fluoretos

Resumo

As Metaloproteinases da Matriz (MMPs), enzimas existentes na dentina e saliva do próprio hospedeiro, desempenham um papel de destaque no processo de progressão da lesão de cárie, pela sua capacidade de degradar a matriz orgânica dentinária. As MMPs salivares podem ter uma forte relação com a degradação da matriz de colágeno dentinário, durante o processo da lesão de cárie. Assim, inibidores de MMPs poderiam atuar sobre as metaloproteinases salivares, auxiliando, junto ao controle do desafio cariogênico, na prevenção ou paralização da lesão de cárie. Este estudo teve como objetivo avaliar a inibição da atividade das MMPs salivares (MMP-2 e -9) por soluções de Tetrafluoreto de Titânio (TiF_4), Fluoreto de Zinco (ZnF_2) e Fluoreto de Estanho (SnF_2), comparando sua ação com Fluoreto de Sódio (NaF). Amostras de saliva total foram coletadas de voluntários saudáveis, para ser usada em ensaio por zimografia. As soluções dos fluoretos testados tiveram as concentrações de 0,01%; 0,05%; 0,2%; 0,5%; 1% e 2%. O ZnF_2 e o TiF_4 promoveram a maior inibição das duas MMPs salivares, inibindo totalmente (100%), tanto a atividade da MMP-2 quanto da MMP-9, em todas as concentrações testadas. O NaF e o SnF_2 tiveram padrão semelhante com relação à MMP-9, inibindo totalmente (100%) a sua ação gelatinolítica, até a concentração de 0,2% e sendo dose-dependente, nas concentrações menores. Em relação à MMP-2, o NaF manteve o mesmo padrão mostrado para a MMP-9, mas o SnF_2 não foi dose-dependente, inibindo 100% da atividade desta gelatinase nas menores concentrações (0,01%, 0,05% e 0,2%) e nas maiores concentrações, mostrou menor inibição: inibição de 69%, 75% e 85%, para as concentrações de 2%, 1% e 0,5% respectivamente. Em conclusão, todos os fluoretos estudados foram capazes de inibir a atividade das MMPs salivares. Os TiF_4 e ZnF_2 tiveram efeito inibitório em todas as concentrações testadas. Já o NaF e SnF_2 , agiram de forma dose-dependente, com exceção para a MMP-2, onde o SnF_2 , inibiu apenas as menores concentrações.

Palavras-Chave: fluoretos; saliva; cárie dentária; MMP-2; MMP-9; inibidores de MMPs

6.1 Introdução

Durante o desenvolvimento de uma lesão de cárie ocorre a desmineralização da parte inorgânica dos tecidos dentais, principalmente a hidroxiapatita, por ácidos produzidos pelas bactérias. Neste processo, após a parte mineral da dentina ser dissolvida, ocorre a exposição da matriz orgânica deste tecido e que continua a ser decomposto por enzimas bacterianas (FEATHERSTONE, 2008). No entanto, os microrganismos não são os únicos responsáveis pela degradação do colágeno dentinário. Estudos revelam que a contribuição das colagenases bacterianas na degradação da matriz orgânica dental é menor do que aquela atribuída no passado (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006). Por outro lado, a ação de metaloproteinases da matriz (MMPs), enzimas existentes na dentina e saliva do próprio hospedeiro, são decisivas no processo de progressão da lesão de cárie, pela sua capacidade de degradar a matriz orgânica dentinária (TJÄDERHANE et al., 1998; SULKALA et al., 2001; HANNAS et al., 2007).

As MMPs presentes na saliva podem ter acesso direto à dentina desmineralizada, quando acontece a penetração da saliva na cavidade aberta das lesões de cárie (TJÄDERHANE et al. 1998; SULKALA et al., 2001).

A saliva contém diversas MMPs, incluindo colagenases (MMP-8) e gelatinases (MMP-2 e MMP-9) derivadas tanto do fluido gengival como da secreção das glândulas salivares (BIRKEDAL-HANSEN 1993; INGMAN et al., 1994). Entretanto, as MMPs encontradas na saliva mais envolvidas com o processo das lesões de cárie parecem ser as gelatinases, com destaque para a MMP-9, que parece ser a principal gelatinase na saliva total (INGMAN et al., 1994; MAKELA et al., 1994; TJÄDERHANE et al., 1998; VAN STRIJP et al., 2003), e sua atividade pode ter um papel importante na degradação da matriz dentinária, junto à MMP-2, porém esta, em uma menor expressão (NIU et al., 2011). A literatura também já correlacionou uma maior expressão das MMPs salivares em pacientes com lesões ativas de cárie, quando comparadas com pacientes com lesões inativas (NASCIMENTO et al., 2011), sendo muito possível que as MMPs salivares participem do processo de degradação da matriz de colágeno, desde que o complexo dentina-esmalte permita esta penetração molecular (TJÄDERHANE et al., 1998).

O tratamento da cárie dentária exige a interferência em vários fatores como a desorganização do biofilme (KIDD et al., 2010), mas considerando o potencial das MMPs para degradação da matriz orgânica dentinária, parece lógico que a inibição das MMPs

salivares, quando associada a um controle do desafio cariogênico, ajudaria na intervenção da progressão da desmineralização dentinária. Ajudar a diminuir ou prevenir a destruição irreversível da matriz orgânica poderia permitir tratamentos não invasivos ou minimamente invasivos da lesão de cárie, por remineralização da dentina, particularmente no tratamento das lesões de cárie radiculares (KIDD et al., 2010). Nesse contexto, uma estratégia interessante, seria a utilização de inibidores de MMPs salivares.

A literatura atual começa a mostrar um efeito inibidor de MMPs pelos fluoretos. Fluoreto de sódio (NaF), com conhecida ação remineralizadora e redutora de desmineralização nos tecidos dentários, (MARINHO, 2009; TUBERT-JEANNIN et al., 2011; CAREY, 2014; MAGUIRE et al., 2014), já foi demonstrado ser também inibidor de MMPs (MEI et al., 2012; KATO et al., 2014). Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o comportamento relacionado à inibição de MMPs salivares pelo Tetrafluoreto de titânio (TiF_4), Fluoreto de zinco (ZnF_2) e Fluoreto de estanho (SnF_2), comparando-os com o NaF, nas MMPs salivares. A hipótese nula é a de que os fluoretos testados não tenham influência na inibição das MMPs salivares.

6.2 Materiais e Métodos

Os fluoretos (TiF_4 , ZnF_2 , SnF_2) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (Aldrich Chemical Company, Deisenhofen, Germany). O NaF, pela Labsynth (Synth, Brasil). Todas as soluções (10%) foram feitas com água destilada.

- TiF_4 (Aldrich, Sigma-Aldrich, Brasil) ($\leq 100\%$)
- ZnF_2 (Aldrich, Sigma-Aldrich, Brasil) ($\leq 100\%$)
- SnF_2 (Aldrich, Sigma-Aldrich, Brasil) ($\leq 100\%$)
- NaF (Synth, Labsynth, Brasil) ($\leq 100\%$)

Todos fluoretos utilizados foram testados, com as seguintes diluições: 2%, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,05% e 0,01%.

Coleta das amostras de saliva para análise em zimografia

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, sob o parecer 026/2008. Saliva total foi coletada de 8 voluntários saudáveis (idades entre 20 a 40 anos), sem nenhuma lesão ativa de cárie ou doença periodontal. Os voluntários assinaram termo de consentimento livre e esclarecido. O *pool* salivar (saliva de 8 voluntários) foi centrifugado (10,000 rpm, 10 minutos), e o sobrenadante congelado (-80°C) (Freezer Indrel/ IULT 335D), até o momento dos experimentos (VAN STRIJP et al., 2003; KATO et al., 2014). Os voluntários não utilizaram creme dental fluoretado por 12 horas, antes da coleta da saliva. Depois de descongeladas, as amostras foram centrifugadas a 13,000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi levado ao banho-maria (Biopar, Mod BM 03) a 50°C por 30 minutos, e novamente congelado – 80°C até o início da zimografia.

Ensaio de Zimografia (gelatina)

As amostras de saliva foram diluídas em tampão da amostra (Dodecil Sulfato de Sódio, 2%; Tris-HCl 125mM (pH 6.8); Glicerol, 10% e Azul de Bromofenol, 0,001%) (10:3 - amostra:tampão da amostra), o conjunto foi incubado por 2 horas, a 26°C , e imediatamente submetido à eletroforese, em triplicata. Para avaliar o efeito dos fluoretos na atividade das MMPs-2 e -9 amostras de saliva humana foram carregadas em gel de

poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE), contendo 0,05% de gelatina (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). A eletroforese foi conduzida a 4°C, com voltagem constante de 125V por 2 horas e 10 minutos, seguida da incubação por 60 minutos em Triton X-100 (2%) (SOUZA et al., 2000). Os géis contendo ambos marcadores de peso molecular (MWM) (kDa) (Colorburst, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e amostras de saliva, foram então cortados em tiras de 1 cm. Cada tira foi incubada separadamente a 37°C por 19 horas, em tampão (Tris-HCL, 50mM; CaCl₂, 5mM (Tris– CaCl₂); ZnCl₂, 1 µM), contendo (ou não) (controle) as diferentes concentrações (2%, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,05% e 0,01%) dos fluoretos testados (TiF₄, ZnF₂, SnF₂, e NaF) pH 7.4. Posteriormente, os géis foram corados em Azul de Comassie R-250 (Vetec, Brasil) a 0,1%, por 60 minutos e descorados em 10% ácido acético/ 10% metanol. A atividade gelatinolítica foi detectada como bandas não coradas no fundo azul. Para quantificar a relativa inibição das gelatinases pelos fluoretos, as bandas foram escaneadas e analisadas com o programa Image J (NIH, Bethesda, MD, USA). Para confirmar que as enzimas representavam MMPs, géis representativos carregados com MMPs salivares, foram incubados com adição de 0,5mM Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA), (Synth,Labsynth,Brasil) para inibir as atividades das MMPs, enquanto 0,05mM N-etil-maleimida (NEM) (Sigma-Aldrich, MO, USA) foi usado para inibir atividades por proteinases serinas (dados não mostrados). O percentual de inibição enzimático, foi plotado de acordo com as concentrações dos fluoretos. A inibição da atividade gelatinolítica pelos fluoretos,foi determinada pela comparação com seus respectivos controles.

6.3 Resultados

Todos os fluoretos testados foram capazes de inibir MMPs salivares, o que levou à rejeição da hipótese testada.

Em nosso ensaio por zimografia, 04 bandas foram detectadas nos controles, 2 bandas menos nítidas, próximas ao peso molecular de 70 KDa (correspondentes as formas pro e ativas da MMP-2), e outras duas bandas mais evidentes, migrando entre 90 KDa (pro e ativa MMP-9). Estas enzimas foram caracterizadas como MMPs, pois suas atividades foram inibidas por EDTA e não inibidas por NEM (dados não mostrados). Bandas adicionais gelatinolíticas, correspondendo aos complexos de maior peso molecular, bem como bandas de baixo peso molecular, representando formas enzimáticas truncadas, também foram encontradas.

A incubação dos géis na zimografia com as diferentes concentrações dos fluoretos mostrou uma diminuição da expressão da atividade gelatinolítica das MMPs salivares, em ambas as formas da MMP-2 e MMP-9 em um padrão dose-dependente (figura 1 e figura 2). O ZnF_2 e o TiF_4 promoveram inibição das duas MMPs salivares, em todas as concentrações testadas. O NaF e o SnF_2 tiveram padrão semelhante com relação à MMP-9, inibindo totalmente (100%) a sua ação gelatinolítica, até a concentração de 0,2%, e sendo dose-dependente, nas concentrações menores. Em relação à MMP-2, o NaF manteve o mesmo padrão mostrado para a MMP-9, mas o SnF_2 não foi dose-dependente, inibindo 100% da atividade desta gelatinase nas menores concentrações (0,01%, 0,05% e 0,2%) e nas maiores concentrações, mostrou menor ação sobre a atividade enzimática: inibição de 69%, 75% e 85%, para as concentrações de 2%, 1% e 0,5% respectivamente. A inibição completa está mostrada nas Figuras 1 e 2 pela ausência de bandas claras e nas Tabelas 1 e 2 pela porcentagem de inibição.

Tabela 1 Percentual de inibição das MMP-2 salivares pelos fluoretos NaF, ZnF₂, TiF₄ e SnF₂, em relação ao controle.

Concentração (%)	Percentual de Inibição (MMP-2)			
	NaF	ZnF ₂	TiF ₄	SnF ₂
0,01	47,8	100	100	100
0,05	68,5	100	100	100
0,2	100	100	100	100
0,5	100	100	100	85,1
1	100	100	100	75,6
2	100	100	100	69,3

Tabela 2. Percentual de inibição das MMP-9 salivares pelos fluoretos NaF, ZnF₂, TiF₄ e SnF₂, em relação ao controle.

Concentração (%)	Percentual de Inibição (MMP-9)			
	NaF	ZnF ₂	TiF ₄	SnF ₂
0,01	45,1	100	100	21,1
0,05	61,9	100	100	51,5
0,2	100	100	100	100
0,5	100	100	100	100
1	100	100	100	100
2	100	100	100	100

Tabela 3. pH das soluções testadas, após diluição no tampão de revelação

Concentração	ZnF₂	TiF₄	NaF	SnF₂
2%	4,98	0,85	7,67	2,63
1%	5,22	1,37	7,15	2,79
0,5%	5,64	1,66	6,8	2,98
0,2%	6,2	1,95	6,36	3,19
0,05%	6,14	2,38	6,14	3,48
0,01%	5,18	2,88	6,1	3,54

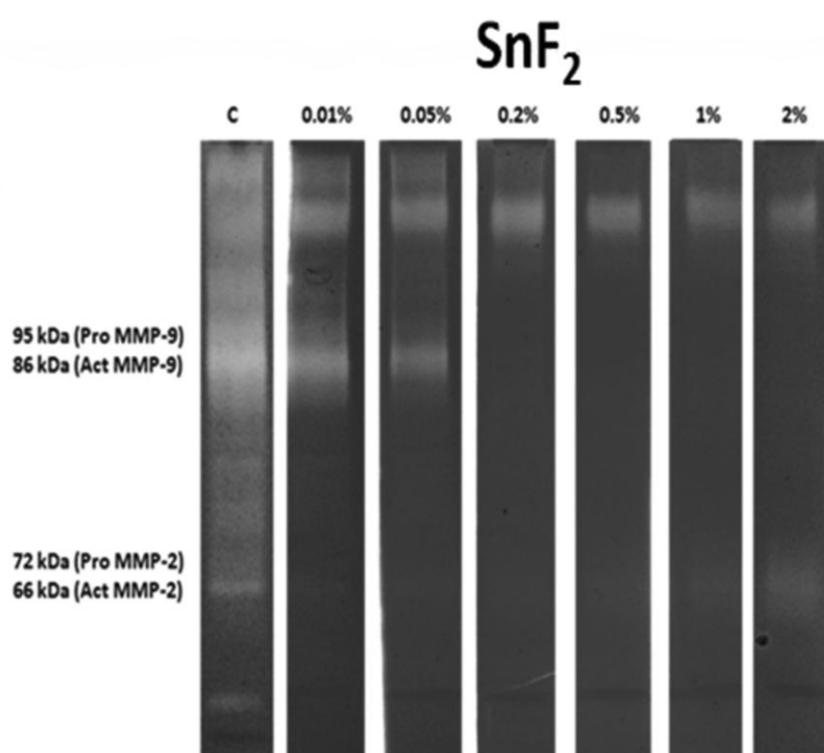
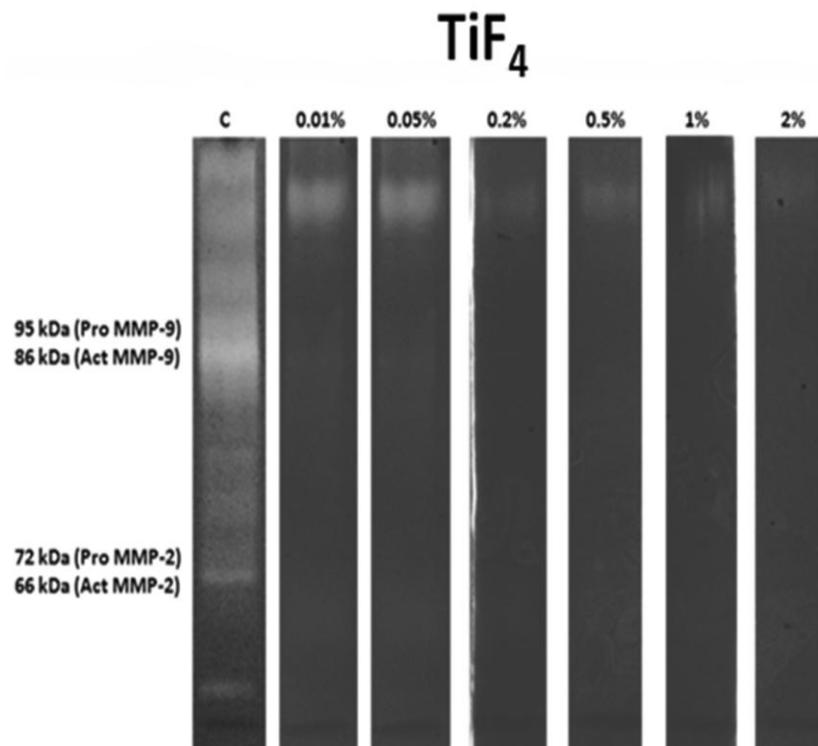


Figura 1 - Inibição das metaloproteinases da matriz (MMPs) salivares, pelos fluoretos TiF₄ e SnF₂, em relação ao seu controle (c). Efeito sobre a atividade das gelatinases salivares MMP-2 e -9 foi observado nos géis por zimografia. Houve inibição significativa das formas pró e ativas de MMP-2 -9 salivares. TiF₄ inibiu, em todas as concentrações testadas, a atividade das MMP-2 e -9, enquanto o SnF₂ teve influência sobre a MMP-2 nas menores concentrações, mas não nas maiores concentrações (0,5%, 1% e 2%); já para a MMP-9, este fluoreto inibiu de forma dose-dependente, a partir da concentração de 0,2%. A redução nos níveis de cinza no gel, indicam a degradação enzimática.

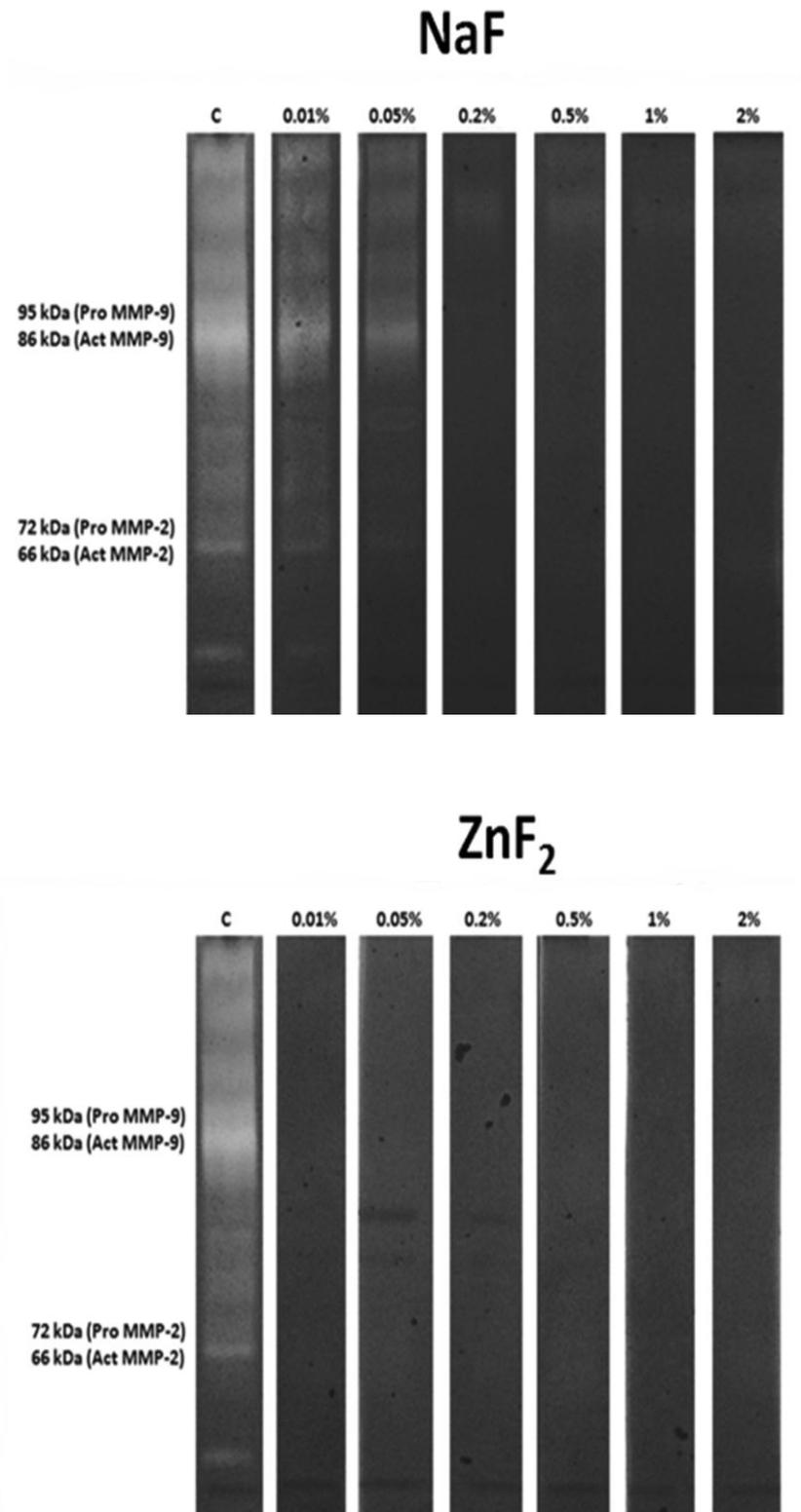


Figura 2 - Inibição das metaloproteínas da matriz (MMPs) salivares, pelos fluoretos NaF e ZnF₂, em relação ao seu controle (c). Efeito sobre a atividade das gelatinases salivares MMP-2 e -9 foi observado nos géis por zimografia. Houve inibição significativa das formas pró e ativas de MMP-2 -9 salivares. ZnF₂ inibiu em, todas as concentrações testadas, a atividade das MMP-2 e MMP-9, enquanto o NaF teve influência de forma dose-dependente, com significativa inibição a partir da concentração de 0,2%. A redução nos níveis de cinza no gel, indicam a degradação enzimática.

6.4 Discussão

Este trabalho demonstrou *in vitro*, por zimografia, a ação de diferentes fluoretos, com relação à sua inibição de MMPs salivares. A hipótese nula testada de que não haveria inibição das MMPs salivares pelos TiF_4 , SnF_2 e ZnF_2 , em relação ao NaF, foi rejeitada, pois estes fluoretos foram capazes de interferir na atividade enzimática, tanto da MMP-2 como da MMP-9. Este estudo parece ser, de acordo com a literatura consultada, o primeiro a demonstrar o efeito dos TiF_4 , ZnF_2 e do SnF_2 sobre atividade enzimática salivar e sugerir que estes materiais poderiam ajudar a reduzir a desmineralização da matriz orgânica dentinária.

Nascimento e colaboradores (2011) encontraram uma maior atividade das MMPs salivares de pacientes com lesões ativas de cárie, quando comparados a pacientes com lesões inativas. Além disto, a atividade das MMPs salivares em pacientes com lesões de cárie profundas foi maior que em pacientes com lesões menos profundas, motivando especulação de que MMPs salivares podem participar na patogênese da lesão de cárie de dentina. Esta hipótese é suportada por resultados de alguns estudos anteriores que demonstraram a degradação do colágeno dentinário exposto, por MMPs salivares ácido-ativadas (TJÄDERHANE et al., 1998) e ainda, a diminuição na progressão da cárie de dentina por inibidores de MMPs, administrados localmente (SULKALA et al, 2001). Estes fatos tornam a redução das MMPs salivares por inibidores sintéticos potentes e seletivos, uma meta desejável.

As gelatinases possuem em sua estrutura três domínios de fibronectina, responsáveis pela sua ligação à gelatina, laminina, elastina e aos colágenos tipo IV e VII (NAGASE et al., 2006; VISSE, NAGASE, 2003). Há uma coordenação entre a cisteína presente no pró-domínio e o zinco presente no domínio catalítico da enzima. Essa ligação Cis- Zn^{2+} mantém as pro-MMPs inativas, prevenindo que moléculas de água se liguem ao átomo de zinco, o que ocasionaria a sua ativação (NAGASE et al., 2006).

No presente trabalho, 03 fluoretos metálicos foram estudados, em comparação com o NaF. O mecanismo de inibição das enzimas por metais, não é completamente entendido. Uma hipótese é que íons metálicos se liguem a sítios estruturais específicos, causando mudanças na conformação das enzimas, o que poderia levar à inativação da sua função catalítica (MASKOS, 2005). Na incubação das MMPs salivares com fluoretos metálicos, como o TiF_4 , o SnF_2 e o ZnF_2 , os metais poderiam promover uma troca com íons Ca^{2+} ou Zn^{2+} , presentes na estrutura das MMPs, inativando a função das enzimas. A

MMP-2 possui 2 íons Ca^{2+} e 2 íons Zn^{2+} e a MMP-9 possui 3 íons Ca^{2+} e 2 íons Zn^{2+} (MASKOS, 2005). Estes íons Ca^{2+} e Zn^{2+} , presentes no sítio catalítico das enzimas, são mais reativos que os íons Sn^{2+} , e Ti^{4+} . Assim as enzimas salivares poderiam ter sua estrutura alterada devido à diminuição de íons cálcio ou zinco. Hipoteticamente, o TiF_4 reagiria com Ca^{2+} ou Zn^{2+} (reação $\text{TiF}_4 + \text{Ca}^{2+}$ e/ou $\text{Zn}^{2+} = \text{CaF}_2$ ou $\text{ZnF}_2 + \text{Ti}$), e da mesma forma, poderia acontecer o mesmo com o SnF_2 (reação $\text{SnF}_2 + \text{Ca}^{2+}$ e/ou $\text{Zn}^{2+} = \text{CaF}_2$ ou $\text{ZnF}_2 + \text{Sn}$) (SOUZA et al., 2000; KATO et al., 2010). Além disto, Souza e colaboradores (2000), demonstraram que metais menos reativos que o Ca^{2+} , como o cobre e o mercúrio (CuSO_4 e HgSO_4), causaram menor inibição às MMPs, quando comparados com ZnSO_4 .

NaF foi usado neste estudo como um grupo controle, já que em estudo prévio, a ação deste fluoreto foi comprovada sobre as MMPs salivares (KATO et al., 2014). Além disto, este fluoreto é usado clinicamente com comprovada ação remineralizadora e inibidora de desmineralização de tecidos dentários (MARINHO, 2009; TUBERT-JEANNIN et al., 2011; CAREY, 2014; MAGUIRE et al., 2014). Kato e colaboradores (2014) utilizaram também ensaio por zimografia e encontraram inibição das MMP-2 e MMP-9 recombinantes, com 200ppmF, e inibição das MMP-2 e -9 salivares, a partir de 100ppmF e 75 ppmF (50% de inibição), respectivamente. No presente trabalho, utilizamos o NaF em concentrações que variaram entre 0,01% e 2%. Foi encontrada com este fluoreto, uma inibição dose-dependente da expressão das MMPs salivares a partir de 0,05% (225ppmF). Nesta concentração o NaF inibiu 68% (MMP-2) e 62% (MMP-9), e na concentração de 0,01% (45ppmF), este fluoreto inibiu 48% (MMP-2) e 45% (MMP-9), o que demonstra que os resultados do presente trabalho, corroboram com esta recente publicação.

O NaF mostrou comportamento dose-dependente, na presente avaliação (KATO et al., 2014), o que nos leva a supor que, sua eficácia quando usado em maiores concentrações, na prevenção de lesões de cárie (CAREY, 2014), possa ser também influenciada pela sua ação sobre a atividade das MMPs salivares em concentrações iguais ou superiores a 0,2%. Além disto, Kato e colaboradores (2014) mostraram, a irreversibilidade da inibição das MMPs testadas em altas concentrações (5000ppmF), mas não foi possível inferir razões para este achado.

O mecanismo pelo qual NaF teria inibido as MMPs salivares, não é conhecido. Considerando-se que as MMPs são enzimas Zn^{2+} e de Ca^{2+} dependentes, e que o Flúor é altamente eletronegativo, foi sugerida a hipótese de que o excesso de F poderia levar a uma diminuição destes íons no sítio catalítico das MMPs, inativando estas enzimas (KATO et al., 2014).

O TiF_4 inibiu 100% das MMPs salivares, mesmo nas menores concentrações. A literatura mostra uma característica remineralizadora igual ou superior do TiF_4 , em relação ao NaF, quando estes são comparados em concentrações mais altas (4% e 2% respectivamente) (MAGALHÃES et al., 2008; WIEGAND et al., 2010; COMAR et al., 2012), superioridade esta que encontramos também em relação à sua capacidade de inibição enzimática. Estudos, com o tetrafluoreto de titânio já tem investigado este fluoreto com relação à prevenção da desmineralização do esmalte (BUYUKYILMAZ et al., 1997; VAN RIJKOM et al., 2002; TVEIT et al., 1983; VIEIRA et al., 2005; VIEIRA et al., 2006) e prevenção da nanoinfiltração da camada híbrida (DUNDAR et al., 2011). Seu efeito cariostático parece ser obtido através de uma camada de cobertura rica em ambos, flúor e titânio, formada sobre a superfície do esmalte exposto ao fluoreto, reduzindo seus níveis de solubilidade e prevenindo o desafio cariogênico (MUNDORFF et al., 1972; NASSUR et al., 2013). Esse efeito inibidor sobre formação das lesões de cárie (TEZEL et al., 2002), pode em parte, ser explicado pelo seu efeito sobre as MMPs, já que este fluoreto foi capaz de inibir totalmente a atividade das MMP-2 e -9 salivares, em todas as concentrações testadas.

Um verniz experimental à base de TiF_4 foi capaz de diminuir a desmineralização e aumentar a dureza do esmalte saudável e cariado, respectivamente, sendo igualmente efetivo em comparação aos vernizes NaF, sobre a redução da desmineralização na subsuperfície, mas foi mais eficaz em melhorar a remineralização na superfície e subsuperfície *in vitro* (MAGALHÃES et al., 2008) e *in situ* (COMAR et al., 2012). As concentrações destes vernizes nestes trabalhos prévios foram de 4% e 5,4% para o TiF_4 e NaF, respectivamente. No presente estudo, as maiores concentrações foram de 2%, porém à estas concentrações máximas (2%), tanto o NaF quanto o TiF_4 , inibiram totalmente as MMPs salivares, o que pode justificar parte do bom desempenho destes fluoretos, quando concentrações mais altas são usadas.

O TiF_4 mostrou, a partir da concentração de 0,01% inibir totalmente a MMP-2 e a MMP-9. A ação protetora deste composto incorporado a uma solução tem sido atribuída não apenas à ação do flúor, mas também à ação do titânio (BUYUKYILMAZ et al., 1997; TEZEL et al., 2002). No presente estudo, não podemos dissociar o mecanismo de ação do titânio e do flúor, por não compararmos isoladamente cada íon. Porém foi demonstrado que o tetrafluoreto de titânio teve uma ação maior sobre as MMPs salivares em relação ao NaF.

De acordo com estudos anteriores, o baixo pH do TiF_4 (cerca de 1,2), favorece a ligação entre o titânio e o oxigênio do grupo fosfato, conduzindo assim à formação de

uma camada de esmalte composta por dióxido de titânio na superfície dentária (TVEIT et al., 1983; BUYUKYILMAZ et al., 1997). O pH das diferentes soluções estudadas, está apresentado na Tabela 3. Dentre todos os fluoretos testados, o TiF_4 é o que apresenta menores valores de pH, o que poderia ter influência sobre as MMPs. Estas enzimas são secretadas como zimogênios inativos e podem ser ativadas em ambiente ácido. Estas enzimas embora ativadas, não degradam seu substrato, neste ambiente ácido (TJÄDERHANE et al., 1998). O pH do tampão de revelação é ajustado para 7.4, para propiciar um ambiente favorável para a ação enzimática, portanto é provável que o pH inicial das substâncias testadas, não possa influenciar a atividade das MMPs nos ensaios por zimografia, contudo, estas diferenças de pH merecem futuras investigações. Além disto, o real mecanismo de ação do tetrafluoreto de titânio e seu protocolo de uso, ainda não estão bem esclarecidos. Nossos achados demonstram que TiF_4 teve influência sobre as MMPs, fato que pode somar-se às outras promissoras características deste material, para elucidar melhor seu mecanismo de ação, em futuras pesquisas.

Lippert (2012) mostrou em seu estudo, que na presença de baixas quantidades de flúor (F), o Zn atua apenas como um inibidor de crescimento de cristais, que está em concordância com as observações clínicas do papel do Zn como um agente anti-cálculo (NETUVELI & SHEIHAM, 2004). Em elevadas quantidades de F, o zinco é capaz de aumentar a remineralização da lesão de cárie, no entanto, quando muito baixas quantidades de zinco estão presentes. Além disso, Lippert também verificou que F e Zn poderiam atuar sinergicamente (LIPPERT, 2012). No presente estudo, o Fluoreto de zinco mostrou a maior interferência sobre as MMPs salivares. Mesmo na concentração de 0,01% ZnF_2 , na qual a quantidade de flúor e zinco foi bem pequena, até a concentração de 2% ZnF_2 , onde há maior quantidade dos dois elementos, este fluoreto inibiu totalmente a atividade das MMP-2 e -9 salivares. A sinergia entre F e Zn dentro do composto usado em nosso estudo, poderia ser uma das causas da maior eficácia do material em relação ao uso de Zn ou de F sozinhos (LYNCH et al. 2011; LIPPERT, 2012).

A literatura tem mostrado que metais divalentes, tais como o zinco, podem efetivamente inibir atividades proteolíticas de MMPs (SOUZA et al., 2000; SOUZA et al., 2001; SANTOS et al., 2004; KATO et al., 2010; HENN et al., 2012). Materiais dentários que possuem zinco em sua composição, como os cimentos de óxido de zinco e eugenol, ligas de amálgamas contendo zinco, cimentos de fosfato de zinco e mais recentemente metacrilato de zinco, também tem demonstrado ser inibidores de MMP-2 e -9 (SOUZA et al., 2000; SOUZA et al., 2001; SANTOS et al., 2004; HENN et al., 2012). O mecanismo de inativação destas enzimas por metais não está completamente entendido. Outra hipótese,

além da já citada teoria da reatividade dos metais, seria a de que íons metálicos poderiam ligar-se à resíduos de aminoácidos, causando mudanças na conformação e inativando a função catalítica das MMPs (SOUZA et al., 2001).

O zinco também tem um papel estrutural nas proteínas, estabilizando a sua estrutura terciária (MCCALL et al., 2000). Quatro sítios de ligação ao zinco foram encontrados em moléculas de colágeno; dois destes locais estão na mesma região que os locais de clivagem das collagenases (DZAMBA et al., 1993; ROSENBERG et al., 1998). Mudanças sutis na conformação podem ocorrer após a ligação do zinco ao colágeno e levar à proteção dos sítios de clivagem das MMPs (OSÓRIO et al., 2011). Além disto, a literatura já propôs que o mecanismo de ação do zinco em relação às MMPs, pode ocorrer devido à formação de um monohidrato de zinco, que liga o íon zinco catalítico à cadeia lateral no sítio ativo da enzima. A não inibição competitiva por outros íons metálicos pesados é atribuída à ligação deste íon ao sítio ativo da enzima (LARSEN & AULD 1991).

O SnF₂ é usado como um componente de múltiplos benefícios em dentifrícios dentais e em soluções, além de reduzir o crescimento bacteriano, a atividade bacteriana, e também diminuir os marcadores inflamatórios (MADLÉNA, 2013). Este fluoreto mostra também influência sobre a inibição da formação da placa bacteriana (WILLUMSEN et al., 2007; WHITE et al., 2008; MADLÉNA, 2013; CURY & TENUTA, 2014) e eficácia na redução da hipersensibilidade dentinária (HE et al., 2014). Além disto, a combinação entre SnF₂ e fluoreto de amina (AmF) em soluções tem mostrado bons resultados em relação à prevenção de doenças bucais. O fluoreto de amina é usado em conjunto com o SnF₂ por melhorar suas propriedades em solução, estabilizando este último (SCHLUETER et al., 2009; MADLÉNA, 2013).

O SnF₂ também está sendo estudado com relação à erosão do esmalte, onde parece exercer um efeito protetor (MAGALHÃES et al., 2011; BELLAMY et al., 2014; FALLER & EVERSOLE, 2014).

Em nosso estudo, este fluoreto se mostrou eficaz sobre a inibição da atividade enzimática salivar. O seu mecanismo de ação não é conhecido, mas poderia estar relacionado à reatividade do metal (Sn) com os íons estruturais Ca²⁺ e Zn²⁺, como já comentado anteriormente.

Nossos resultados mostraram que o SnF₂ apresentou padrão semelhante ao NaF com relação à MMP-9, inibindo totalmente (100%) a sua ação gelatinolítica, até a concentração de 0,2% e sendo dose-dependente. Porém em relação à MMP-2, este fluoreto não mostrou o mesmo comportamento, inibindo 100% da atividade desta

gelatinase nas menores concentrações (0,01%, 0,05% e 0,2%) e, nas maiores concentrações, mostrou menor ação sobre sua atividade. A razão para isso não é aparente e está provavelmente relacionado com o mecanismo de inibição da MMP-2 salivar por este fluoreto, fato que merece uma investigação mais aprofundada. Contudo, o SnF_2 , possui certa instabilidade quando utilizado sozinho, em soluções ou cremes dentais. Por este motivo, a literatura mostra o uso de estabilizadores alternativos como o Fluoreto de Amina (AmF) (SCHLUETER et al., 2009; MADLÉNA, 2013) e o Hexametáfosfato de Sódio (STOOKEY, 2004). Esta instabilidade poderia ser uma das razões para este efeito não-dose-dependente deste fluoreto.

Um estudo clínico prospectivo randomizado demonstrou que o uso da combinação de dentifício/enxaguatório contendo AmF/ SnF_2 levou à um maior efeito sobre a formação de lesões de mancha branca, placa bacteriana e gengivite quando em comparação com o uso de apenas a combinação de dentifício/enxaguatório contendo NaF. Estes autores supõem que o pH dos produtos testados poderia ter influência no resultado. Produtos contendo AmF/ SnF_2 tem um menor pH que aqueles contendo NaF (ØGAARD et al., 2006). Nossos achados demonstram esta diferença de pH (Tabela 3), porém não encontramos correlação do potencial inibitório dos fluoretos com relação à acidez das substâncias testadas. O que se pode especular é que a ligação-Cisteína, encontrada na estrutura das MMPs, pode estar envolvida, desde que a ligação Zn-Cisteína, a qual representa um passo crítico no processo de ativação da enzima, possa ser afetada. A mudança de pH poderia alterar as estruturas secundárias e terciárias e a conformação do pro-peptídeo e portanto mudar o equilíbrio da ligação com a Cisteína (TJADERHANE et al., 1998).

Há uma dificuldade muito grande na comparação de diferentes sais e na discussão a respeito dos seus diferentes componentes, pois seus mecanismos de ação não são iguais. Entretanto o estudo destes 04 fluoretos juntos permitiu uma comparação, que até o momento nos parece inédita na literatura, sobre a influência destes fluoretos na atividade enzimática salivar, *in vitro*.

6.5 Conclusão

Com as limitações de um estudo *in vitro*, podemos concluir que todos os fluoretos estudados foram capazes de inibir a atividade das MMPs salivares. Os TiF_4 e ZnF_2 tiveram efeito inibitório em todas as concentrações testadas. Já o NaF e SnF_2 , agiram de forma dose-dependente, com exceção para a MMP-2, na qual o SnF_2 inibiu apenas as menores concentrações. O efeito inibitório destes fluoretos sobre MMPs, como demonstrado no presente estudo, pode não acontecer *in vivo* e esta interação entre estes materiais com o ambiente bucal, precisa ser melhor investigada. No entanto estes achados podem servir como base para futuras pesquisas no desenvolvimento de materiais, que talvez em conjunto com outros inibidores de MMPs usados na cavidade bucal, possam influenciar a diminuição da degradação da matriz orgânica dentinária.

7 Considerações Finais

1) A presente revisão encontrou as MMP-2, -9, -8 e -20, como as principais metaloproteinases encontradas no tecido dentinário desmineralizado. A MMP-2 parece ser, seguida da MMP-9, dentre as metaloproteinases estudadas, a que existe em maior quantidade no tecido dentinário cariado, localizada principalmente na região dos túbulos dentinários, na dentina afetada (interna), com proximidade com o tecido pulpar. Sua presença e atividade foram encontradas em maior expressão no tecido dentinário desmineralizado, quando comparada com a dentina normal, o que pode indicar seu potencial envolvimento no mecanismo de defesa do complexo dentino-pulpar. A MMP-20 parece estar mais presente no tecido pulpar e proximidades, e a MMP-8 mostrou-se presente na dentina cariada mais externa ou após selamento dentário *in vivo*. Devido à maior frequência destas MMPs, nas lesões de cárie humanas, com relação ao tecido dentinário sadio, é de fundamental importância conseguir determinar e caracterizar o perfil proteolítico completo do tecido dentinário desmineralizado e compreender a interação entre estas enzimas na degradação da dentina, o que poderia contribuir na orientação de pesquisas sobre futuras terapias ou materiais no controle eficaz da lesão de cárie.

2) Todos os fluoretos avaliados foram capazes de inibir a atividade das MMPs salivares. Os TiF_4 e ZnF_2 tiveram efeito inibitório em todas as concentrações testadas. Já o NaF e SnF_2 , agiram de forma dose-dependente, com exceção para a MMP-2, na qual o SnF_2 inibiu apenas as menores concentrações. Estes materiais mostraram uma promissora capacidade de inibição de MMPs salivares *in vitro*, e estes dados podem colaborar para pesquisas futuras no desenvolvimento de materiais que possam ter influência na prevenção da degradação da matriz orgânica dentinária.

Referências

ALBERTS, B. et al. Fundamentos da Biologia Molecular Celular. 3 ed. Porto Alegre, **ArtMed**, 844p, 2011.

ANUSAVICE, K.J. Phillips Materiais Dentários. 11 Ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2005, 764p.

ASGARY, S.; EGHBAL, M.J.; PARIROKH, M.;GHANAVATI, F.; RAHIMI, H. A comparative study of histologic response to different pulp capping materials and a novel endodontic cement.**Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology**, v.106, p.609–614, 2008.

BELLAMY, P.G.; HARRIS, R.; DATE, R.F.; MUSSETT, A.J.; MANLEY, A.; BARKER, M.L.; HELLIN, N.; WEST, N.X. In situ clinical evaluation of a stabilised, stannous fluoride dentifrice.**International Dental Journal**, v. 64, n. 1, p. 43-50, 2014.

BENOIST, F.L.; NDIAYE, F.G.; KANE, A.W.;BENOIST, H.M.; FARGE, P.Evaluation of mineral trioxide aggregate (MTA) versus calcium hydroxide cement (Dycal(®)) in the formation of a dentine bridge: a randomised controlled trial..**International Dental Journal**, v.62, n.1, p.33-39, 2012.

BOUKPESSI, T.; MENASHI, S.; CAMOIN, L.; TENCATE, J.M.; GOLDBERG, M.; CHAUSSAIN-MILLER, C. The effect of stromelysin-1 (MMP-3) on non-collagenous extracellular matrix proteins of demineralized dentin and the adhesive properties of restorative resins.**Biomaterials**, v.29, p.4367–4373, 2008.

BOURD-BOITTIN, K.; SEPTIER, D.; HALL, R.; GOLDBERG, M.; MENASHI, S. Immunolocalization of enamelysin (matrix metalloproteinase-20) in the forming rat incisor. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 52, n. 4, p. 437-45, 2004.

BOUSHELL, L.W.; KAKU, M.; MOCHIDA, Y.; BAGNELL, R.; YAMAUCHI, M. Immunohistochemical localization of matrixmetalloproteinase-2 in human coronal dentin. **Archives of Oral Biology**, v.53, p.109–116, 2008.

BOUSHELL, L.W.; NAGAOKA, H.; NAGAOKA, H.; YAMAUCHI, M. Increased Matrix Metalloproteinase-2 and Bone Sialoprotein Response to Human Coronal Caries. **Caries Research**, v.45, p.453–459, 2011.

BJØRNDAL, L.; LARSEN, T.; THYLSTRUP, A.A clinical and microbiological study of deep carious lesions during stepwise excavation using long treatment intervals. **Caries Research**, v.31, n.6, p.411-417, 1997.

BJØRNDAL, L. Indirect Pulp Therapy and Stepwise Excavation. **Journal of Endodontics**, v.34, n.7S, p.29-33, 2008.

BJØRNDAL, L.; REIT, C.; BRUUN, G.; MARKVART, M.; KJÆLDGAARD, M.; NASMAN, P.; et al. Treatment of deep caries lesions in adults: randomized clinical trials comparing stepwise vs. direct complete excavation, and direct pulp capping vs. partial pulpotomy. **European Journal Oral Science**, v.118, p.290–297, 2010.

BUYUKYILMAZ, T.; OGAARD, B.; DUSCHNER, H.; RUBEN, J.; ARENDS, J. The caries-preventive effect of titanium tetrafluoride on root surfaces in situ as evaluated by microradiography and confocal laser scanning microscopy. **Advances in Dental Research**, v. 11, p. 448–52, 1997.

CAMILLERI, J.; PITT FORD, T.R. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. **International Endodontics Journal**, v.39, n.10, p.747-754, 2006.

CAREY, C.M. Focus on fluorides: update on the use of fluoride for the prevention of dental caries. **Journal of Evidence-Based Dental Practice**, n. 14, p. 95-102, 2014.

CHARADRAM, N.; FARAHANI, R.M.; HARTY, D.; RATHSAM, C.; SWAIN, M.V.; HUNTER, N. Regulation of reactionary dentin formation by odontoblasts in response to polymicrobial invasion of dentin matrix. **Bone**, v.50, n.1, p.265-275, 2012.

CHAUSSAIN-MILLER, C.; FIORETTI, F.; GOLDBERG, M.; MENASHI, S. The Role of Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Human Caries. **Journal of Dental Research**, v.85, n.1, p.22-32, 2006.

CHIBINSKI, A.C.; GOMES, J.R.; CAMARGO, K.; REIS, A.; WAMBIER, D. S. Bone sialoprotein, matrix metalloproteinases and type I collagen expression after sealing infected caries dentin in primary teeth. **Caries Research**, v. 48, n. 4, p. 312-9, 2014.

COMAR, L.P.; WIEGAND, A.; MORON, B.M.; RIOS, D.; BUZALAF, M.A.; BUCHALLA, W. et al. In situ varnish and solution on carious demineralization of enamel. **European Journal of Oral Sciences**, v. 4, n. 120, p. 342-8, 2012.

CORRALO DJ. Efeito de materiais forradores sobre o comportamento biológico da dentina cariada e presença bacteriana. Análises clínica e estrutural. Porto Alegre. Faculdade de

Odontologia da UFRGS, 2003. **Dissertação** (Mestrado em Clínicas Odontológicas – Cariologia). Faculdade de Odontologia. UFRGS, 89p.

CURY, J.A.; TENUTA, L.M.A. evidence-based recommendation on toothpaste use. **Brazilian Oral Research**, v. 28, n. 1, p. 1-7, 2014.

D'ARCANGELO, C.; DI NARDO-DI MAIO, F.; PATRONO, C.; CAPUTI, S. NOS evaluations in human dental pulp-capping with MTA and calcium-hydroxide. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v.20, p.27–32, 2007.

DAYAN, D.; BINDERMAN, I.; MECHANIC, G.L. A preliminary study of activation of collagenase in carious human dentine matrix. **Archives of Oral Biology**, v. 28, n. 2, p. 185-7, 1983.

DUARTE, M.A.; MARTINS, C.S.; CARDOSO, D.O.; DEMARCHI, A.C.; DE GODOY, L.F.; KUGA, M.C.; YAMASHITA, J.C. Calcium and hydroxide release from different pulp-capping materials. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology**, v.104, p.66–69, 2007.

DUŞİNDAR, M.; ÖZCAN, M.; ÇÖMLEKOĞLU, M.E.; SEN, B.H. Nanoleakage Inhibition Within Hybrid Layer Using New Protective Chemicals and Their Effect on Adhesion. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 93, 2011.

DUQUE, C.; HEBLING, J.; SMITH, A.; GIRO, M.; FREITAS, M.; DE SOUZA COSTA, C.A. Reactionary dentinogenesis after applying restorative materials and bioactive dentin matrix molecules as liners in deep cavities prepared in non-human primate teeth. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.33, p.452–461, 2006.

DUQUE, C.; NEGRINI, T.C.; SACONO, N.T.; SPOLIDORIO, D.M.P.; SOUZA COSTA, C.A.; HEBLING, J. Clinical and microbiological performance of resin-modified glass-ionomer liners after incomplete dentine caries removal. **Clinical Oral Investigation**, v.13, p.465–471, 2009.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews. Cancer**, v.2, n.3, p.161-174, 2002.

ERCIYAS, A.F.; ERCIYAS, K.; SARKAYA, R. Genotoxicity of two mouth-wash products in the drosophila wing-spot test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2577-80, 2010.

ESKANDARIZADEH, A.; SHAHPASANDZADEH, M.H.; SHAHPASANDZADEH, M.; TORABI, M.; PARIROKH, M. A comparative study on dental pulp response to calcium

hydroxide, white and grey mineral trioxide aggregate as pulp capping agents. **Journal of Conservative Dentistry**, v.14, n.4, p.351–355, 2011.

FALLER, R.V.; EVERSOLE, S.L. Protective effects of SnF₂ - Part III. Mechanism of barrier layer attachment. **International Dental Journal**, v. 64, n. 1, p. 16-21, 2014.

FEATHERSTONE, J.D.B. Dental caries: a dynamic disease process. **Australian Dental Journal**, v.53, p.286–291, 2008.

FEJERSKOV, O.; NYVAD, B.; KIDD, E.A.M. Clinical appearance of caries lesions. In: Dental caries. The disease and its clinical management. 2nd ed. **Oxford, UK: Blackwell Munksgaard Ltd.**, p. 7-18, 2008.

FERRACANE, J.L.; COOPER, P.R.; SMITH, A.J. Can interaction of materials with the dentin–pulp complex contribute to dentin regeneration? **Odontology**, v.98, n.1, p.2–14, 2010.

FILOCHE, S.K.; SOMA, D.; VAN BEKKUM, M.; SISSONS, C.H. Plaques from different individuals yield different microbiota responses to oral- antiseptic treatment. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 54, p. 27- 36, 2008.

FUSAYAMA, T. Two layers of caries dentin: diagnosis and treatment. **Operative Dentistry**, v. 4, p. 63-70, 1979.

GOSAU, M.; HAHNEL, S.; SCHWARZ, F.; GERLACH, T.; REICHERT, T.E.; BÜRGER, R. Effect of six different peri-implantitis disinfection methods on in vivo human oral biofilm. **Clinical Oral Implants Research**, v. 21, p. 866-72, 2010.

GRAHAM, L.; COOPER, P.R.; CASSIDY, N.; NOR, J.E.; SLOAN, A.J.; SMITH, A.J. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. **Biomaterials**, v.27, n.4, p.2865-2873, 2006.

HAYASHI, M.; FUJITANI, M.; YAMAKI, C.; MOMOI, Y. Ways of enhancing pulp preservation by stepwise excavation - A systematic review. **Journal of Dentistry**, v.39, p.95–107, 2011.

HANNAS, A. R.; PEREIRA, J. C.; GRANJEIRO, J. M.; TJARDEHARNE, L. The role matrix metalloproteinases in the oral environment. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.65, n.1, p.1-13, 2007.

HE, T.; BARKER, M.L.; BIESBROCK, A.; SHARMA, N. A randomized controlled clinical

trial to assess the desensitizing effect of a stannous fluoride dentifrice. **American journal of dentistry**, v. 27, n.2, p. 106-10 2014.

HENN S, RODRIGO VC, FABRÍCIO AO, SOUZA AP, LINE SRP, & SILVA AF, DEMARCO FF, ETGES A, PIVA E. Addition of zinc methacrylate in dental polymers: MMP-2 inhibition and ultimate tensile strength evaluation. **Clinical Oral Investigation**, v.16, p.531–536, 2012

HERRERA, M.; CASTILLO, A.; BRAVO, M.; LIÉBANA, J.; CARRIÓN, P. Antibacterial activity of resin adhesives, glass ionomer and resin-modified glass ionomer cements and a compomer in contact with dentin caries samples. **Operative Dentistry**, v.25, n.4, p.265-269, 2000.

INGMAN, T.; SORSA, T.; LINDY, O.; KOSKI, H.; KONTTINEN, Y.T. Multiple forms of gelatinases/type IV collagenases in saliva and gingival crevicular fluid of periodontitis patients. **Journal of Clinical Periodontology**, v.21, n.1, p.26-31, 1994.

ISMAIL, A.I.; SOHN, W.; TELLEZ, M.; AMAYA, A.; SEN, A.; HASSON, H.; PITTS, N.B. The international caries detection and assessment system (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 35, p. 170–178, 2007.

JORDAN, R. E.; SUZUKI, M. Conservative treatment of deep carious lesions. **Journal of Canadian Dental Association**, v.37, n.9, p.337-342, 1971.

KATO, M. T., LEITE, A. L., HANNAS, A. R., AND BUZALAF, M. A. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. **Journal of Dental Research**, v. 89, p. 468–472, 2010.

KATO, M.T.; BOLANHO, A.; ZARELLA, B.L.; SALO, T.; TJÄDERHANE, L.and BUZALAF, M.A.R. Sodium Fluoride Inhibits MMP-2 and MMP-9. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 1, p. 74-77, 2014.

KATZ, S.; PARK, K.K.; PALENIK, C.J. In-vitro root surface caries studies. **Journal of oral medicine**, v. 42, p. 40-48, 1987.

KAWASAKI, K.; FEATHERSTONE, J.D. Effects of collagenase on root demineralization. **Journal of Dental Research**, v. 76, p. 588–595, 1997.

KIDD, E.A.M. How 'Clean' Must a Cavity Be before Restoration? **Caries Research**, v.38, p.305–313, 2004.

KIDD, E.A.M. Clinical Threshold for Carious Tissue Removal. **Dental Clinics of North America**, v.54, n.3, p.541–549, 2010.

LARSEN, K.S.; AULD, D.S. Characterization of an inhibitory metal binding site in carboxypeptidase A. **Biochemistry**, v. 30, p. 2613–8, 1991.

LEE, H.L.; LIU, J.; CLARKSON, B. H.; LIN, C. P.; GODOVIKOVA, V.; RITCHIE, H.H. Dentin-pulp complex response to carious lesions. **Caries Research**, v.40, p.256-264, 2006.

LEKSELL, E.; RIDELL, K.; CVEK, M.; MEJÅRE, I. Pulp exposure after stepwise versus direct complete excavation of deep carious lesions in young posterior permanent teeth. **Endodontics & Dental Traumatology**, v.12, p.192-196, 1996.

LIPPERT, F. Dose-Response Effects of Zinc and Fluoride on Caries Lesion Remineralization. **Caries Research**, v. 46, p. 62–68, 2012.

LU, Y.; PAPAGERAKIS, P.; YAMAKOSHI, Y.; HU, J.C.; BARTLETT, J.D.; SIMMER, J.P. Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. **Biological Chemistry**, v. 389, p. 695–700, 2008.

LYNCH, R.J.; CHURCHLEY, D.; BUTLER, A.; KEARNS, S.; THOMAS, G.V.; BADROCK, T.C.; COOPER, L.; HIGHAM, S.M. Effects of Zinc and Fluoride on the Remineralisation of Artificial Carious Lesions under Simulated Plaque Fluid Conditions. **Caries Research**, v. 45, p. 313–322, 2011.

MADLÉNA, M. Experiences with amine fluoride containing products in the management of dental hard tissue lesions focusing on Hungarian studies: A review. **Acta Medica Academica**, v.42, n. 2, p. 189-197, 2013.

MAGALHÃES, A.C.; COMAR, L.P.; RIOS, D.; DELBEM, A.C.; BUZALAF, M.A. Effect of a 4% titanium tetrafluoride (TiF₄) varnish on demineralisation and remineralisation of bovine enamel in vitro. **Journal of Dentistry**, v.36, n. 2, p. 158-62, 2008.

MAGALHÃES, A.C.; WIEGAND, A.; RIOS, D.; BUZALAF, M.A.; LUSSI, A. Fluoride in dental erosion. **Monographs in Oral Science**, v.22, p. 158-70, 2011.

MÄKINEN, K.K. Demonstration of collagenolytic enzyme activity in human **carious** dentine. **Caries Research**, v. 5, n. 1, p. 25-6, 1971.

- MALTZ, M.; DE OLIVEIRA, E.F.; FONTANELLA, V.; BIANCHI, R.A. clinical, microbiologic, and radiographic study of deep caries lesions after incomplete caries removal. **Quintessence International**, v.33, n.2, p.151-159, 2002.
- MALTZ, M.; ALVES, L.S.; JARDIM, J.J.; MOURA, MDOS S.; DE OLIVEIRA, E.F. Incomplete caries removal in deep lesions: a 10-year prospective study. **American Journal of Dentistry**, v.24, n.4, p.211-214, 2011.
- MARINHO, V.C. Cochrane reviews of randomized trials of fluoride therapies for preventing dental caries. **European Archives of Paediatric Dentistry**, v. 10, n. 3, p. 183-91, 2009.
- MARTIN-DE LAS HERAS, S.; VALENZUELA, A.; OVERALL, C.M. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. **Archives of Oral Biology**, v.45, n.9, p.757-65, 2000.
- MARTINS, C. Manual de análise de dados quantitativos com recurso ao IBM SPSS: saber decidir, fazer, interpretar e redigir. Braga: **Psiquilibrios Edições**, 2011.
- MEI, M.L.; , LI, Q.L.; CHU, C.H.; YIU, C.K.; LO, E.C. The inhibitory effects of silver diamine fluoride at different concentrations on matrix metalloproteinases. **Dental Materials**, v. 28, p. 903–908, 2012.
- MASKOS, K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. **Biochimie**, v.87, n. 3-4, p. 249-63, 2005.
- MUNDORFF, S.A.; LITTLE, M.F.; BIBBY, B.G. Enamel dissolution. II. Action of titanium tetrafluoride. **Journal of Dental Research**, v. 51, n. 6, p. 1567-71, 1972.
- MAZZONI, A.; MANNELLO, F.; TAY, F.R.; TONTI, G.A.; PAPA, S.; MAZZOTTI, G.; DI LENARDA, R.; PASHLEY, D.H.; BRESCHI, L. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. **Journal of Dental Research**, v.86, n.5, p.436-440, 2007.
- MAZZONI, A.; PASHLEY, D. H.; TAY, F. R.; GOBBI, P.; ORSINI, G.; RUGGERI, A., JR.; CARRILHO, M.; TJADERHANE, L.; DI LENARDA, R.; BRESCHI, L. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: Correlative FEI-SEM/TEM analysis. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.88, n.3, p.697- 703, 2009.
- MICKENAUTSCH, S.; YENGOPAL, V.; BANERJEE, A. Pulp response to resin-modified glass ionomer and calcium hydroxide cements in deep cavities: A quantitative systematic review. **Dental Materials**, v. 26, p. 761–770, 2010.

MIZUNO, M.; BANZAI, Y. Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated fibronectin gene expression in dental pulp cells and the differentiation of dental pulp cells to mineralized tissue forming cells by fibronectin. **International Endodontics Journal**, v. 41, p. 933– 938, 2008.

MONICI, M. "Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications". **Biotechnology Annual Review**, v.11, n. 227–56, 2005.

NAIR, P.N.; DUNCAN, H.F.; PITTFORD, T.R.; LUDER, H.U. Histological, ultra-structural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. **International Endodontic Journal**, v. 41, p. 128-150, 2008.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**, v. 15, n. 69(3), p. 562-73, 2006.

NASCIMENTO, F.D.; MINCIOTTI, C.L.; GERALDELI, S.; CARRILHO, M.R.; PASHLEY, D.H.; TAY, F.R.; NADER, H.B.; SALO, T.; TJAØDERHANE, L.; TERSARIOL, I.L.S. Cysteine Cathepsins in Human Carious Dentin. **Journal of Dental Research**, v.90, n.4, p.506-511, 2011.

NASSUR. C.; ALEXANDRIA, A.K.; POMARICO, L.; DE SOUSA, V.P.; CABRAL, L.M.; MAIA, L.C. Characterization of a new TiF(4) and β -cyclodextrin inclusion complex and its in vitro evaluation on inhibiting enamel demineralization. **Archives of Oral Biology**, v. 58, n. 3, p. 239-47, 2013.

NEELAKANTAN, P.; RAO, C.V.; INDRAMOHAN, J. Bacteriology of deep carious lesions underneath amalgam restorations with different pulp-capping materials - an in vivo analysis. **Journal Applied Oral Science**, v.2, p.139-145, 2012.

NETUVELI, G.S.; SHEIHAM, A.A systematic review of the effectiveness of anticalculus dentifrices. **Oral Health & Preventive Dentistry**, v. 2, n. 1, p. 49-58, 2004.

NIU, L.N.; ZHANG, E.L.; JIAO, E.K.; LI, F.; DING, X.Y.; WANG, D.Y.; WANG, M.Q.; TAY, F.R.; CHEN, J.H. Localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. **Journal of Dentistry**, v.39, p.536–542, 2011.

ØGAARD, A.; AFZELIUS, A.L.M.; LARSSON, E.; ADOLFSSON, U. A prospective, randomized clinical study on the effects of an amine fluoride/stannous fluoride toothpaste/mouthrinse on plaque, gingivitis and initial caries lesion development in orthodontic patients. **European Journal of Orthodontics**, v. 28, p. 8–12, 2006.

OLIVEIRA, E.F.; CARMINATTI, G.; FONTANELLA, V.; MALTZ, M. The monitoring of deep caries lesions after incomplete dentine caries removal: results after 14-18 months. **Clinical Oral Investigation**, v.10, n.2, p.134-139, 2006.

OKIJI, T.; YOSHIBA, K. Reparative Dentinogenesis Induced by Mineral Trioxide Aggregate: A Review from the Biological and Physicochemical Points of View. **International Journal of Dentistry**, v.2009, Article ID 464280, 2009.

OLSSON, H.; PETERSSON, K.; ROHLIN, M. Formation of a hard tissue barrier after pulp cappings in humans. A systematic review. **International Endodontic Journal**, v.39, p.429–442, 2006.

OSORIO, R.; YAMAUTI, M.; OSORIO, E.; RUIZ-REQUENA, M.E.; PASHLEY, D.H.; TAY, F.R.; TOLEDANO, M. Zinc reduces collagen degradation in demineralized human dentin explants. **Journal of Dentistry**, v.39, p.148–153, 2011.

PALOSAARI H, PENNINGTON CJ, LARMAS M, EDWARDS DR, TJADERHANE L, SALO T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. **European Journal of Oral Sciences**, v. 111, p. 117–127, 2003.

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review - Part III: Clinical Applications, Drawbacks, and Mechanism of Action. **Journal of Endodontics**, v.36, n.3, p. 400-413, 2010.

RICKETTS, D.N.; KIDD, E.A.; INNES, N.; CLARKSON, J. Complete or ultraconservative removal of decayed tissue in unfilled teeth. **Cochrane Database Systematic Review**, v.19, n.3, 2006.

RUSSELL, A.D. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. **Journal of Hospital Infection**, v. 57, p. 97-104, 2004.

SANTOS, M.C.L.G.; DE SOUZA, A.P.; GERLACH, R.F.; TREVILATTO, P.C.; SCAREL-CAMINAGA, R.M. & LINE, S.R.P. Inhibition of human pulpal gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by zinc oxide cements. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 31, p. 660–664, 2004.

SANTOS, J.; CARRILHO, M.; TERVAHARTIALA, T.; SORSA, T.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; PASHLEY, D.; TAY, F.; FERRAZ, C.; TJADERHANE, L. Determination of matrix metalloproteinases in human radicular dentin. **Journal of Endodontics**, v.35, n.5, p.686-689, 2009.

SCHLUETER, N.; HARDT, M.; LUSSI, A.; ENGELMANN, F.; KLIMEK, J.; GANSS, C. Tin-containing fluoride solutions as anti-erosive agents in enamel: an in vitro tin-uptake, tissue-loss, and scanning electron micrograph study. **European Journal of Oral Sciences**, v. 117, p. 427–434, 2009.

SHIMADA, Y.; ICHINOSE, S.; SADR, A.; BURROW, M.F.; TAGAMI, J. Localization of matrix metalloproteinases (MMPs-2, 8, 9 and 20) in normal and carious dentine. **Australian Dental Journal**, v. 54, n. 4, p. 347-54, 2009.

SIDHU, S.K. Glass-ionomer cement restorative materials: a sticky subject? **Australian Dental Journal**, v.56, n.1, p.23-30, 2011.

SINHA, N.; GUPTA, A.; LOGANI, A.; SHAH, N. Remineralizing efficacy of silver diamine fluoride and glass ionomer type VII for their proposed use as indirect pulp capping materials - Part II (A clinical study). **Journal of Conservative Dentistry**, v.3, p.233-236, 2011.

SMITH, A.J.; CASSIDY, N.; PERRY, H.; BÈGUE-KIRN, C.; RUCH, J.V.; LESOT, H. Reactionary dentinogenesis. **The International Journal of Developmental Biology**, v.39, n.1, p.273-280, 1995.

SMITH, A. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: Growth factors as key mediators. **Journal of Dental Education**, v.67, n.6, p.678–689, 2003.

SMITH, A.J.; SCHEVEN, B.A.; TAKAHASHI, Y.; FERRACANE, J.L.; SHELTON, R.M.; COOPER, P.R. Dentine as a bioactive extracellular matrix. **Archives of Oral Biology**, v. 57, n. 2, p. 109-21, 2012.

SORSA, T.; DING, Y.L.; INGMAN, T.; SALO, T.; WESTERLUND, U.; HAAPASALO, M.; TSCHESCHE, H.; KONTTINEN, Y.T. Cellular source, activation and inhibition of dental plaque collagenase. **Journal of Clinical Periodontology**, v.22, n.9, p.709-717, 1995.

SOUZA, A.P.; GERLACH, R.F.; Line, S.R.P. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. **Dental Materials**, v. 16, p. 103–108, 2000.

SOUZA, A.P.; GERLACH, R.F.; Line, S.R.P. Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam. **Biomaterials**, v. 22, p. 2025-30, 2001.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual Review of Cell Developmental Biology**, v.17, p.463-516, 2001.

STOOKEY, G.K.; MAU, M.S.; ISAACS, R.L.; GONZALEZ-GIERBOLINI, C.; BARTIZEK, R.D.; BIESBROCK, A.R. The Relative Anticaries Effectiveness of Three Fluoride-Containing Dentifrices in Puerto Rico. **Caries Research**, v. 38, p. 542–550, 2004.

SULKALA, M.; WAHLGREN, J.; LARMAS, M.; SORSA, T.; TERONEN, O.; SALO, T. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. **Journal of Dental Research**, v.80, n.6, p.1545-1549, 2001.

SULKALA, M.; LARMAS, M.; SORSA, T.; SALO, T.; TJÄDERHANE, L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 9, p. 603-7, 2002.

SULKALA, M.; TERVAHARTIALA, T.; SORSA, T.; LARMAS, M.; SALO, T.; TJÄDERHANE, L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. **Archives of Oral Biology**, v.52, n.2, p.121-127, 2007.

TEZEL, H.; ERGUCU, Z.; ONAL, B. Effects of topical fluoride agents on artificial enamel lesion formation in vitro. **Quintessence International**, v. 33, p. 347–52, 2002.

THOMPSON, V.; CRAIG, R.; CURRO, F.; GREEN, W.; SHIP, J. Treatment of deep carious lesions by complete excavation or partial removal. **J Am Dent Assoc**, v.139, p.705–712, 2008.

TJÄDERHANE, L.; LARJAVA, H.; SORSA, T.; UITTO, V.J.; LARMAS, M.; SALO, T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. **Journal of Dental Research**, v.77, n.8, p.1622-1629, 1998.

TJÄDERHANE, L.; PALOSAARI, H.; WAHLGREN, J.; LARMAS, M.; SORSA, T.; SALO, T. Human Odontoblast Culture Method: The Expression of Collagen and Matrix Metalloproteinases. **Advances in Dental Research**, v.15, p.55-58, 2001.

TOLEDANO, M.; NIETO-AGUILAR, R.; OSORIO, R.; CAMPOS, A.; OSORIO, E.; TAY, F.R.; ALAMINOS, M. Differential expression of matrix metalloproteinase-2 in human coronal and radicular sound and carious dentine. **Journal of Dentistry**, v.38, p.635–640, 2010.

TOMSON, P.L.; GROVER, L.M.; LUMLEY, P.J.; SLOAN, A.J.; SMITH, A.J.; COOPER, P.R. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. **Journal of Dentistry**, v.35, n.8, p.636-642, 2007.

TORABINEJAD, M.; HONG, C. U.; MCDONALD, F.; PITT FORD, T. R. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. **Journal of Endodontics**, v.21, n.7, p.349–353, 1995.

TUBERT-JEANNIN, S.; AUCLAIR, C.; AMSALLEM, E.; TRAMINI, P.; GERBAUD, L.; RUFFIEUX, C.; SCHULTE, A.G.; KOCH, M.J.; RÉGE-WALTHER, M.; ISMAIL, A. Fluoride supplements (tablets, drops, lozenges or chewing gums) for preventing dental caries in children. **Cochrane Database Systematic Review**, v.7, n.12, 2011.

TVEIT, A.B.; HALS, E.; ISRENN, R.; TOTDAL, B. Highly acid SnF₂ and TiF₄ solution. Effect on and chemical reaction with root dentin in vitro. **Caries Research**, v. 17, n. 5, p. 412–8, 1983.

TZIAFAS, D.; SMITH, A.J.; LESOT, H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. **Journal of Dentistry**, v.28, p.77-92, 2000.

VAN RIJKOM, H.; RUBEN, J.; VIEIRA, A.; HUYSMANS, M.C.; TRUIN, G.J.; MULDER, J. Erosion-inhibiting effect of sodium fluoride and titanium tetrafluoride treatment in vitro. **European Journal of Oral Sciences**, v. 11, p. 253–7, 2003.

VAN STRIJP, A.J.; JANSEN, D.C.; DEGROOT, J.; TEN CATE, J.M.; EVERTS, V. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. **Caries Research**, v.37, n.1, p.58-65, 2003.

VIDAL, C.M.; TJÄDERHANE, L.; SCAFFA, P.M.; TERSARIOL, I.L.; PASHLEY, D.; NADER, H.B.; NASCIMENTO, F.D.; CARRILHO, M.R. Abundance of MMPs and cysteine cathepsins in caries-affected dentin. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 3, p. 269-74, 2014.

VIEIRA, A.; RUBEN, J.L.; HUYSMANS, M.C. Effect of titanium tetrafluoride, amine fluoride and fluoride varnish on enamel erosion in vitro. **Caries Research**, v. 39, p. 371–9, 2005.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. **Circulation Research**, v.92, p.827-839, 2003.

WEINER, R. Liners and bases in general dentistry. **Australian Dental Journal**, v.56, n.1, p.11-22, 2011.

WHITE, D.J.; BARKER, M.L.; KLUKOWSKA, M. In vivo antiplaque efficacy of combined antimicrobial dentifrice and rinse hygiene regimens. **American Journal of Dentistry**, v. 21, n.3, p. 189-96, 2008.

WIEGAND, A.; MAGALHÃES, A.C.; ATTIN, T. Is titanium tetrafluoride (TiF₄) effective to prevent carious and erosive lesions? A review of the literature. **Oral Health & Preventive Dentistry**, v. 8, n. 2, p. 159-64, 2010.

YONEYAMA, A.; SHIMIZU, M.; TABATA, M.; YASHIRO, J.; TAKATA, T.; HIKIDA, M. In vitro short-time killing activity of povidone-iodine (Isodine Gargle) in the presence of oral organic matter. **Dermatology**, v. 212; p. 103-8, 2006.

ZANDER, H.A. Reaction of the pulp to calcium hydroxide. **Journal of Dental Research**, v.18, p.373–379, 1939.

Apêndice

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este termo tem o objetivo de informar os pacientes sobre a pesquisa intitulada: **Avaliação dos fluoretos TiF_4 , SnF_2 e ZnF_2 e NaF na expressão das MMP-2 e MMP-9 salivares humanas**, e receber o consentimento para participar do projeto.

Estas informações foram dadas pela doutoranda Eliana do Nascimento Torre (cel.91051937) e pelos Prof.^a Dr.^a Elenara Ferreira de Oliveira, Prof.^a Dr.^a Adriana Etges e Prof. Dr. Fábio Renato Manzolli Leite.

Objetivo principal: Avaliar algumas enzimas provenientes da saliva, quando testadas com fluoretos.

1. **Justificativa:** Algumas enzimas, provenientes da saliva, conhecidas como Metaloproteinsases da Matriz, participam da cárie dentária. Seria interessante a inibição destas por meio de soluções de fluoretos.
2. **Procedimento:** O voluntário, só terá que fazer a doação de sua saliva total, após um período de 12 horas sem utilização de dentifrício contendo flúor.
3. **Desconforto esperado:** Não há nenhum desconforto, nem risco com a doação.
4. **Recusa à participação no projeto ou retirada do consentimento:** O paciente também poderá, a qualquer momento, retirar seu consentimento de participar da pesquisa.
5. **Sigilo:** não será divulgado qualquer dado pessoal do paciente ou algo que possa identificá-lo quando a pesquisa for publicada.

Eu,..... após a leitura deste documento e de outras explicações dadas pelos pesquisadores autorizo os mesmos a utilizarem minha saliva doada, para pesquisa. Declaro que estou plenamente de acordo com o experimento. Assim, eu autorizo a execução do trabalho de pesquisa, exposto acima.

Pelotas, ____/____/____

.....
Assinatura

.....
nº do RG

ANEXO

ANEXO A



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

PELOTAS, 13 de maio de 2008.

PARECER Nº 15/2008

O projeto de pesquisa intitulado: “ **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS METALOPROTEINASES EM LESÕES PROFUNDAS DE CÁRIE, APÓS A REMOÇÃO PARCIAL DA DENTINA CARIADA** ” está constituído de forma adequada, cumprindo, na suas plenitudes preceitos éticos estabelecidos por este Comitê e pela legislação vigente, recebendo, portanto, **PARECER FAVORÁVEL** à sua execução.



Prof.º Marcos Antonio Torriani
Coordenador do CEP/FO/UFPel.

Prof. Marcos A. Torriani
Coordenador
Comitê de Ética e Pesquisa