

**Universidade de Mogi das Cruzes**

**Christiane Laporta Minciotti**

**PARTICIPAÇÃO DE CISTEÍNO-  
PROTEINASES E METALOPROTEINASES NO  
DESENVOLVIMENTO DA CÁRIE DE  
DENTINA**

**Dissertação apresentada à Universidade de Mogi das Cruzes  
para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.  
Área de Concentração: Ciências Biológicas.**

**Prof. Orientador Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol**

**MOGI DAS CRUZES, SP  
2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Minciotti, Christiane Laporta

Participação de cisteino-proteinasas e metaloproteinasas no desenvolvimento da cárie de dentina. – 2006.

60 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -  
Universidade de Mogi das Cruzes, 2006.

Área de concentração: Odontologia

Orientador : Prof. Dr. Ivane Luis dos Santos Tersariol

1. Cárie de dentina 2. Cisteino-proteinasas 3.  
Catepsina B 4. Metaloproteinasas I. Título II. Tersariol,  
Ivane Luis dos Santos

CDD 617.67

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Gilberto Laporta e Joceli Cruz Laporta, por toda luta, ensinamentos, compreensão e amor incondicional que sempre me deram durante a trajetória da minha vida. Obrigada pelo incentivo em cada batalha.

Ao meu marido, Fernando Garbelotti Minciotti, que sempre me apoiou, proporcionando-me segurança e determinação para que eu pudesse seguir sempre em frente. Obrigada pelo carinho e ensinamentos que me oferece diariamente.

Ao meu irmão, Fabiano Cruz Laporta e minha cunhada, Adriana Casemiro Palos, pela amizade, amor, carinho e por compreenderem minha ausência nos momentos de descontração.

Aos meus sogros, Silvio Augusto Minciotti e Leila Maria Garbelotti Minciotti, pelo carinho, apoio, exemplo e incentivo que sempre me deram.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol, pela paciência, compreensão, apoio, confiança, incentivo e amizade que teve durante esses quatro anos de luta. Muito obrigada por tudo!

Dedico esse trabalho a vocês, minha família, que são a minha base e a razão para que eu possa viver feliz e comemorar cada conquista na minha vida.

Amo vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol, pela sua determinação, entusiasmo em cada resultado obtido, pela amizade e por todos os ensinamentos que me proporcionou. Obrigada pela excelente orientação!

Ao Prof. Dr. Saulo Geraldeli pela dedicação, contribuição e esforços dedicados a esse trabalho.

A amiga Edith que sempre esteve disposta a ajudar. Teve grande participação no meu trabalho experimental. Muito obrigada pela sua amizade e apoio.

Aos colegas do Mestrado em Biotecnologia que me apoiaram nos momentos difíceis e muito me ensinaram.

Aos colegas do CIIB pelos ensinamentos e ajuda que me proporcionaram.

Aos professores do Mestrado em Biotecnologia, que através de suas disciplinas contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos professores Dr. Camillo Anauate Netto e Dra. Cláudia Bincolleto Trindade, por terem feito parte da banca de qualificação. Obrigada pelos elogios e pelas sugestões oferecidas.

Aos professores que compõem a banca examinadora por disponibilizarem seu precioso tempo para avaliar e julgar este trabalho.

## RESUMO

Devido ao seu papel de degradar o colágeno tipo I da matriz extracelular de células de origem mesenquimal, decidimos estudar o envolvimento das cisteíno-proteínases lisossomais, bem como, das metaloproteinases no processo de formação e desenvolvimento de lesões cariosas de dentina. Verificamos que os processos cariosos agudos, proliferativos, apresentam uma grande quantidade de enzimas proteolíticas (cisteíno-proteínases e MMPs) ativas na lesão em relação aos processos crônicos, não proliferativos. A elevada quantidade de enzimas proteolíticas presentes nas lesões cariosas agudas determinam a rápida progressão da lesão com grande destruição da matriz dentinária. Aparentemente, as MMPs da cavidade bucal, da saliva e da microflora bacteriana, são importantes fatores de iniciação de lesão cariada na dentina. As cisteíno-proteínases e MMPs endógenas do dente, produzidas pelos odontoblastos e tecido pulpar em resposta ao processo inflamatório deflagrado pelos microorganismos na dentina, contribuem para a progressão da lesão cariada até a destruição total do tecido pulpar. A virulência do processo carioso agudo depende da idade do paciente, de forma geral, os pacientes mais jovens sofrem maior destruição do tecido dentinário do que os pacientes mais idosos, pois verificamos elevada concentração de cisteíno-proteínases e de metaloproteinases nas lesões cariadas em pacientes jovens. Esse fato parece estar relacionado com o processo de atresia dos canalículos dentinários que se inicia a partir dos 20 anos de idade e progride de acordo com o envelhecimento. Desta forma, a atresia dos canalículos da dentina dificulta a propagação da lesão aguda em pacientes idosos e favorece o processo de cronificação da lesão cariada.

## **ABSTRAT**

Due to their role in degrading the type I collagen from extracellular matrix of mesenchymal origin cells, we have decided to study the cysteine-proteinases and the metalloproteinases involvement in the formation of dental caries lesion process. During said studies, we were able to verify that there is a great amount of active proteolytic enzymes (cysteine-proteinases and MMP's) in the processes of acute dental caries, a proliferative process, which are active on lesions in relation to chronic (non proliferative) processes. The high quantity of proteolytic enzymes on the acute dental caries lesions determines such lesion fast progress, with great destruction of the dentine matrix. Apparently, the MMP's from the buccal cavity, from saliva and from bacterial microflora are the most relevant factors in order to initiate dental caries lesions. The cysteine-proteinases and MMP's from odontoblasts and pulp, in response to the inflammatory process broken out by the microorganisms that exist in the dentine, contribute to the progress of dental caries lesions up to the total destruction of the pulp. The virulence of the acute dental caries lesions depends on how old the patient is. Younger patients generally suffer bigger destruction of the dentine matrix, whereas older patients do not normally suffer that much, since we were able to verify high concentration of cysteine-proteinases and of MMPs on dental caries lesions in younger patients. This occurrence may be related to the narrowing process of dentine tubules that starts when the patient is 20 years old, and continues as the patient gets older. As a conclusion, the narrowing process of dentine tubules makes the propagation of acute dental lesion more difficult in older patients.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Risco Real de Cárie: Círculo Completo e Quebra do Círculo.....	11
<b>Figura 2.</b>	Quantidade de Cisteíno-Proteinases em Lesões Cariotas .....	29
<b>Figura 3.</b>	Quantidade de Cisteíno-Proteinases em Cáries Crônicas e Agudas .....	30
<b>Figura 4.</b>	Quantidade das Cisteíno-Proteinases em Função da Exposição Pulpar....	31
<b>Figura 5.</b>	Quantidade de Metaloproteinases em Lesões Cariotas .....	32
<b>Figura 6.</b>	Quantidade de Metaloproteinases em Cáries Crônicas e Agudas .....	33
<b>Figura 7.</b>	Quantidade de Metaloproteinases em Função da Exposição Pulpar.....	34
<b>Figura 8.</b>	Quantidade de Cisteíno-Proteinases em Função da Profundidade da Lesão Cariota Aguda .....	35
<b>Figura 9.</b>	Quantidade de Metaloproteinases em Função da Profundidade da Lesão Cariota Aguda .....	36
<b>Figura 10.</b>	Quantidade de Cisteíno-Proteinases em Lesões Cariotas Crônicas e Agudas em Função da Faixa Etária .....	37
<b>Figura 11.</b>	Quantidade de Cisteíno-Proteinases em Lesões Cariotas que Apresentam Exposição Pulpar em Função da Faixa Etária.....	38
<b>Figura 12.</b>	Quantidade de MMPs em Lesões Cariotas Crônicas e Agudas em Função da Faixa Etária.....	39
<b>Figura 13.</b>	Quantidade de MMPs em Lesões Cariotas que Apresentam Exposição Pulpar em Função da Faixa Etária.....	40
<b>Figura 14.</b>	Imagem Radiográfica de Lesões Cariotas Crônica e Aguda .....	41
<b>Figura 15.</b>	Detecção de Catepsina B por Reação de Imuno-Histoquímica em Dentina Humana Sadia .....	42

<b>Figura 16.</b> Quantidade de Cisteíno-Proteinases na Saliva de Pacientes Saudáveis e Pacientes Portadores de Cáries Crônicas e Agudas.....	43
<b>Figura 17.</b> Quantidade de Metaloproteinases na Saliva de Pacientes Saudáveis e Pacientes Portadores de Cáries Crônicas e Agudas.....	44

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	20
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	21
3.1 Materiais .....	21
3.2 Casuística .....	21
3.2.1 Coleta e Classificação do Tecido Cariado .....	21
3.2.2 Coleta de Tecido Cariado de Acordo com a Profundidade da Lesão .....	22
3.2.3 Coleta de Dentes com a Coroa Hígida .....	23
3.2.4 Coleta de Saliva dos Pacientes .....	23
3.2.5 Obtenção do Homogenato do Material Coletado .....	24
3.3 Dosagem de Proteínas .....	24
3.4 Dosagem de Proteinases Presentes no Tecido Cariado .....	24
3.4.1 Dosagem de Cisteíno-Proteinase e Catepsina B .....	24
3.4.2 Dosagem de Metaloproteinases (MMPs) .....	25
3.4.3 Dosagem de Serino-Proteinases .....	26
3.5 Detecção da Catepsina B em Cortes Histológicos .....	27
3.6 Radiografias Periapicais .....	28
3.7 Análise Estatística .....	28
<b>4. RESULTADOS</b> .....	29
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	45
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	52
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	53

# 1. INTRODUÇÃO

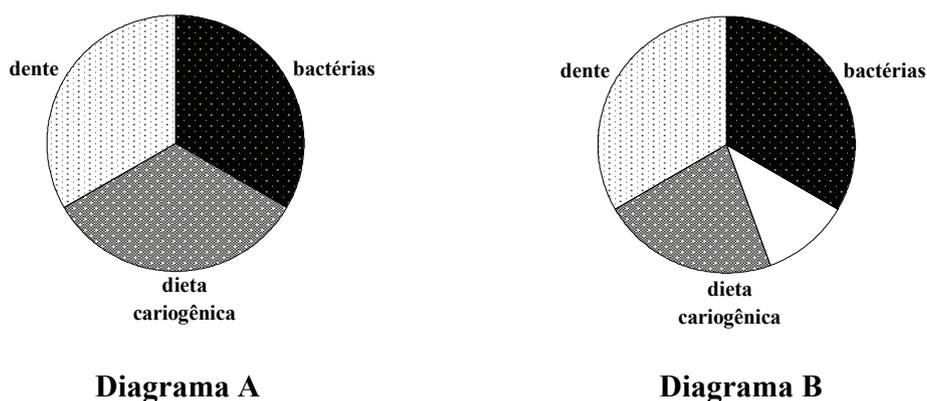
A dentina representa o produto final maduro da diferenciação e maturação das células da polpa. É essencial que o clínico tenha em mente essa relação no tratamento da cárie. Embriologicamente, a polpa se origina do mesênquima indiferenciado da papila dentária do germe em desenvolvimento. Os odontoblastos maduros são derivados dessa estrutura. A dentina é o produto final da atividade odontoblástica. A estrutura da porção madura e mineralizada da dentina são caracterizadas por uma rede altamente organizada de microtúbulos ou canaliculos (dentina pericanalicular e dentina intercanalicular) que se originam radialmente na polpa e terminam na junção amelodentinária. Histologicamente existe uma relação inseparável entre a dentina e a polpa. Os odontoblastos, localizados na periferia da polpa, na junção com a pré-dentina, consistem em um corpo celular e um longo e afilado processo citoplasmático ou cauda. Qualquer irritação na dentina induz a uma pulpite com graus variáveis de intensidade, com resultante estimulação de formação de dentina reparativa (dentina esclerosada) e calcificações intracanaliculares ocasionais. Portanto, a relação entre os odontoblastos e seus processos com a dentina é muito íntima e pode ser comparada aos osteoblastos com o osso (MENAKER, 1984).

A cárie é uma doença multifatorial, na qual há a participação de três fatores principais: 1) o hospedeiro, primariamente a saliva e os dentes; 2) a microbiota bucal e 3) o substrato (dieta). É importante que se leve em conta o tempo da doença quando se discute a etiologia da cárie. Assim, para que haja o desenvolvimento da cárie, condições favoráveis deverão existir em cada fator (NEWBRUM, 1983).

Deste modo, requer-se um hospedeiro susceptível, uma microbiota cariogênica e um substrato acidogênico, os quais devem estar presentes na boca por um determinado período.

A atividade ou a incidência da cárie pode ser interpretada, em termos gerais, como a velocidade com que a dentição é destruída pela cárie, representa a soma de novas lesões cariosas e aumento das lesões por unidade de tempo. Desta forma, considera-se alto um grande número de novas lesões cariosas que se desenvolvem num curto período de tempo. A atividade de cárie ainda poderá ser alta, mesmo que nenhuma lesão cariosa seja registrada no exame clínico. Isso ocorre pelo fato que se leva algum tempo para que as lesões cariosas se estabeleçam e alcancem um estágio no qual elas possam ser clinicamente registradas. Assim, os fatores que promovem cárie podem estar presentes, muito embora nenhuma lesão seja observada. Por essa razão adotou-se o termo: Risco Real de Cárie (KRASSE, 1986).

O Cariograma (programa de computador) avalia o risco real de cárie de acordo com a microbiota, a dieta e o hospedeiro (dente). Diagramas indicam se o indivíduo vai apresentar lesão cariosa ou não, durante o momento atual, com os hábitos que ele já possui (BRATTHAL, 1996).



**Figura 1. Círculo Completo e Quebra do Círculo.** O *diagrama A*, representado pelo círculo completo ilustra uma situação desfavorável, onde a cavidade cariosa poderá ocorrer. Bactérias cariogênicas estão presentes em grande número; a dieta é cariogênica e hospedeiro susceptível, compõem condições críticas. O *diagrama B* representa a quebra do círculo, situação em que ocorre a diminuição ou ausência de um desses três fatores, que indica uma situação favorável. Nesse caso, a possibilidade de não ocorrer a cavidade da

lesão cariiosa aumenta. O aumento ou diminuição de uma das frações do diagrama é proporcional ao risco real de cárie.

Exames salivares e microbiológicos também podem ser de grande valor para diagnóstico, dando informações objetivas e suplementares que, conseqüentemente, auxiliam o tratamento. Diferentes fatores salivares e microbiológicos têm sido associados com o desenvolvimento da cárie (MANDEL e WOTMAN, 1976), como as principais bactérias cariogênicas, que pertencem aos gêneros dos *Streptococcus* e dos *Lactobacillus* (CROSSNER, 1981; KLOCK e KRASSE, 1977). A quantidade de placa bacteriana, também tem sido associada com o processo cariogênico (THEILADE, 1976). Fatores salivares correspondentes, tais como a taxa de secreção salivar, o pH e capacidade tamponante da saliva, também têm sido investigados no processo cariogênico (MANDEL e WOTMAN, 1976).

A cárie é um processo infeccioso cujo grau de destruição depende de alguns fatores importantes como: a capacidade estrutural local dos tecidos para resistir às forças destrutivas; a capacidade de defesa sistêmica ou fatores imunológicos para combater a infecção e a virulência dos microorganismos etiológicos (MENAKER, 1984).

Alguns microorganismos são mais importantes que outros na patogenia da cárie dentária, como o *Streptococcus mutans*, o *Lactobacillus* e algumas espécies de *Actinomyces*. O primeiro está geralmente associado com a fase inicial da cárie, os lactobacilos com o desenvolvimento posterior da lesão e o *Actinomyces* com a cárie de raiz dentária. Tanto o *Streptococcus mutans* quanto o *Lactobacillus* têm a capacidade de proliferarem em pH ácido, ao redor de 5,0, e também são capazes de acidificar o meio, mantendo, assim, o pH do meio ácido, devido a produção de ácido lático. O pH ácido favorece o estabelecimento de *Streptococcus mutans* sobre a superfície dentária. A capacidade de crescimento microbiano e a produção de ácido são de máxima importância

para o desenvolvimento da cárie (NEWBRUM, 1983; KRASSE, 1986). Os *Lactobacillus* também podem estar intimamente associados à cárie, pelo menos em circunstâncias específicas. A principal condição que favorece a proliferação desses microorganismos é a alta e freqüente ingestão de açúcar entre as refeições. Na verdade, o número de *Lactobacillus* na cavidade bucal, relaciona-se até certo ponto, com ingestão de carboidratos (HÖFLING, 1992).

A alta prevalência de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* na placa bacteriana, geralmente resulta em número alto destes microorganismos na saliva. Por essa razão, as amostras de saliva podem ser usadas nos exames microbiológicos.

O processo de cárie inicia-se com a desmineralização do esmalte dentário, com a perda da matriz inorgânica de hidroxiapatita. Essa perda se inicia com a produção de ácido pelas bactérias da cavidade bucal (*Streptococcus mutans* e outros). A desmineralização ocorre quando o pH da placa está abaixo de 5,5 (HOUTE, LOPMAN e KENT, 1994).

A desmineralização é seguida pela destruição da matriz orgânica de colágeno da dentina. Essa degradação da matriz orgânica é causada por proteinases. Embora várias bactérias orais possam produzir enzimas proteolíticas, não há evidências que as enzimas bacterianas sejam capazes de degradar o colágeno, glicoproteínas e proteoglicanos da matriz orgânica da dentina e diretamente promovam a progressão da lesão cariada. Ao contrário disso, experimentos *in vitro* têm mostrado que bactérias cariogênicas podem causar desmineralização somente na interface esmalte-dentina. Bactérias colhidas de lesões cariosas *in situ* não foram capazes de promover a degradação de colágeno *in vitro*. Pesquisas demonstraram que a matriz da dentina cariada é menos susceptível a degradação pela colagenase bacteriana purificada (KATZ, PARK e PALENIK, 1997; STRIJP, STEENBERGEN e CATE, 1997). Desta forma, esses resultados indicam que a grande

degradação da matriz extracelular da dentina observada nos processos cariosos não se deve somente à presença de proteinases bacterianas.

Os *Streptococcus mutans* apresentam um potencial de produzir cárie muito superior ao de qualquer outro microorganismo acidogênico da placa supragengival. Dados da literatura mostram que as placas bacterianas removidas das áreas cariadas são processos bacteriológicos e bioquimicamente diferentes das placas provenientes de zonas dentárias sadias. Assim sendo, esses dados mostram que o desenvolvimento das lesões de cárie deve-se à ação de uma flora microbiota mais específica. Os *Streptococcus mutans* são os principais produtores de acidez na cavidade bucal. A desmineralização do esmalte ocorre quando o pH é abaixado ao nível da acidez necessária para se iniciar o processo (pH crítico). Verificou-se que, em pH 5,0, os *Streptococcus mutans* e os *Lactobacillus casei* convertem a sacarose em ácido lático, enquanto os demais microorganismos da placa são virtualmente inoperantes. Esta é uma razão pela qual esses microorganismos são chamados de “estrategistas de pH”. Esses microorganismos, mesmo na ausência de sacarose, também são capazes de produzir ácido lático a partir de amilopectina como substrato (THYLSTRUP e FEJERKOV, 1995).

Foi demonstrado, em estudos recentes, que as concentrações de cálcio e polissacarídeos insolúveis na placa dental se mantêm constantes durante o decorrer do tempo, porém correlações significantes foram encontradas entre elas e a perda de dureza superficial do esmalte. Fatores salivares e níveis de *Streptococcus mutans* na placa bacteriana não apresentaram correlação significativa com a perda de dureza superficial do esmalte. Foi verificado que a desmineralização do esmalte depende do tempo e está mais relacionada à composição do biofilme formado do que aos fatores salivares estudados (TENUUDA et al, 2003).

O processo cariioso agudo progride lentamente na camada do esmalte e rapidamente na dentina. Esta alteração de ritmo de desenvolvimento pode ser explicada pela composição química do esmalte e da dentina.

O esmalte é composto basicamente de cristais inorgânicos de apatita, seu conteúdo protéico é escasso. A dentina consiste em grande parte de fibras colágenas nas quais cristais inorgânicos de apatita foram depositados. A fase orgânica ocupa a maior parte do espaço deste tecido. Cerca de 85 a 90 por cento do material orgânico da dentina é colágeno do tipo I (MENAKER, 1984).

O pH ácido derivado do metabolismo da placa bacteriana pode ser neutralizado por tampões salivares, de maneira que a desmineralização do esmalte progride lentamente. Uma vez ocorrida a formação de cavidade, e especialmente quando se estende para a dentina, a influência dos tampões salivares diminui. A lesão dentinária torna-se um sítio retentivo onde predominam os pHs baixos decorrentes da infecção bacteriana. O pH ácido, por sua vez, altera o microambiente, além de facilitar a solubilização dos minerais da dentina, o pH ácido desnatura o colágeno e favorece os microorganismos capazes de sobreviver e crescer em condições acídicas e talvez capazes de metabolizarem o colágeno desnaturado. Estes dois últimos fatores fazem com que as lesões de dentina sejam bastante distintas das lesões de esmalte e oferecem uma explicação para a rápida destruição do tecido dentinário. Quando a lesão progride na dentina, as condições podem ser tais que somente os microorganismos mais acídicos sobrevivem (LOESCHE, 1993).

A destruição ácida de um tecido com aproximadamente 30% de colágeno se difere da destruição de um tecido sem colágeno. Muito poucas bactérias da cavidade oral possuem colagenases. Todavia, o colágeno é prontamente desnaturado pelo pH ácido, formando gelatina, que por sua vez é degradada por muitos microorganismos da cavidade oral. Assim,

a seguinte seqüência é possível na lesão dentinária: o pH ácido solubiliza a porção mineral, expõe a matriz do colágeno e desnatura o mesmo. As proteinases bacterianas, bem como, as enzimas proteolíticas do próprio organismo presentes no processo inflamatório instalado na lesão cariada degradam a matriz extracelular da dentina. O processo é auto-repetitivo e determina a progressão da lesão (KATZ, PARK e PALENIK, 1997).

A cárie dentinária tem três zonas reconhecíveis. A *zona infectada* que é a área superficial que compreende o corpo da infecção cariada, onde a dentina encontra-se desmineralizada; a *zona afetada* localiza-se mais profundamente a dentina infectada, região onde a dentina está parcialmente desmineralizada, na qual retém muito de sua estrutura tubular, embora seu arranjo mostre-se mais distorcido na região mais próxima a zona infectada; e a *zona hipermineralizada* possui um conteúdo mineral aumentado, é encontrada no fronte ativo da lesão cariada em progressão, sua espessura varia com a intensidade e cronicidade do ataque, ou seja, é delgada ou ausente em casos de cárie aguda, porém, consideravelmente mais espessa em locais de progressão mais lenta (cárie crônica) (MENAKER, 1984).

Foi verificado que as bactérias acidogênicas são mais predominantes na lesão do esmalte, enquanto as bactérias que produzem enzimas proteolíticas predominam na dentina cariada. Estes microorganismos proteolíticos são heterogêneos, mas entre eles são encontrados estreptococos anaeróbios, micrococos e membros do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas*. *Clostridium welchii* foi detectado em cerca de 60% de 252 dentes cariados e possui colagenase, a bactéria *Rothia dentocariosa* é capaz de degradar o colágeno desnaturado. Estes estudos indicam que a placa bacteriana presente no esmalte, é diferente daquela encontrada na dentina cariada (LOESCHE, 1993).

A degradação da matriz extracelular de tecidos de origem mesenquimal, como a dentina, é mediada por proteinases pertencentes à família das cisteíno-proteinases e das metaloproteinases de matriz (LI; BRÖMME et al, 2004).

A matriz da dentina contém principalmente colágeno tipo I (LINDE e GOLDEBERG, 1993), há hipótese de que as metaloproteinases (MMPs) do hospedeiro também estejam envolvidas na progressão das lesões cariosas. No entanto, ainda é necessário investigar a atividade funcional das MMPs nas lesões cariosas. Já foram identificadas três MMPs humanas nas lesões cariosas pela técnica de “Western immunoblots”, são elas: MMP-2 (Gelatinase A); MMP-9 (Gelatinase B) e MMP-8 (colagenase-2) (TJÄDERHANE et al, 1998).

O pH ácido do meio promove a ativação da enzima MMP-9 (OKADA et al, 1995). As formas latentes da MMP-2 e MMP-8 também podem ser ativadas em condições ácidas seguida pela neutralização. Desta forma, supõe-se que o processo de acidificação do meio promova a ativação de vários membros da família das MMPs no processo cariogênico. Já está estabelecida a correlação da presença de MMPs com a progressão da cárie dental em dentes humanos. A ativação de MMPs latentes em pH 4,5, seguida de neutralização do pH, determina a ampla atividade de MMPs presentes em lesões de cárie (CLARKSON et al, 1986; TJÄDERHANE et al, 1999; PALOSAARI et al, 2000). A alteração de fases entre a desmineralização de dentina, em pH abaixo de 5,5, e fase de pH neutro devido o efeito tampão da saliva provém uma seqüência na qual as fibras de colágeno da matriz orgânica da dentina fiquem expostas e sejam degradadas pelas MMPs (KAWASAKI e FEATHERSTONE, 1997; TJÄDERHANE et al, 1998).

O processo exato da degradação da matriz da dentina ainda não é totalmente compreendido. Mas é sugerido que na lesão cariosa, as fibras de colágeno da dentina são

expostas pelo pH ácido, gerado pelas bactérias, durante o processo de desmineralização e conseqüentemente o colágeno torna-se susceptível a ação de colagenases da saliva do hospedeiro (TJÄDERHANE et al, 1999). A degradação do colágeno com simultânea desmineralização e alternância das fases de desmineralização e degradação são ambas necessárias para a formação da cárie (KATZ et al, 1997).

Dados da literatura mostram que além das MMPs, as cisteíno-proteinases lisossomais, catepsinas B, L, S e K, possuem importante atividade colagenolítica (LI,2004). Interessantemente, tem sido observado que a catepsina B é capaz de converter a proMMP-3 na sua forma ativa MMP-3 (BUCK et al, 1992). Dados da literatura mostram que a presença de catepsina B correlaciona-se com a presença de atividades de MMP-1, MMP-2 e MMP-9. Ainda, essas enzimas colagenolíticas foram detectadas sobre o colágeno da dentina em lesões miméticas ao processo cariioso (STRIJP et al, 2003). A forma livre da catepsina B é estável em pH neutro. Em condições acidogênicas a catepsina B é ativada e degrada colágeno tipo I (STRIJP et al, 2003). Esses dados, nos levaram a estudar o envolvimento das cisteíno-proteinases lisossomais e das MMPs sobre o processo de formação e desenvolvimento de cárie em dentina.

A catepsina B está presente no fluido gengival e também é encontrada na sua forma ativa em osteoblastos humanos. A interleucina 1- $\beta$  e o hormônio da paratiróide (PTH), nos ossos e dentes, controlam de modo específico a secreção celular de catepsina B e ácido láctico. A liberação de interleucina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) em processos inflamatórios, bem como, a liberação de PTH, promove a reabsorção óssea por estimular a atividade intra e extracelular da catepsina B (AISA et al, 2003). É sabido que a secreção de catepsina B, em tecido ósseo, além de ativar as MMP-2 e a MMP-9, também é capaz de promover uma cascata proteolítica pela conversão de pró-uPA em uPA (ativador urinário de plasminogênio) e de

pró-tPA em tPA (ativador tecidual de plasminogênio) e, dessa forma, ativar a produção de plasmina, que é uma enzima que possui elevada atividade proteolítica. (KOBAYASHI et al, 1991; LELOUP et al, 1991).

Estudos têm demonstrado que as catepsinas K, B e L lisossomais de osteoblastos degradam extracelularmente o colágeno tipo I em conjunto com as metaloproteinases. As catepsinas lisossomais têm sido apontadas como as principais enzimas que estão diretamente envolvidas na degradação do colágeno I em células mesenquimais (LI et al, 2004). Também, essas catepsinas têm um papel crucial na digestão intralisossomal das fibras de colágeno endocitadas. A atividade ácida de fosfatase e a distribuição imunocitoquímica de catepsina B foram encontradas em lisossomos e fagossomos de colágeno em osteoblastos. Dessa forma, além das funções de síntese e secreção de matriz óssea, os osteoblastos também são capazes de promover intensa remodelação desta matriz pela produção de enzimas proteolíticas que degradam o colágeno I (YAJIMA et al, 1999).

## **2. OBJETIVOS**

Devido ao seu papel de degradar o colágeno tipo I da matriz extracelular de células de origem mesenquimal, decidimos estudar o envolvimento das cisteíno-proteinasas lisossomais, bem como, das metaloproteinasas no processo de formação e desenvolvimento de lesões cariosas de dentina.

1. Correlacionar os teores das cisteíno-proteinasas e das metaloproteinasas das lesões cariosas de dentina com os processos agudos e crônicos da doença.
2. Correlacionar os teores das cisteíno-proteinasas e das metaloproteinasas das lesões cariosas de dentina com o grau de severidade da lesão cariosa.
3. Correlacionar os teores das cisteíno-proteinasas e das metaloproteinasas das lesões cariosas de dentina com a idade do paciente.
4. Verificar se as cisteíno-proteinasas e as metaloproteinasas são marcadores moleculares fidedignos para a monitoração da evolução da cárie de dentina.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Materiais**

- Agitador (Vórtex) – Modelo M16715, Thermolyne (Iown, EUA).
- Centrífuga High-Speed Micro Centrifuge – Modelo CF15R, Hitachi (Tóquio, Japão).
- Cubetas de quartzo de caminho óptico de 1 cm.
- Cureta McCall Inox Duflex 17/18 – Fabricante SSWhite.
- Espectrofluorímetro – Modelo F2500, Hitachi, equipado com termostizador de células (Tóquio, Japão).
- Espectrofotômetro UV-Vis fotodiodo – Modelo Multispec 1501, Shimadzu Scientific Instruments Inc., equipado com termostizador de células (Columbia, MD, EUA).
- Instrumento de alta rotação – Modelo Extra Torque 605 – Fabricante Kavo.
- Medido de pH – Modelo pH/ion analyser 455, Corning (NY, EUA).
- Potter-Elvehjem com pistilo de vidro
- Purificador de água Mili-Q – Modelo Water System Mili-Q™ (Bedford, EUA).
- Raio X odontológico – Gnatus.
- Seringa de vidro tipo Luer de 5 ml, com cânula fina acoplada.

#### **3.2 Casuística**

O protocolo utilizado foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa da UMC (processo CEP 127/2002, ver anexo).

### **3.2.1 Coleta e Classificação do Tecido Cariado**

Foram selecionados 39 pacientes entre homens e mulheres, brancos e negros, com faixa etária entre 5-55 anos de idade. Antes da coleta do tecido cariado, o paciente foi orientado a fazer bochecho com água, para eventual remoção de alimentos presentes na cavidade cariada.

Após detecção e identificação das lesões cáries humanas, o dente selecionado foi isolado com roletes de algodão e sua cavidade foi seca com bolinhas de algodão esterilizadas. O tecido lesionado foi coletado com o auxílio de uma cureta, imerso em 1,5 ml do tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM e imediatamente armazenado a -20 °C.

Inicialmente, os processos cáries foram classificados em processos crônicos e agudos, diferenciados entre si por intermédio de aspectos clínicos macroscópicos, através da análise da cor e da textura da lesão, como também por aspectos radiográficos, verificação da presença de tecido de cicatrização (dentina esclerosada), visualizada como sendo uma imagem radiopaca que aparece abaixo do tecido lesionado nos processos crônicos. Posteriormente, os processos cáries crônicos e agudos foram subdivididos em quatro grupos: 1) crônicos que não apresentam exposição pulpar, N= 11 pacientes (CCSEP); 2) crônicos que apresentam exposição pulpar, N= 9 pacientes (CCCEP); 3) agudos que não apresentam exposição pulpar, N= 10 pacientes (CASEP) e 4) agudos que apresentam exposição pulpar, N= 9 pacientes (CACEP).

### **3.2.2 Coleta de Tecido Cariado de Acordo com a Profundidade da Lesão**

Também, foi verificada a extensão das lesões agudas em dentes molares de acordo com sua profundidade no tecido dentário: 1) lesão superficial de dentina (profundidade entre 2-3 mm), N= 6 pacientes; 2) lesão profunda de dentina (profundidade entre 3-5 mm), N= 6 pacientes; 3) lesão com exposição pulpar, N= 5 pacientes. A faixa etária desses 22 pacientes variou entre 20-30 anos de idade.

### **3.2.3 Coleta de Dentes com a Coroa Hígida**

Foram coletados dentes com a coroa hígida: 1) dentes decíduos de crianças (6-10 anos), N= 6 pacientes, com indicação cirúrgica para exodontia, devido ao seu tempo de esfoliação; 2) dentes permanentes de adultos (18-30 anos), N= 5 pacientes, com indicação para exodontia, devido à falta de espaço (indicações ortodônticas) ou terceiro molar mal posicionado; 3) dentes permanentes de idosos (50-70 anos), N= 5 pacientes, com indicação para exodontia devido à periodontite com mobilidade grau 3.

Os dentes foram extraídos, imediatamente imersos em soro fisiológico, processados a 4 °C para a obtenção das camadas dentárias coronárias (esmalte, dentina e polpa). Após o resfriamento do dente por 15 min, o esmalte foi removido com o auxílio de instrumento rotatório de alta rotação (300.000 r.p.m., pressão de ar de 2,2 bar) com irrigação de 1,0 ml de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, o material, sob forma de pó, disperso no tampão foi armazenado a -20 °C. O mesmo procedimento foi realizado para obtenção da dentina. Já para a obtenção do tecido pulpar, a câmara pulpar foi exposta com o auxílio de instrumento rotatório de alta rotação e a polpa exposta foi coletada com o auxílio de uma

cureta (pulpotomia) e imersa no tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM e armazenada a -20 °C.

### **3.2.4 Coleta de Saliva dos Pacientes**

Foram coletados 0,5 ml de saliva, da região sublingual, utilizando-se uma seringa do tipo Luer, dos pacientes portadores de cárie e de pacientes sem lesão cariada. A saliva coletada foi diluída em 0,5 ml do tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,4 NaCl 100 mM e, imediatamente armazenadas a -20°C. As amostras foram classificadas em três grupos: 1) saliva de pacientes portadores de cárie aguda, N= 9 pacientes (SPCA); 2) saliva de pacientes portadores de cárie crônica, N= 8 pacientes (SPCC) e 3) saliva de pacientes não cariados, N= 9 pacientes (SPNC). As amostras de saliva foram analisadas para a determinação do perfil de enzimas proteolíticas e dosagem de proteínas.

### **3.2.5 Obtenção do Homogenato do Material Coletado**

O tecidos cariosos coletados foram imediatamente imersos em 1,0 ml da solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM e armazenados em freezer a -20 °C. Os tecidos cariados foram homogeneizados manualmente em Potter-Elvehjem com pistilo de vidro, a 4°C. O homogenato foi centrifugado a 10.000 x g. por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante obtido foi armazenado em freezer a -20 °C, para posteriores análises de teor de proteína solúvel, bem como, das enzimas proteolíticas.

## **3.3 Dosagem de Proteínas**

O teor de proteína das amostras dissolvidas em 0,1 ml do tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM foi analisado pelo método de Spector (SPECTOR,1978). O método

é baseado na propriedade das proteínas em solução interagirem com o reagente de Coomassie Blue e induzir metacromasia no corante, a qual foi mensurada a 595 nm em Espectrofotômetro Hitachi U-2000. A curva padrão da dosagem de proteína foi realizada com albumina bovina (1-30 µg) dissolvida em 0,1 ml de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM na presença de 1,9 ml do reagente de Coomassie Blue.

### **3.4 Dosagem de Proteinases Presentes no Tecido Cariado**

#### **3.4.1 Dosagem de Cisteíno-Proteinases e Catepsina B**

A atividade de cisteíno-proteinases presentes no homogenato tecidual foi monitorada pela hidrólise de substrato fluorogênico Z-F-R-MCA a 37 °C, utilizando espectrofluorímetro Hitachi F-2500. O comprimento de onda do fluorímetro foi ajustado para,  $\lambda_{\text{excitação}} = 380 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{emissão}} = 460 \text{ nm}$ . Foram utilizadas cubetas de caminho óptico de 10 mm, volume final de 2 ml. As soluções para reação foram mantidas no compartimento termostaticado a 37 °C durante 5 minutos antes da adição da enzima. Antes do ensaio, as cisteíno-proteinases presentes em 50 µl extrato bruto foram ativadas com DTT 2 mM, 5 min, a 37 °C em 450 µl do tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,3, NaCl 100 mM. A seguir foi adicionada à preparação enzimática 5 µM do substrato fluorogênico Z-F-R-MCA, num volume final de reação de 507 µl. Alíquotas de 100 µl da reação foram retiradas a cada 30 min, diluídas em 1,9 ml de H<sub>2</sub>O e a fluorescência decorrente da hidrólise do substrato Z-F-R-MCA da preparação foi monitorada conforme descrito acima. O resultado da quantidade enzimática foi expresso em unidades de enzima por miligramas de proteína do tecido. A atividade endopeptidásica das cisteíno-proteinases foi certificada na presença de 5 µM de E-64, inibidor específico irreversível de cisteíno-proteinases. O teor de catepsina B foi certificada na presença de 5 µM do inibidor irreversível específico CA-074 .

### 3.4.2 Dosagem de Metaloproteinases (MMPs)

A atividade das metaloproteinases presentes no homogenato tecidual foi monitorada pela hidrólise do substrato fluorogênico Abz-GPLGLWARQ-EDDnp (LAUER-FIELDS et al, 2003). Esse substrato foi sintetizado em colaboração com Prof. Dr. Luiz Juliano – Departamento de Biofísica – UNISESP – EPM. Foi utilizado o espectrofluorímetro Hitachi F-2500 com comprimento de onda ajustado para  $\lambda_{\text{excitação}} = 320 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{emissão}} = 420 \text{ nm}$ . Foram utilizadas cubetas de caminho óptico de 10 mm, volume final de 2 ml. As soluções para reação foram mantidas no compartimento termostaticado a 37 °C por 5 minutos antes da adição da enzima. As metaloproteinases presentes em 50  $\mu\text{l}$  do homogenato foram ensaiadas a 37 °C em 450  $\mu\text{l}$  do tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM. A seguir foi adicionado a preparação enzimática 2  $\mu\text{M}$  do substrato fluorogênico Abz-GPLGLWARQ-EDDnp para medir as MMPs, num volume final de reação de 502  $\mu\text{l}$ . Aliquotas de 100  $\mu\text{l}$  da reação foram retiradas a cada 30 min, diluídas em 1,9 ml de H<sub>2</sub>O e a fluorescência decorrente da hidrólise do substrato fluorogênico foi monitorada conforme descrito acima. O resultado da quantidade enzimática foi expresso em unidades de enzima por miligramas de proteína do tecido. A atividade endopeptidásica das metaloproteinases foram certificadas na presença de 1 mM de EDTA.

### 3.4.3 Dosagem de Serino-Proteinases

A atividade de serino-proteinases presentes no homogenato tecidual foi monitorada pela hidrólise do substrato fluorogênico Z-F-R-MCA a 37 °C. A fluorescência foi monitorada no espectrofluorímetro Hitachi F-2500. O comprimento de onda do fluorímetro foi ajustado para  $\lambda_{\text{excitação}} = 380 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{emissão}} = 460 \text{ nm}$ . Foram utilizadas cubetas de caminho óptico de 10 mm, volume final de 2 ml. As soluções para reação foram mantidas

no compartimento termostático a 37 °C por 5 minutos antes da adição da enzima. As atividades de serino-proteases presentes em 50 µl do homogenato foram ensaiadas a 37 °C em 450 µl do tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM. A seguir foi adicionado a preparação enzimática 5 µM do substrato fluorogênico Z-F-R-MCA, num volume final de reação de 505 µl. Alíquotas de 100 µl da reação foram retiradas a cada 30 min, diluídas em 1,9 ml de H<sub>2</sub>O e a fluorescência decorrente da hidrólise dos substratos fluorogênicos foi monitorada conforme descrito acima. O resultado da quantidade enzimática foi expresso em unidades de enzima por miligramas de proteína do tecido. A atividade endopeptidásica das serino-proteases foi certificada na presença de 100 µM de PMSF, inibidor irreversível específico dessas enzimas.

### **3.5 Detecção da Catepsina B em Cortes Histológicos**

As amostras de tecido dentário foram fixadas em formol tamponado (10 %) e desmineralizados em solução de EDTA por 90 dias e posteriormente incluídas em parafina. Para as reações de imuno-histoquímica os cortes histológicos de 4 µm foram colocados em lâminas previamente silanizadas com organossilano 4 % em acetona (3-aminopropil trietoxissilano – SIGMA). As lâminas foram submetidas a banhos consecutivos em baterias de xilol e álcool para a completa desparafinização. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada tratando as lâminas com dois banhos consecutivos de peróxido de hidrogênio 3% em metanol (v/v), por 15 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, para a recuperação antigênica, os cortes foram submetidos à fervura em panela a vapor do tipo *steam-cuisine*, imersos em tampão citrato de sódio 10mM, pH 6,0 durante 70 minutos, a 95°C. Após o resfriamento, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS, por 5 minutos cada lavagem. A seguir, para o bloqueio de reações inespecíficas, as lâminas foram incubadas com leite

desnatado 1% em PBS por 40 minutos. A seguir, as lâminas foram novamente lavadas em PBS e adicionado sobre os cortes histológicos o anticorpo primário policlonal anticatapsina B (Sigma), as lâminas foram incubadas a temperatura ambiente, *overnight* em câmara úmida. Decorrido o período de incubação, as lâminas foram submetidas à lavagem com PBS e incubadas com o anticorpo secundário marcado com biotina (LSAB, DAKO) em câmara úmida por 30 minutos à 37°C. A seguir, as lâminas foram novamente lavadas, 3 vezes em PBS, por 5 minutos cada lavagem, e incubadas com complexo Streptavidina-Biotina-Peroxidase (LSAB, DAKO), em câmara úmida por 30 minutos, à 37°C. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS, e a reação revelada com incubação dos cortes em solução de diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio à 37°C, por cinco minutos. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em água corrente, e finalmente coradas com hematoxilina de Carrazi por 60 segundos, lavadas novamente em água corrente, desidratadas em baterias de álcool e xilol e montadas em Permount (Fisher Scientific).

### **3.6 Radiografias Periapicais**

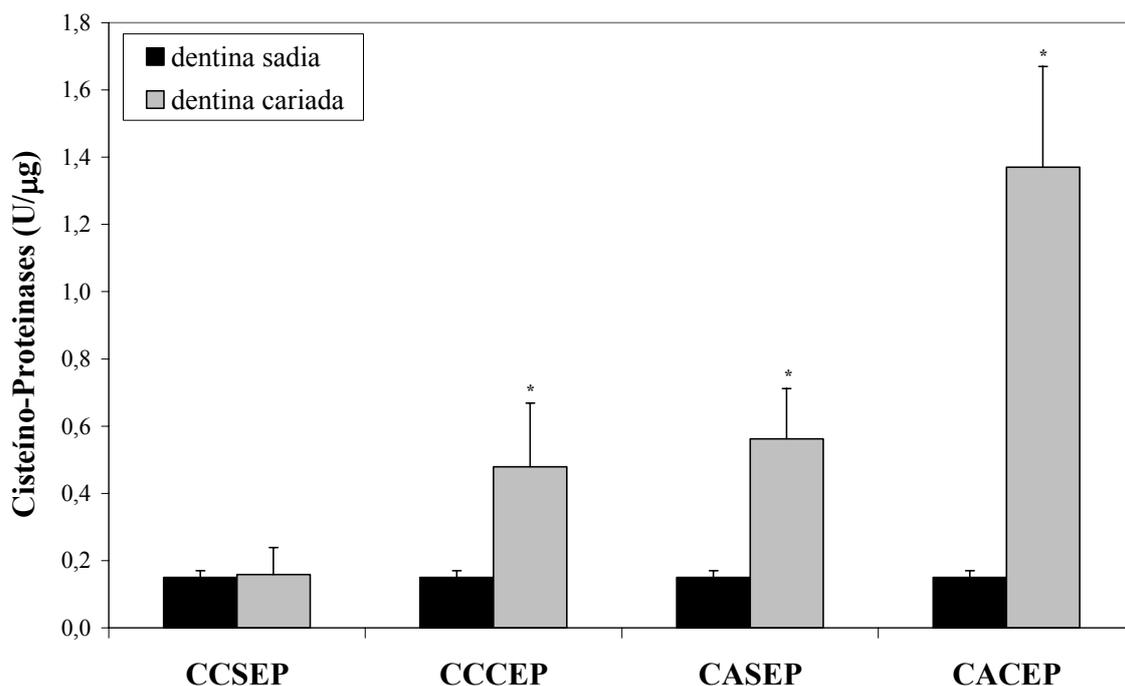
Para obtenção das radiografias periapicais, foram utilizados filmes KODAK, o tempo de exposição foi de 0,8 segundos e foi realizada a Técnica do Paralelismo para melhor visualização das estruturas dentais e da lesão cariosa.

### **3.7 Análise Estatística**

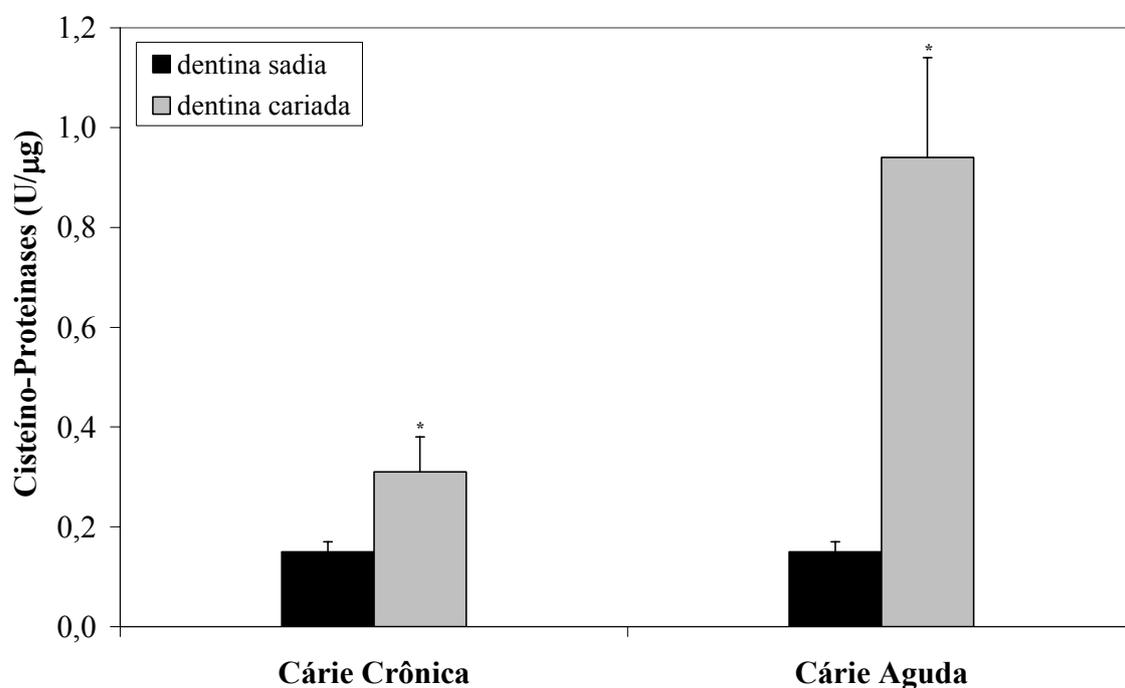
Os resultados experimentais foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e estes foram submetidos à testes estatísticos de “t de student” para comparação entre as médias. Neste teste foi aceito como significativo o nível mínimo de 5 % ( $p < 0,05$ ). Para esta análise estatística foi utilizado o programa EXCEL (teste t) da Microsoft Corporation.

## 4. RESULTADOS

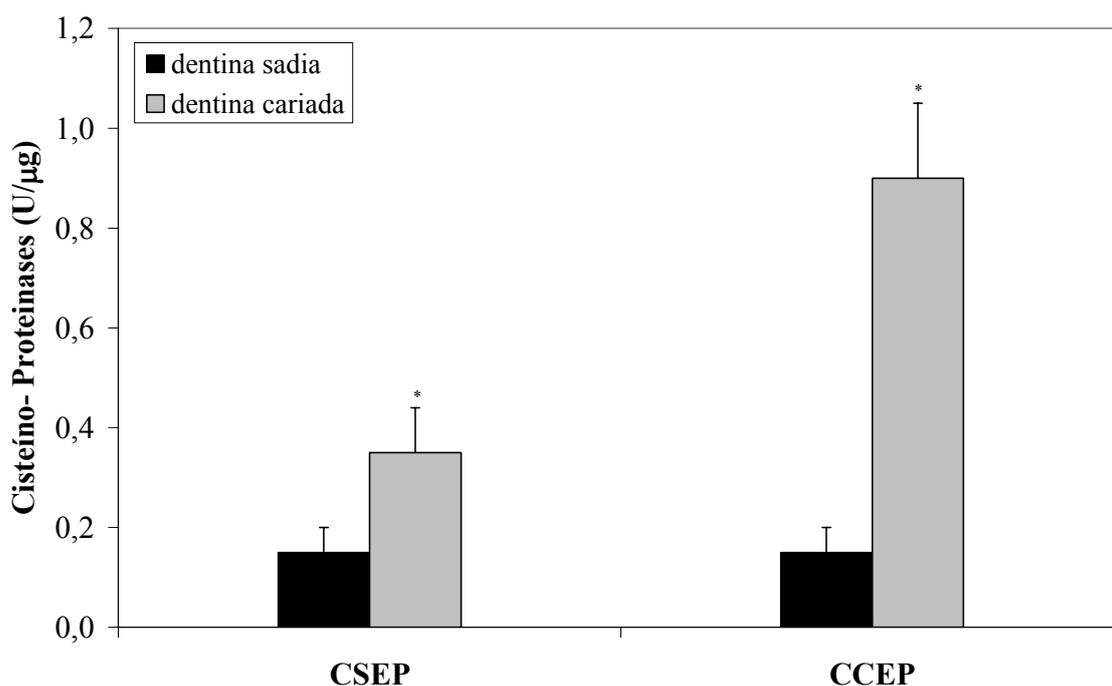
A Fig. 2 mostra a distribuição de cisteíno-proteinases nas lesões cariosas agudas e crônicas. As cáries agudas e crônicas foram subdivididas em dois subgrupos: lesão crônica sem exposição pulpar (CCSEP) e com exposição pulpar (CCCEP); lesão aguda sem exposição pulpar (CASEP) e com exposição pulpar (CACEP). Foram observadas diferenças significativas no teor das cisteíno-proteinases entre os grupos de lesões cariosas crônicas e agudas ( $p < 0,05$ ), de modo geral, os processos cariosos agudos apresentaram cerca de três vezes mais enzimas do que os processos crônicos (Fig.3). A Fig. 4 mostra que as lesões cariosas com exposição pulpar também apresentaram cerca de três vezes mais enzimas do que a cáries sem exposição pulpar ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2. Quantidade de Cisteíno-Proteinases em Lesões Cariotas.** A quantidade de cisteíno-proteinases presentes nas lesões cariosas foi determinada espectrofluorimetricamente pela hidrólise do substrato fluorogênico Z-F-R-MCA, conforme descrito em Metodologia. A média e o erro padrão da atividade específica de cisteíno-proteinase foram determinados para cada grupo de pacientes: *dentina sadia* ( $0,16 \pm 0,05$  U/□g, N = 5); *CCSEP* ( $0,16 \pm 0,08$  U/□g, N = 11); *CCCEP* ( $0,50 \pm 0,2$  U/□g, N = 9); *CASEP* ( $0,6 \pm 0,1$  U/□g, N = 10) e *CACEP* ( $1,4 \pm 0,5$  U/□g, N = 9).



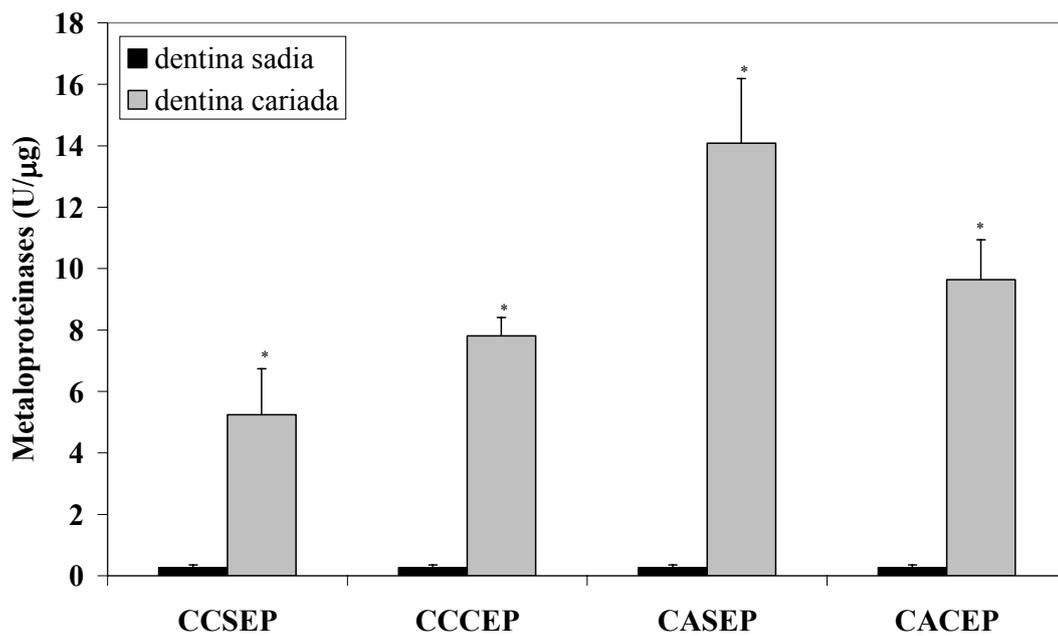
**Figura 3. Quantidade de Cisteíno-Proteinases em Cáries Crônicas e Agudas.** A quantidade de cisteíno-proteinases presentes nas lesões cariosas agudas e crônicas foi determinada espectrofluorimetricamente, conforme descrito em Metodologia. A média e o erro padrão da atividade específica de cisteíno-proteinase foram determinados para cada grupo de pacientes: *dentina sadia* ( $0,16 \pm 0,05$  U/□g, N = 5); *cárie crônica* ( $0,31 \pm 0,07$  U/□g, N = 19) e *cárie aguda* ( $1,0 \pm 0,2$  U/□g, N = 20).



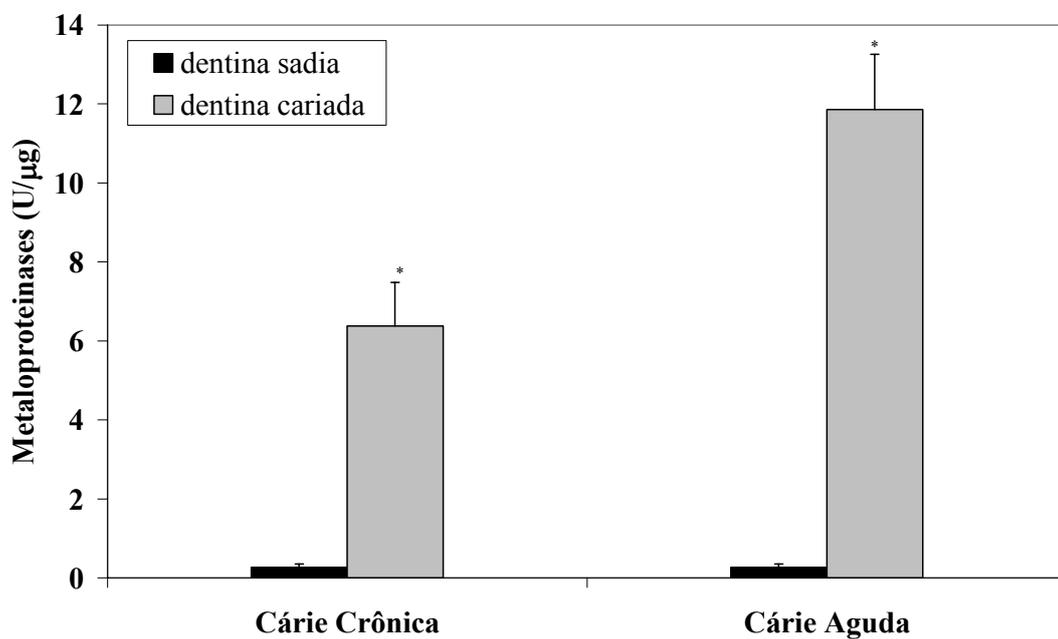
**Figura 4. Quantidade de Cisteíno-Proteinases em Função da Exposição Pulpar.** A quantidade cisteíno-proteinases presentes nas lesões cariosas que apresentam exposição pulpar foi determinada espectrofluorimetricamente, conforme descrito em Metodologia. A média e o erro padrão da atividade específica de cisteíno-proteinase foram determinados para cada grupo de lesões cariosas: *dentina sadia* ( $0,16 \pm 0,05$  U/μg, N =5); *cáries sem exposição pulpar* ( $0,35 \pm 0,09$  U/μg, N =21) e *cáries com exposição pulpar* ( $0,9 \pm 0,3$  U/μg, N=18).

A Fig. 5 mostra a distribuição das MMPs nas lesões cariosas agudas e crônicas. As cáries agudas e crônicas foram subdivididas em dois subgrupos: lesão crônica sem exposição pulpar (CCSEPE) e com exposição pulpar (CCCEPE); lesão aguda sem exposição pulpar (CASEPE) e com exposição pulpar (CACEPE). Foi observada diferença significativa no teor de MMPs entre os grupos de lesões cariosas crônicas e agudas, de modo geral, os processos cariosos agudos apresentaram cerca de duas vezes mais MMPs do que os processos crônicos ( $p < 0,05$ ) (Fig. 6). Não foi observado variação do teor das MMPs dos processos cariosos em função da exposição pulpar (Fig. 7). Contudo, ambos os grupos de

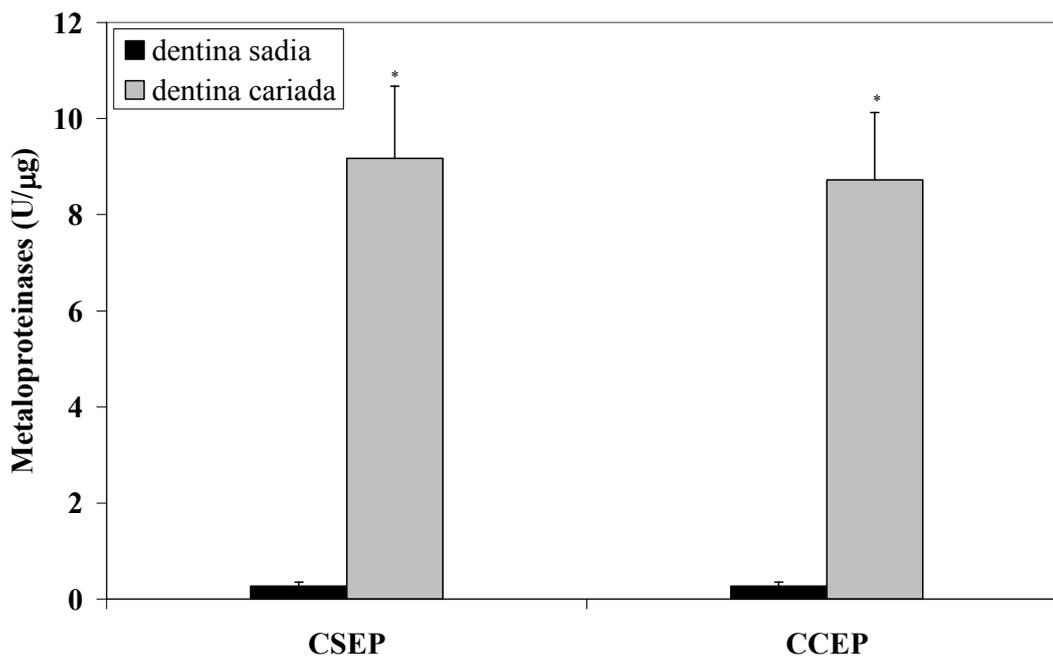
lesões (com ou sem exposição pulpar) apresentaram elevadas quantidades de MMPs em relação ao dente não cariado.



**Figura 5. Quantidade de Metaloproteínas em Lesões Cariadas.** A quantidade das MMPs presentes nas lesões cariosas foram determinadas nas lesões cariosas. A média e o erro padrão da atividade específica das MMPs foram determinados para cada grupo de pacientes: *dentina sadia* ( $0,27 \pm 0,08$  U/μg, N=6), *CCSEP* ( $5,2 \pm 1,5$  U/μg, N =11), *CCCEP* ( $7,8 \pm 0,6$  U/μg, N =9), *CASEP* ( $14 \pm 2$  U/μg, N =10) e *CACEP* ( $9,6 \pm 1,3$  U/μg, N =9).



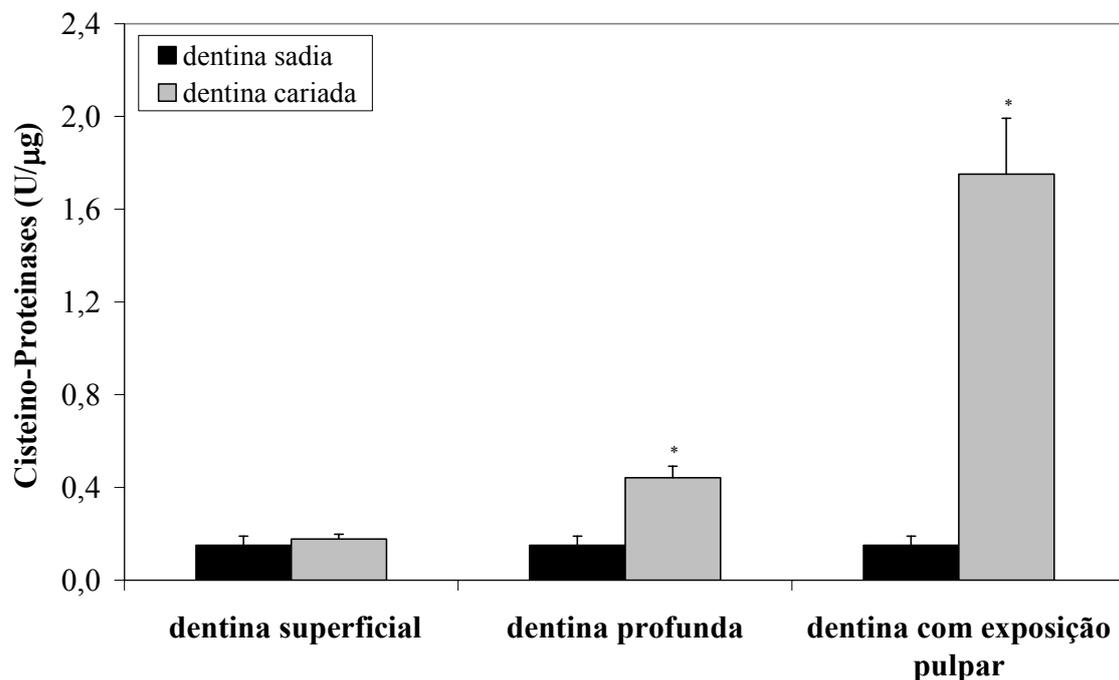
**Figura 6. Quantidade de Metaloproteinasas em Cáries Crônicas e Agudas.** A quantidade de MMPs presentes nas lesões cariosas agudas e crônicas foram determinadas conforme descrito em Metodologia. A média e o erro padrão da atividade específica de MMPs foram determinados para cada grupo: *dentina sadia* ( $0,27 \pm 0,08$  U/□g, N = 6); *cárie crônica* ( $6,4 \pm 1,1$  U/□g, N = 19) e *cárie aguda* ( $11,9 \pm 1,4$  U/□g, N = 20).



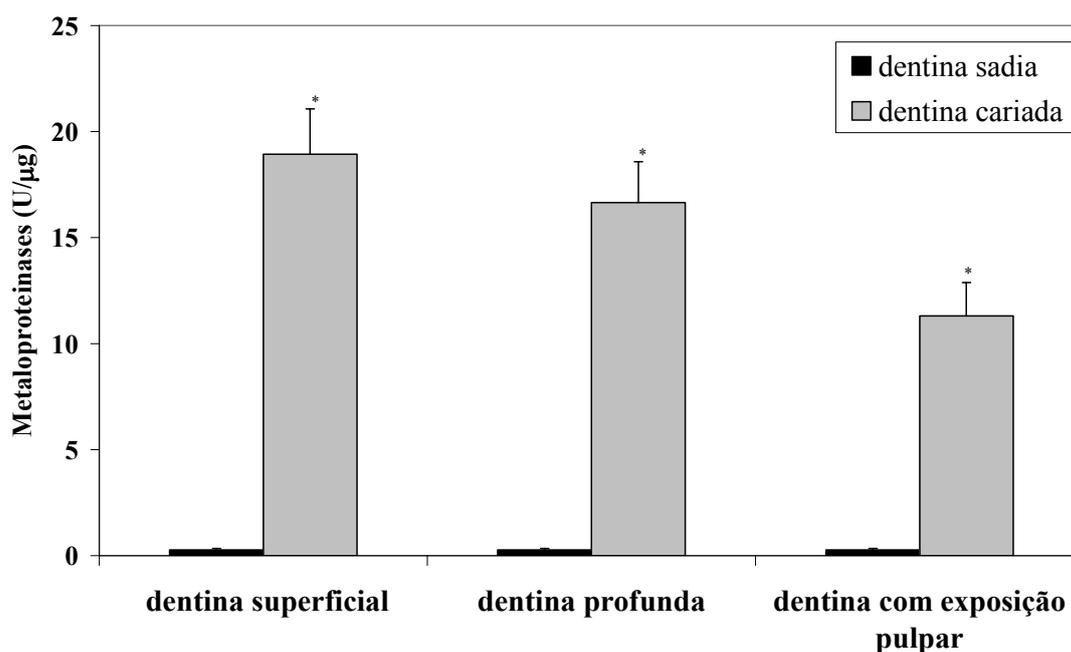
**Figura 7. Quantidade de Metaloproteinases em Função da Exposição Pulpar.** A quantidade das MMPs presentes nas lesões cariosas foi determinada conforme descrito em Metodologia. A média e o erro padrão da atividade específica de MMPs foram determinados para cada grupo de paciente: *dentina sadia* ( $0,27 \pm 0,08$  U/μg, N =5); *cáries sem exposição pulpar* ( $9,2 \pm 1,5$  U/μg, N=21) e *cáries com exposição pulpar* ( $8,7 \pm 1,4$  U/μg, N = 18).

Em relação ao teor das enzimas proteolíticas em função da profundidade das lesões cariosas agudas foi observado que a quantidade de cisteíno-proteinases (Fig. 8) detectada na dentina aumenta gradativamente de acordo com a progressão da lesão cariosa aguda em direção a polpa ( $p < 0,05$ ). O inverso foi observado para o teor das MMPs (Fig. 9) em relação à profundidade da lesão cariosa, a quantidade de metaloproteinases presentes nas

lesões cáries agudas diminuiu em função da profundidade ( $p < 0,05$ ). Esses dados sugerem que as cisteíno-proteínas observadas nos processos cáries são produzidas pelo tecido pulpar, enquanto que as metaloproteínas podem ser produzidas tanto pelas bactérias infectantes como também pelo tecido pulpar.



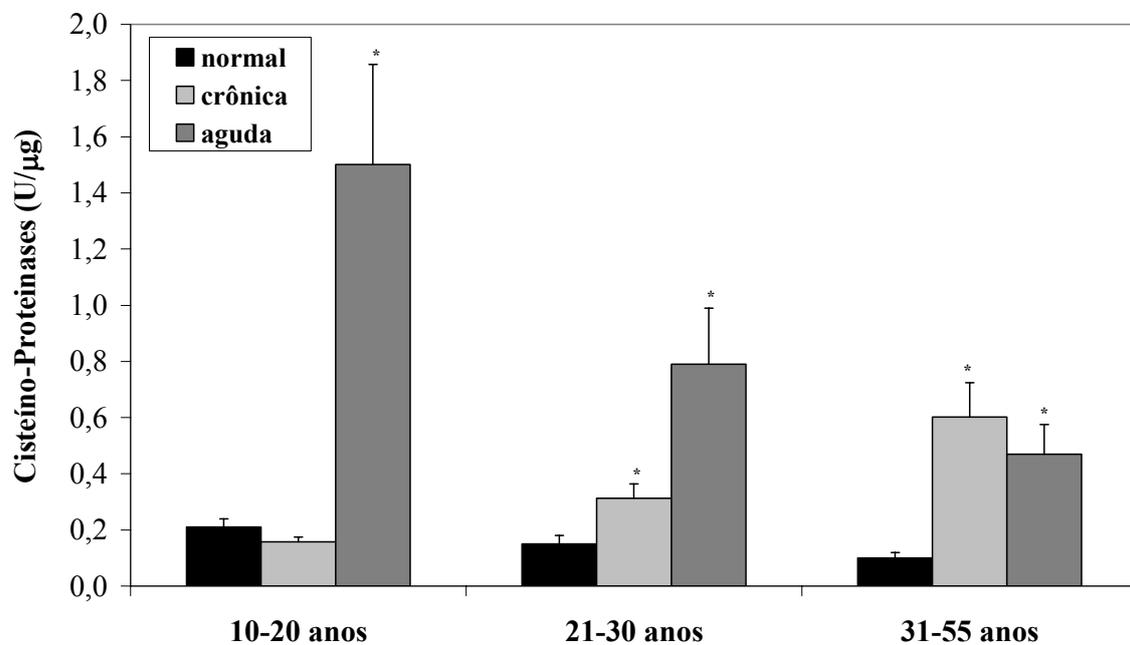
**Figura 8. Quantidade de Cisteíno-Proteínas em Função da Profundidade da Lesão Cáries Aguda.** A quantidade de cisteíno-proteínas presentes nas lesões cáries foi determinada conforme descrito em Metodologia. A média e o erro padrão da atividade específica de cisteíno-proteínas foram determinados para cada grupo de pacientes: *dentina sadia* ( $0,16 \pm 0,05$  U/□g, N = 5); *lesões de dentina superficial* ( $0,18 \pm 0,03$  U/□g, N =7); *lesões de dentina profunda* ( $0,44 \pm 0,08$  U/□g, N =7) e *lesões de dentina com exposição pulpar* ( $1,75 \pm 0,3$  U/□g, N =5).



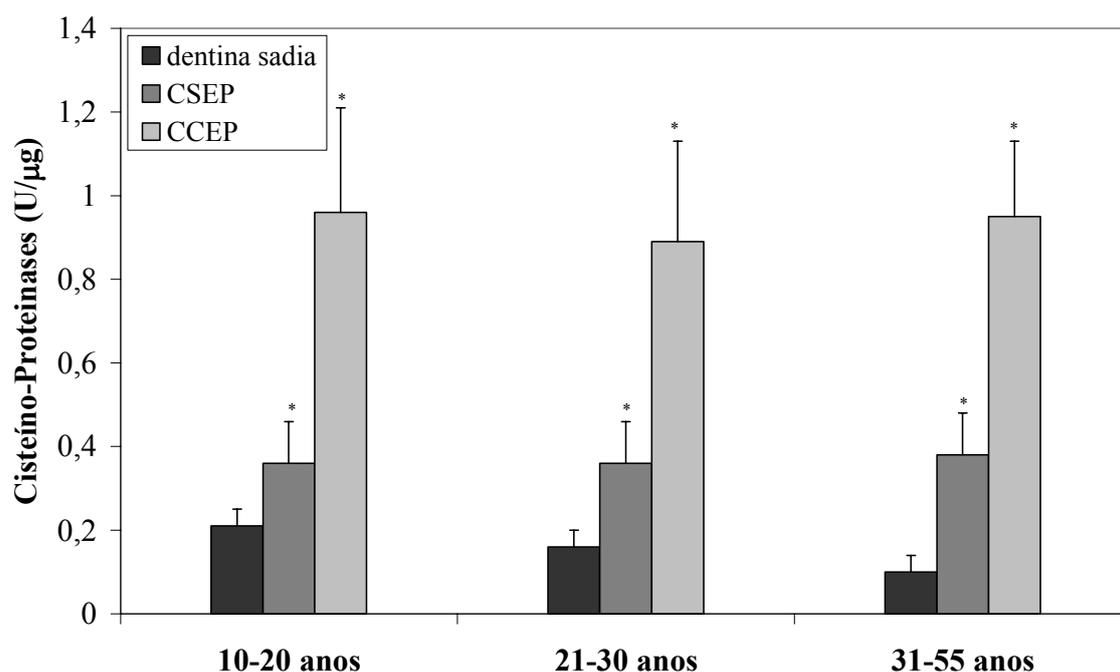
**Figura 9. Quantidade de Metaloproteinases em Função da Profundidade da Lesão Cariosa Aguda.** A quantidade das MMPs presentes nas lesões cariosas foram determinadas conforme descrito em Metodologia. A média e o erro padrão da atividade específica de MMPs foram determinados para cada grupo de pacientes: *dentina sadia* ( $0,27 \pm 0,08$  U/□g, N =5); *lesão superficial de dentina* ( $18,9 \pm 2,15$  U/□g, N =7), *lesão profunda de dentina* ( $16,6 \pm 1,9$  U/□g, N =7) e *lesão com exposição pulpar* ( $11,3 \pm 1,56$  U/□g N =5).

A quantidade de proteinases (cisteíno-proteinases e MMPs) presentes nos processos cariosos crônicos e agudos foram estudadas em função da faixa etária dos pacientes. As lesões cariosas crônicas e agudas foram subdivididas em três grupos identificados de acordo com a idade do paciente: 1) 10 a 20 anos; 2) 21 a 30 anos e 3) 31 a 55 anos. A Fig. 10 mostra que a quantidade de cisteíno-proteinases presentes nas lesões crônicas aumenta progressivamente com a idade ( $p < 0,05$ ). Foi observada uma diminuição significativa do teor das cisteíno-proteinases presentes nos processos cariosos agudos em função da idade do paciente ( $p < 0,05$ ), os pacientes jovens (10-20 anos) apresentaram cerca de três vezes mais dessas enzimas do que os pacientes de idade mais avançada (31-55 anos). O elevado teor de cisteíno-proteinase verificado nos processos crônicos em pacientes de faixa etária

mais avançada (31-55 anos) sugere um importante papel deste grupo de enzimas no processo de cronificação da lesão cariosa. De fato, os dados clínicos claramente mostram que as lesões cariosas crônicas aparecem com mais freqüência em pacientes de idade mais avançada do que em pacientes jovens. Por outro lado, é sabido que os pacientes jovens são mais acometidos pelos processos cariosos agudos. Interessantemente, a Fig. 11 mostra que não houve variação da quantidade de cisteíno-proteinases nas lesões cariosas que apresentam, ou não, exposição pulpar em função da idade do paciente.



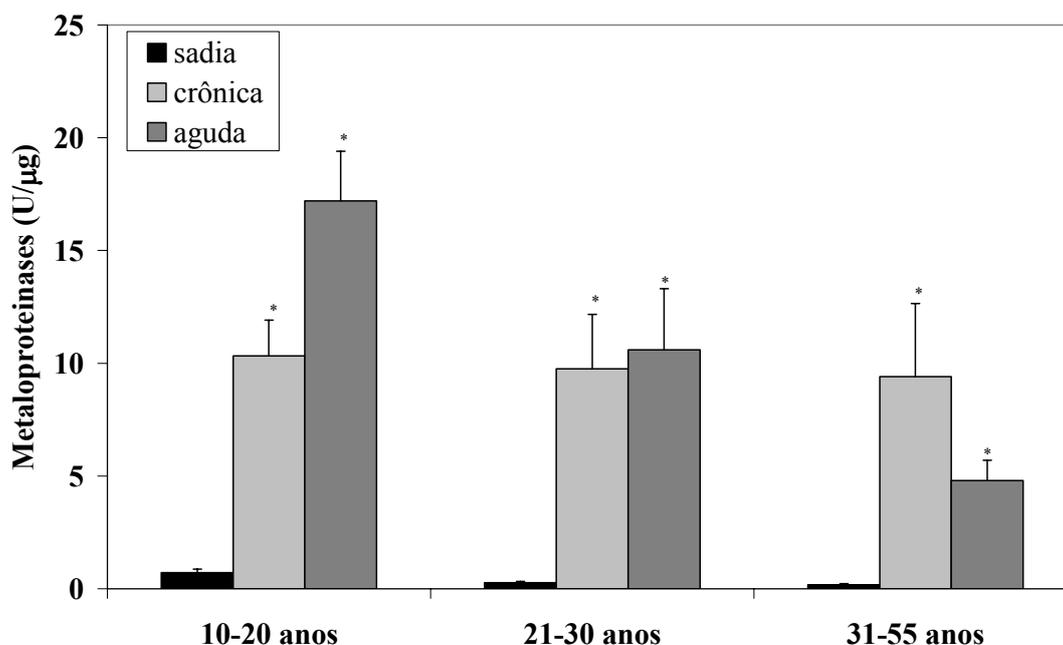
**Figura 10. Quantidade de Cisteíno-Proteinases em Lesões Cariosas Crônicas e Agudas em Função da Faixa Etária.** A quantidade cisteíno-proteinases presentes nas lesões cariosas foi determinada espectrofluorimetricamente. A média e o erro padrão foram determinados para cada grupo. *Pacientes com dentina sadia:* 10-20 anos ( $0,21 \pm 0,03$  U/□g, N=5); 21-30 anos ( $0,16 \pm 0,05$  U/□g, N=5) e 31-55 anos ( $0,10 \pm 0,02$  U/□g, N=6). *Pacientes com lesões cariosas crônicas:* 10-20 anos ( $0,16 \pm 0,02$  U/□g, N=5); 21-30 anos ( $0,31 \pm 0,05$  U/□g, N=5) e 31-55 anos ( $0,60 \pm 0,12$  U/□g, N=9). *Pacientes com lesões cariosas agudas:* 10-20 anos ( $1,50 \pm 0,3$  U/□g, N=5); 21-30 anos ( $0,79 \pm 0,2$  U/□g, N=8) e 31-55 anos ( $0,47 \pm 0,1$  U/□g, N=9).



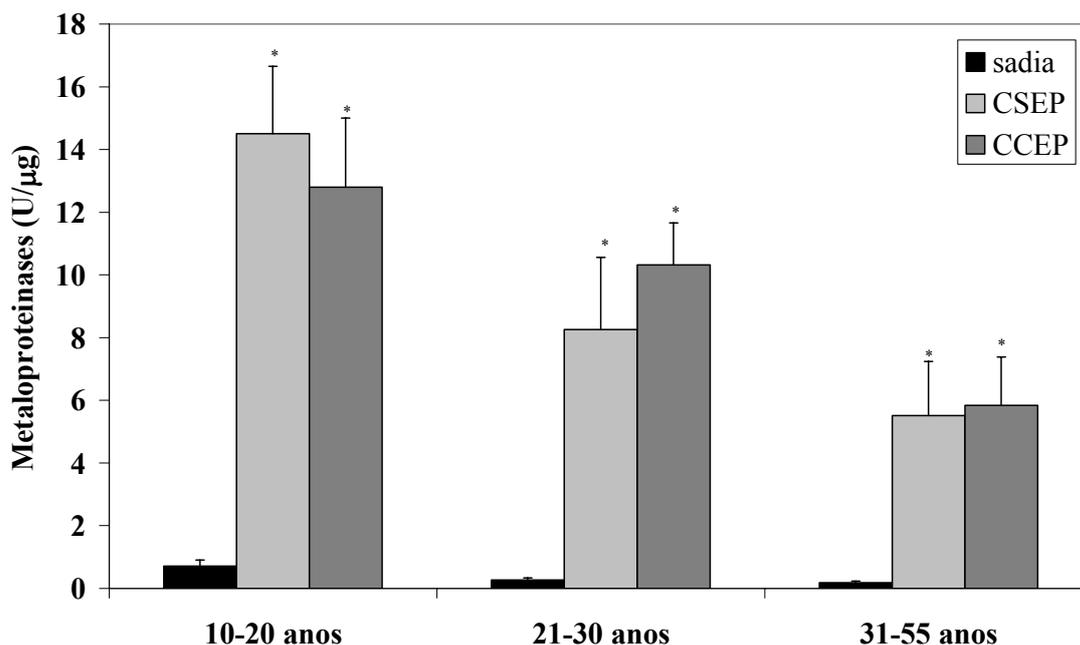
**Figura 11. Quantidade de Cisteíno-Proteinases em Lesões Cariosas que Apresentam Exposição Pulpar em Função da Faixa Etária.** A quantidade cisteíno-proteinases presentes nas lesões cariosas que apresentam exposição pulpar foi determinada conforme descrito em Metodologia. A média e o erro padrão foram determinados para cada grupo de lesões cariosas. *Dentina sadia*: 10-20 anos ( $0,21 \pm 0,03$  U/μg, N =5); 21-30 anos ( $0,16 \pm 0,05$  U/μg, N =5) e 31-55 anos ( $0,1 \pm 0,02$  U/μg, N =6). *Cáries sem exposição pulpar*: 10-20 anos ( $0,36 \pm 0,1$  U/μg, N =6); 21-30 anos ( $0,36 \pm 0,12$  U/μg, N =6) e 31-55 anos ( $0,38 \pm 0,1$  U/μg, N =10). *Cáries com exposição pulpar*: 10-20 anos ( $0,96 \pm 0,25$  U/μg, N =4); 21-30 anos ( $0,89 \pm 0,24$  U/μg, N =5) e 31-55 anos ( $0,95 \pm 0,18$  U/μg, N =8).

Em relação ao teor das metaloproteinases, a Fig. 12 mostra que a quantidade de MMPs em lesões agudas decai em função do aumento da idade do paciente ( $p < 0,05$ ), enquanto que para as lesões crônicas sua quantidade permanece constante em função do tempo. As metaloproteinases mostram ser importantes marcadoras moleculares dos processos cariosos agudos. A Fig. 13 mostra que não ocorreu variação no teor das metaloproteinases em relação às cáries que apresentam ou não exposição pulpar em função da idade do paciente, contudo foi observado que o teor das metaloproteinases decresce ( $p < 0,05$ ), em ambos os grupos (com ou sem exposição pulpar) em função da idade dos

pacientes. De modo geral, os processos cariosos, com ou sem exposição pulpar, apresentam muito mais metaloproteínas em pacientes jovens (10-20 anos) do que em pacientes de idade mais elevada (31-55 anos).

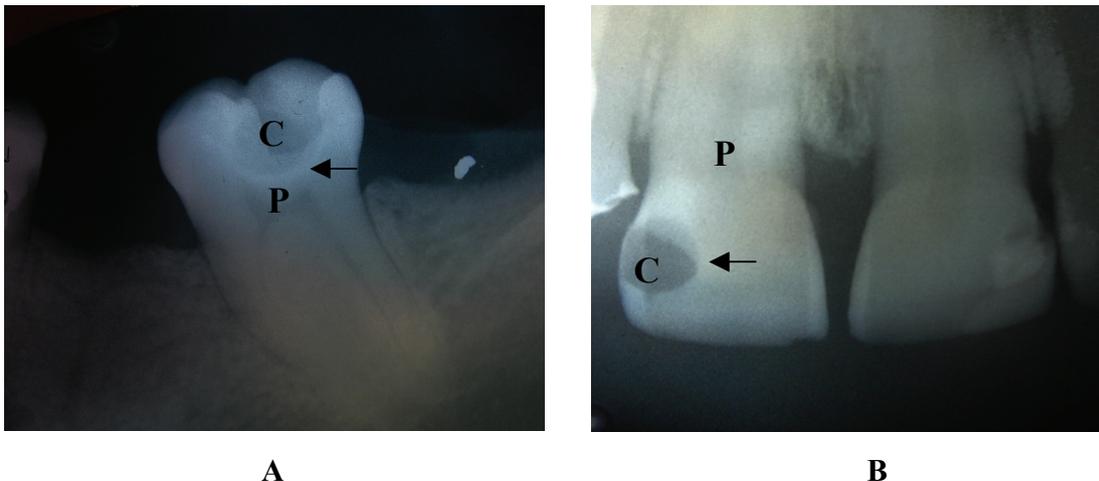


**Figura 12. Quantidade de MMPs em Lesões Cariosas Crônicas e Agudas em Função da Faixa Etária.** A quantidade (média  $\pm$  erro padrão) das MMPs presente nas lesões cariosas foi determinada para cada grupo de pacientes. *Pacientes com dentina sadia:* 10-20 anos ( $0,71 \pm 0,16$  U/ $\square$ g, N=5); 21-30 anos ( $0,27 \pm 0,05$  U/ $\square$ g, N=5) e 31-55 anos ( $0,18 \pm 0,05$  U/ $\square$ g, N=6). *Pacientes com lesões cariosas crônicas:* 10-20 anos ( $10,33 \pm 1,58$  U/ $\square$ g, N=5); 21-30 anos ( $9,8 \pm 2,4$  U/ $\square$ g, N=5) e 31-55 anos ( $9,4 \pm 3,4$  U/ $\square$ g, N=9). *Pacientes com lesões cariosas agudas:* 10-20 anos ( $17,2 \pm 2,2$  U/ $\square$ g, N=5); 21-30 anos ( $10,6 \pm 2,7$  U/ $\square$ g, N=8) e 31-55 anos ( $4,8 \pm 0,9$  U/ $\square$ g, N=9).



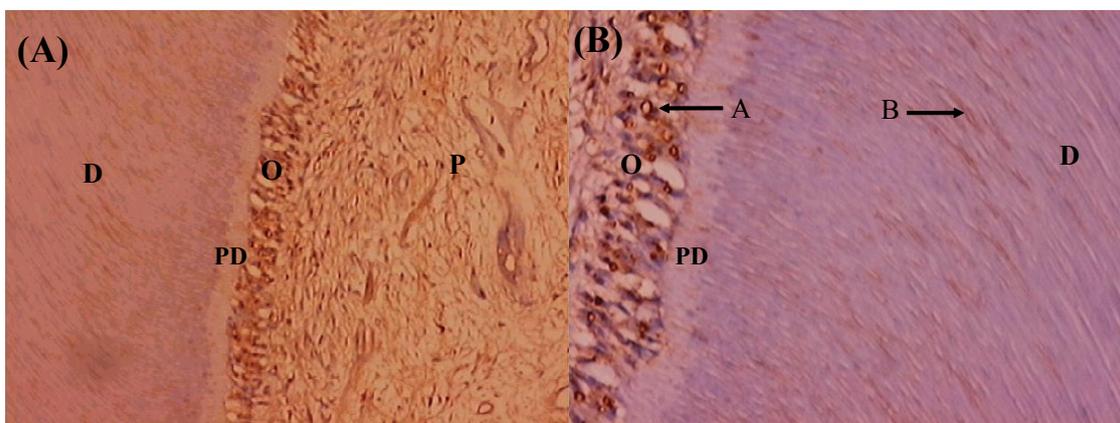
**Figura 13. Quantidade de MMPs em Lesões Cariosas que Apresentam Exposição Pulpar em Função da Faixa Etária.** A quantidade de MMPs presentes nas lesões cariosas que apresentam exposição pulpar foi determinada conforme descrito em Metodologia. A média e o erro padrão da atividade específica das MMPs foram determinados para cada grupo de lesões cariosas: *Pacientes com dentina sadia*: 10-20 anos ( $0,7 \pm 0,2$  U/□g, N =5); 21-30 anos ( $0,27 \pm 0,08$  U/□g, N =6) e 31-55 anos ( $0,18 \pm 0,05$  U/□g, N =6); *Cáries sem exposição pulpar (CSEP)*: 10-20 anos ( $15 \pm 2$  U/□g, N =3); 21-30 anos ( $8,3 \pm 2,3$  U/□g, N =6) e 31-55 anos ( $5,5 \pm 1,7$  U/□g, N =10) e *Cáries com exposição pulpar (CCEP)*: 10-20 anos ( $13 \pm 2$  U/□g, N =4); 21-30 anos ( $10 \pm 1$  U/□g, N =5) e 31-55 anos ( $5,8 \pm 1,5$  U/□g, N =8).

A Fig. 14 mostra radiografias periapicais de exemplos típicos de lesões cariosas crônica e aguda. Os processos cariosos crônicos (Fig. 14A) são facilmente caracterizados por sua imagem radiográfica, onde é possível detectar a presença de tecido de cicatrização (imagem radiopaca de dentina esclerosada ou terciária, conforme apontado pela seta na Fig. 14A) que delimita a cavidade da lesão cariosa e impede a progressão da lesão para a polpa dentária. A Fig. 14B mostra a imagem radiográfica de um dente acometido por uma lesão cariosa aguda, nessa imagem é possível observar um grande comprometimento da dentina (imagem radiolúcida), onde não é possível verificar a presença de dentina esclerosada.



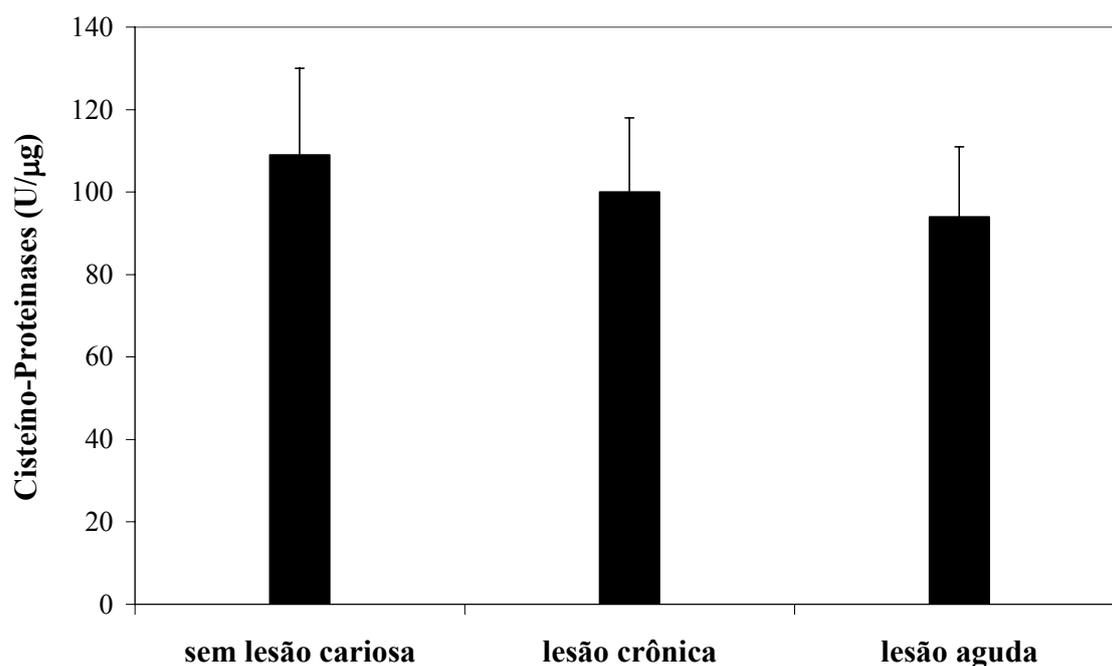
**Figura 14. Imagem Radiográfica de Lesões Cariosas Crônica e Aguda.** A seta indica a dentina comprometida pelo processo carioso. A imagem da lesão cariosa crônica mostra uma linha radiopaca (dentina esclerosada) que delimita a lesão do tecido pulpar (Fig.14A). A Fig. 14B mostra a imagem radiolúcida de lesão cariosa aguda. Símbolos: C = cavidade cariada, P = polpa, a seta A indica a delimitação da lesão cariosa crônica, presença de dentina esclerosada e a seta B indica a lesão cariosa aguda, ausência de dentina esclerosada.

A Fig. 15 mostra a distribuição de catepsina B (cisteíno-proteinase) em amostras teciduais provenientes de dentes humanos sadios desmineralizados. A Fig. 15 apresenta cortes teciduais provenientes de dentina humana revelados por reações de imunohistoquímica para catepsina B em marrom e núcleo celular e matriz extracelular da dentina em azul. A Fig. 15A mostra a região de interface dentina-polpa, nessa região é possível observar forte marcação em marrom nos odontoblastos, o que indica a presença de grande quantidade de catepsina B neste tipo celular. A Fig. 15B mostra em maior aumento, que a catepsina B também é detectada na região da dentina na região pericanalicular dos túbulos dentinários. A Fig. 15 também mostra que a quantidade de catepsina B na dentina aumenta de acordo com a proximidade dos odontoblastos, sugerindo claramente que essas células secretam catepsina B nos canaliculos dentinários.



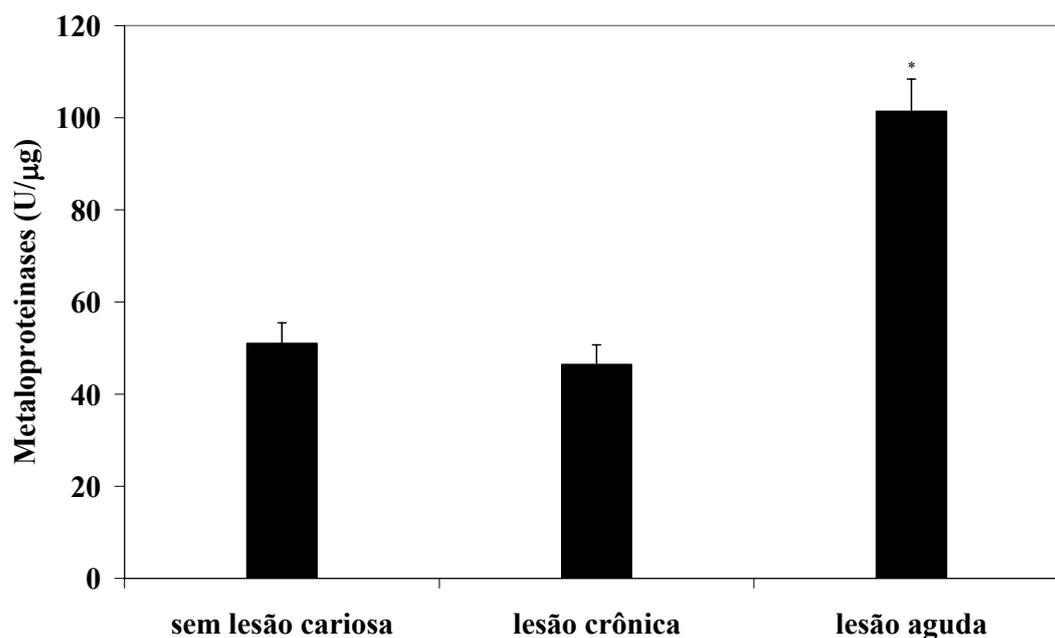
**Figura 15. Detecção de Catepsina B por Reação de Imuno-Histoquímica em Dentina Humana Sadia.** Cortes histológicos de 4  $\mu\text{m}$  de tecidos embebidos em parafina provenientes de dentina humana desmineralizada foram pré-tratados para recuperação antigênica, conforme descrito em Metodologia, e incubados com anticorpo anticatapsina B humano na diluição 1:80. A ligação do anticorpo primário anticatapsina B ao tecido foi monitorada pela adição de anticorpo secundário conjugado com peroxidase (cor marrom). Após reação de peroxidase, as lâminas foram contra-coradas por hematoxilina (cor azul). A Fig. 15A representa em menor aumento o tecido dentário na interface dentina-polpa. A Fig. 15B representa a interface dentina-polpa em maior aumento, evidenciando a região dos odontoblastos na interface com a dentina. Símbolos: D-dentina; PD-pré-dentina; O-odontoblastos e P-câmara pulpar. A seta A indica a presença de catepsina B nos odontoblastos e a seta B indica a presença de catepsina B na região pericanalicular dos túbulos dentinários, a barra representa a escala de 50  $\mu\text{m}$ .

A Fig. 16 mostra a distribuição de cisteíno-proteases na saliva de pacientes portadores de lesões cariosas agudas ou crônicas e pacientes sem lesão cariiosa. Não houve diferença significativa no teor das cisteíno-proteinases entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Os dados sugerem que a quantidade de cisteíno-proteinases presentes na saliva é constante em pacientes portadores de lesões cariosas crônicas ou agudas e em pacientes sem lesão cariiosa. Apesar de não ter sido observado variação entre esses três grupos, não podemos afirmar que as cisteíno-proteinases da saliva não interfiram no processo cariioso, pelo contrário, devido à sua elevada quantidade na saliva, essa classe de enzima pode favorecer o processo de instalação da lesão cariiosa iniciado pelas bactérias cariogênicas.



**Figura 16. Quantidade de Cisteíno-Proteinases na Saliva de Pacientes Saudáveis e Pacientes Portadores de Cáries Crônicas e Agudas.** A quantidade das cisteíno-proteinases (média  $\pm$  erro padrão) presentes na saliva foi determinada de acordo com Metodologia. Saliva de pacientes: *sem lesão cariiosa* ( $109 \pm 21$  U/ $\mu$ g, N=9); portadores de lesão cariiosa *crônica* ( $100 \pm 18$  U/ $\mu$ g, N=8) e portadores de *lesão cariiosa aguda* ( $94 \pm 17$  U/ $\mu$ g, N=9).

A Fig. 17 mostra a distribuição das metaloproteinases presentes na saliva de pacientes portadores de lesões cariosas agudas ou crônicas e pacientes sem lesão cariiosa. Em relação à quantidade de MMPs presentes na saliva dos três grupos de pacientes, é possível observar uma elevação do teor de MMPs nas salivas do grupo de pacientes portadores de lesões cariosas agudas. Como foi observado na Fig. 6, os teores de MMPs na dentina cariada estão elevados quando há instalação de processos cariosos agudos (processos inflamatórios). Devido ao elevado teor de MMPs na saliva, essas proteinases também podem favorecer o processo de instalação da lesão cariiosa iniciado pelas bactérias cariogênicas.



**Figura 17. Quantidade de Metaloproteínases na Saliva de Pacientes Saudáveis e Pacientes Portadores de Cáries Crônicas e Agudas.** A quantidade de MMPs (média ± erro padrão) presentes na saliva foram determinadas de acordo com Metodologia. Saliva de pacientes *sem lesão cariiosa* ( $51 \pm 5$  U/µg, N =9); saliva de portadores de *lesão cariiosa crônica* ( $46 \pm 4$  U/µg, N =8); saliva de portadores de *lesão cariiosa aguda* ( $101 \pm 7$  U/µg, N =9).

## 5. DISCUSSÃO

O processo de cárie inicia-se com a desmineralização do esmalte dentário, com a perda da matriz inorgânica de hidroxiapatita e fluorapatita. Essa perda se inicia com a produção de ácido pelas bactérias da cavidade bucal. A desmineralização ocorre quando o pH da placa está abaixo de 5,5 (HOUTE, LOPMAN e KENT, 1994). A desmineralização é seguida pela destruição da matriz orgânica de colágeno da dentina. Essa degradação da matriz orgânica é causada por proteinases bacterianas e por enzimas do hospedeiro. Embora várias bactérias orais possam produzir enzimas proteolíticas, não há evidências que as enzimas bacterianas sejam capazes de degradar o colágeno, glicoproteínas e proteoglicanos da matriz orgânica da dentina e diretamente promovam a progressão da lesão cariosa. Ao contrário disso, experimentos *in vitro* têm mostrado que bactérias cariogênicas podem causar desmineralização somente na interface esmalte-dentina. Bactérias colhidas de lesões cariosas *in situ* não foram capazes de promover a degradação de colágeno *in vitro*. Estudos indicam que a matriz da dentina cariada é menos susceptível a degradação pela colagenase bacteriana purificada (KATZ, PARK e PALENIK, 1997; STRIJP, STEENBERGEN e CATE, 1997). Desta forma, esses resultados indicam que a grande degradação da matriz extracelular da dentina observada nos processos cariosos não se deve somente à presença de proteinases bacterianas.

Os resultados apresentados nas Fig. 3 mostram que as lesões cariosas agudas apresentam cerca de seis vezes mais cisteíno-proteinases ativas do que a dentina sadia e as lesões cariosas crônicas apresentam duas vezes mais cisteíno-proteinases do que a dentina sadia ( $p < 0,05$ ). Assim sendo, os resultados mostram que os processos cariosos agudos (processos cariosos ativos, proliferativos) apresentam cerca de três vezes mais cisteíno-

proteínases do que os processos cáriosos crônicos (processos cáriosos estacionários, não proliferativos).

Os resultados apresentados na Fig. 4 e na Fig. 8 mostram que a quantidade de cisteíno-proteínases presentes nas lesões cárias de dentina diretamente depende da profundidade da lesão, de modo geral as lesões cárias que apresentam exposição pulpar (lesões mais profundas) apresentam cerca de três vezes mais cisteíno-proteínases do que as lesões que não apresentam exposição pulpar, lesões mais superficiais ( $p < 0,05$ ). De fato, as análises de imuno-histoquímica da dentina sadia mostram que a quantidade de catepsina B, principal cisteíno-proteínase lisossomal, é maior na dentina vizinha à polpa dentária. A catepsina B foi fortemente detectada nos odontoblastos e nos canalículos dentinários mais profundos (Fig. 15).

Interessantemente, a quantidade de cisteíno-proteínases presentes nas lesões cárias agudas e crônicas dependem da idade do paciente (Fig.10). A quantidade de cisteíno-proteínases presentes nos processos cáriosos agudos diminui com a idade do paciente, enquanto que a quantidade de cisteíno-proteínases nos processos cáriosos crônicos aumenta com a idade do paciente. Em relação às lesões cárias que apresentam ou não exposição pulpar, não foi observada variação do teor de cisteíno-proteínases em função da idade do paciente (Fig. 11). O conjunto de resultados apresentados para as cisteíno-proteínases indica que esse grupo de enzima participa ativamente no processo de progressão da lesão da cárie dentária. Os processos cáriosos agudos promovem a elevação do teor dessa enzima na dentina cariada independentemente de apresentarem exposição pulpar da lesão. Contudo, foi observado que as lesões cárias de dentina que apresentam exposição pulpar elevam ainda mais a quantidade de cisteíno-proteínases na dentina cariada. Esses resultados indicam que as cisteíno-proteínases são marcadores moleculares fidedignos para a

monitoração da profundidade da lesão cariosa, ou seja, quanto mais profunda a lesão cariosa em direção a polpa dentária, maior é a quantidade de cisteíno-proteinases detectadas na lesão cariosa.

Esses resultados, bem como, os dados de imuno-histoquímica da dentina sadia (Fig. 15), sugerem que os odontoblastos promovem a secreção de catepsina B, cisteíno-proteinase lisossomal, para os canalículos dentinários. Além dos odontoblastos, células pulpares, possivelmente fibroblastos e macrófagos, também expressam grande quantidade de cisteíno-proteinases. Analogamente, é sabido que os osteoblastos quando estimulados por substâncias pró-inflamatórias, como a interleucina-1 $\beta$ , são capazes de promover a secreção de cisteíno-proteinases lisossomais, principalmente a catepsina B, para a matriz óssea. Essa classe de enzimas tem sido implicada em processos fisiopatológicos que envolvem intensa remodelação da matriz óssea, por promover a degradação do colágeno e dos proteoglicanos da matriz extracelular. De maneira geral, a elevada secreção de cisteíno-proteinases (catepsinas B, L e K) está intimamente relacionada com o processo de reabsorção e degradação da matriz óssea. O fato de termos detectado grande quantidade de catepsina B nos odontoblastos e depositada na região pericanalicular da dentina, sugere que essa enzima possa participar ativamente no processo de formação dos canalículos dentinários por promover a degradação e a reabsorção da matriz dentinária. Nossos resultados também indicam que o processo cariioso é capaz de promover um grande aumento de secreção dessas enzimas na dentina. A presença de bactérias na dentina leva à respostas pró-inflamatórias das células do sistema imune presente na polpa dentária, a presença de mediadores inflamatórios podem induzir a secreção de cisteíno-proteinases em neutrófilos e macrófagos da polpa, bem como, em odontoblastos (GOLDBERG e SMITH, 2004).

Apesar de a saliva humana conter grande quantidade de cisteíno-proteinase (Fig.16), não foi possível correlacionar o processo carioso com o nível dessas enzimas na saliva dos pacientes. Foi observado que a saliva dos pacientes portadores de lesões cariosas agudas ou crônicas possuem a mesma quantidade de enzima de um indivíduo sadio. Contudo, essa elevada quantidade de cisteíno-proteinases presentes na saliva pode participar no agravamento da extensão da lesão cariosa por promover a degradação do colágeno exposto e desnaturado produzido pela ação bacteriana sobre a dentina.

Dados da literatura mostram que os canalículos da dentina sofrem atresia em função da idade do paciente, como também, muitos canalículos são totalmente ocluídos por um processo de mineralização promovido pelos odontoblastos durante o envelhecimento. Também ocorre uma intensa diminuição do tamanho da câmara pulpar em função da idade do paciente, pacientes idosos, acima de 65 anos, apresentam somente cerca de 50% do tamanho inicial da câmara pulpar (GOLDBERG e SMITH, 2004). O processo de estreitamento e fechamento dos canalículos dentinários se inicia por volta dos 20 anos de idade e certamente dificulta a difusão de moléculas da dentina para a pulpa e vice-versa. Também é conhecido que a presença de bactérias na dentina induz a síntese de dentina terciária (dentina esclerosada) pelos odontoblastos (SMITH et al 1994), a formação da dentina terciária promove o processo de cronificação da lesão cariosa (Fig. 14A). Nossos resultados claramente mostram que o processo de envelhecimento diminui a quantidade de cisteíno-proteinases detectadas nas lesões cariosas agudas (Fig. 10), indicando que a atresia dos canalículos da dentina dificulta a difusão destas enzimas dos odontoblastos ou das células do tecido pulpar em direção à dentina. Como também, a atresia dos canalículos dentinários podem dificultar a penetração de bactéria e/ou a difusão de moléculas inflamatórias produzidas pela microflora bacteriana. Aliado a esses fatos, a diminuição da

câmara pulpar sugere que menos células pulpares estão envolvidas no processo pró-inflamatório da lesão cariiosa em pacientes idosos, o que diminui a quantidade de cisteíno-proteinases secretadas pelas células pulpares em função da resposta inflamatória. É interessante observar que a quantidade de cisteíno-proteinases dos processos cariosos crônicos se iguala à quantidade de cisteíno-proteinases dos processos cariosos agudos em pacientes mais idosos (Fig. 10). Esses resultados sugerem importante papel dessas enzimas no processo de cronificação das lesões cariosas que ocorrem em função da idade do paciente.

As MMPs são capazes de degradar as proteínas da matriz orgânica da dentina (BIRKEDAL e HANSEN, 1995). O papel da MMPs na degradação de matriz orgânica da dentina em lesões cariosas tem sido explorado. É conhecido que várias MMPs humanas estão presentes na saliva (INGMAN et al, 1994) e na placa bacteriana dental (SORSA et al, 1995), tais como: MMP-2, MMP-8 e MMP-9. A maioria das MMPs que estão presentes na saliva se originam do sulco gengival ao redor do dente (WESTERLUND et al, 1996), estudos recentes sugerem que as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) são secretadas pelas glândulas parótidas (Benjavongkulchai et al, 1997).

A degradação da matriz da dentina pela ativação ácida das metaloproteinases (MMPs) tem sido correlacionada com a degradação de matriz orgânica do osso. A atividade enzimática de telopeptidase da MMP-9, a qual remove os peptídeos *N*- e *C*-terminais das fibras de colágeno, é parecida com a degradação do colágeno da matriz óssea (OKADA et al, 1995). A predominância da MMP-9 na saliva está de acordo com a evidência de que a MMP-9 é a principal MMP da saliva (INGMAN et al, 1994; WESTERLUND et al, 1996; MÄKELÄ et al, 1994). A atividade de telopeptidase da MMP-9 pode também ter papel na degradação da matriz da dentina. Já foi demonstrado *in vitro* que a degradação da matriz

por proteinases é necessária para a formação da cavidade no dente (MANDEL e WOTMAN, 1976). Portanto, a desmineralização da dentina é acelerada pela atividade simultânea das proteinases colagenolíticas. A bactéria sozinha não é capaz de produzir a lesão cariosa (KATZ, PARK e PALENIK, 1997). As principais enzimas envolvidas na degradação do colágeno da dentina desmineralizada são de origens humanas (TJÄDERHANE et al, 1998).

De fato, nossos resultados das análises da quantidade de MMPs nas lesões cariosas confirmam os dados da literatura. A quantidade de MMPs aumentam muito na dentina nos processos cariosos crônicos e agudos em relação ao teor encontrado na dentina sadia (Fig 5 e 6), as MMPs em processos crônicos estão elevadas cerca de 24 vezes e nos processos agudos estão elevadas 44 vezes, ( $p < 0,05$ ). Ao contrário do observado para as cisteíno-proteinases, a quantidade das metaloproteinases diminui em função da profundidade da lesão cariosa (Fig. 9). Embora as lesões cariosas apresentem elevado teor dessas enzimas em relação à dentina sadia, não foi verificado variação significativa na quantidade de MMPs em lesões cariosas em função da exposição pulpar (Fig.7). Esses resultados mostram que as MMPs são marcadores moleculares fidedignos para a monitoração dos processos cariosos agudos.

A quantidade de MMPs presentes nas lesões cariosas agudas e crônicas também dependem da idade do paciente (Fig.12). A quantidade de MMPs presentes nos processos cariosos agudos diminui drasticamente com a idade do paciente, enquanto que a quantidade de MMPs nos processos cariosos crônicos não varia com a idade do paciente. Em relação às lesões cariosas que apresentam ou não exposição pulpar, não foi observada variação na quantidade de MMPs em função da idade do paciente (Fig. 13). De maneira semelhante ao observado para as cisteíno-proteinases, os resultados claramente mostram que o processo de

envelhecimento diminui a quantidade de MMPs nas lesões cariosas agudas (Fig. 10), também indicando que a atresia dos canalículos da dentina dificulta a difusão dessas enzimas da cavidade bucal, saliva e microflora bacteriana, em direção à dentina. Como também, a atresia dos canalículos dentinários pode dificultar a penetração de bactéria e/ou a difusão de moléculas inflamatórias produzidas pela microflora bacteriana. Os resultados, no entanto, não descartam o envolvimento das MMPs endógenas do dente no estabelecimento da lesão cariosa, pois verificamos elevados teores dessas enzimas nos processos cariosos crônicos, sugerindo que essas enzimas também estão relacionadas com o processo de formação de dentina reacional terciária (dentina esclerosada). O clorexidine (0,03%) além de ser bactericida é um potente inibidor de MMPs (GENDRON et al, 1999), é pertinente sua utilização na cavidade antes da restauração do dente.

O conjunto de resultados apresentados para as metaloproteinases indica que esse grupo de enzima também participa ativamente no processo de progressão da lesão da cárie dentária. Conforme mencionado anteriormente, ao contrário do observado nas cisteíno-proteinases (Fig. 8), foi verificado que a quantidade de MMPs diminui em função da profundidade da lesão na dentina (Fig. 9), esses resultados sugerem que as MMPs bacterianas, bem como, da saliva iniciam a progressão da lesão cariosa na dentina. A propagação da lesão na dentina depende também da participação das cisteíno-proteinases endógenas do dente que exacerbam a lesão à medida que o processo carioso progride em direção a polpa dentária. Esses dados podem se relacionar com a geometria piramidal das cavidades (ápice no esmalte e base na dentina) observadas nos processos cariosos agudos (Fig. 14).

## 6. CONCLUSÃO

- O processo inflamatório instalado pela cárie (infecção bacteriana) é o principal responsável pela destruição da dentina. Portanto, o tratamento da cárie deve prever a contenção de processo inflamatório.
- Os procedimentos clínicos que induzem a cronificação da lesão cariosa aguda e/ou a oclusão dos canalículos dentinários, são pertinentes, pois diminuem a quantidade de enzimas proteolíticas na dentina.
- O procedimento de remoção da dentina cariada deve ser brando o suficiente para evitar maior traumatismo iatrogênico que induz o aumento ou disparo do processo inflamatório. Esse procedimento deve ser menos conservador de acordo com o avanço da idade, pois já existe a atresia natural dos canalículos dentinários.
- A aplicação tópica de inibidores de MMPs (clorexidine 0,03%) e de cisteíno-proteinases devem conter a lesão cariosa por impedir a degradação proteolítica da matriz orgânica da dentina.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M. Como escrever teses e monografias. **Editora Campus**, p. 85-95, 2003.
- AISA, M.C.; BECCARI, T.; COSTANZI, E. e MAGGIO, D. Cathepsin B in osteoblasts. **Biochimica et Biophysica Acta** **1621**, p.149-159, 2003.
- AISA, M.C.; RAHMAN, S.; SENIN, U.; MAGGIO, D.; GRAHAM, R. e RUSSELL, G. Cathepsin B activity in normal human osteoblast-like cells and human osteoblastic osteosarcoma cells (MG-63): regulation by interleukin-1  $\beta$  and parathyroid hormone. **Biochimica et Biophysica Acta** **1290**, p. 29-36, 1996.
- BENJAVONGKULCHAI, B.; CATERINA, N.; BIRKEDAL-HANSEN, H. e FOX, P.C. Matrix metalloproteinases in parotid saliva of primary Sjögren Syndrome patients. **J. Dent Res** **76**, p. 121-125, 1997.
- BIRKEDAL-HANSEN, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. **Curr Opin Cell Biol** **7**, p. 728-35, 1995.
- BRANNSTROM, M.; GOLLA, G.; NORDENVALL, K.J. e TORSTENSON, B. Invasion of microorganisms and some structural changes in incipient enamel caries. **Caries Res** **14**, p. 276-284, 1980.
- BRATTHALL, D. Cárie Dentária: Intervenção – Interrupção – Interpretação. **Eur. J. Oral Sci.** **104**, p. 486-491, 1996.
- BUCK, M. R.; KARUSTIS, D. G.; DAY, N. A.; HONN, K. V. e SLOANE, B. F. Degradation of extracellular matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. **Biochem J.** **282**, p. 273-278, 1992.
- CLARKSON, B.H.; HALL, D.L.; HEILMAN, J.R. e WEFEL, J.S. Effect of proteolytic enzymes on caries lesion formation in vitro. **J. Oral Pathol** **15**, p. 423-429, 1986.
- CROSSNER, C.G. Salivary Lactobacillus counts in the prediction of caries activity. **Community Dent. Oral. Epidemiol.** **9**, p. 182-190, 1981.
- DROUIN, L.; OVERALL, C.M. e SODEK, J. Identification of matrix metalloproteinase inhibitor (TIMP) in human parotid and submandibular saliva: partial purification and characterization. **J. Periodont Res** **23**, p. 370-377, 1988.
- EDWARDSSON, S. Bacteriological studies on deep areas of carious dentine. **Odontol. Rev.** **25**, p. 1-143, 1974.
- ELLEN, R.P. - Microbiological essays for dental caries and periodontal disease susceptibility. **Oral Sci. Rev.** **8**, p. 3-23, 1976.

GENDRON, R.; GRENIER, D.; SORSA, T. e MAYRAND, D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, vol. 6, n<sup>o</sup>. 3, p. 437-439, 1999.

GOLDBERG, M. e SMITH, A. J. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: A biology basis for rapair and tissue engineering. **Crit Rev Oral Biol Med** 15, p. 13-27, 2004.

HÖFLING, J. F. Salivary S.mutans and Lactobacillus counts en the prediction of caries activity in Piracicaba school-children. **Community Dent Health** 14, p. 97-101, 1997.

HOUTE, J.; LOPMAN, J. e KENT, R. The predominant cultivable flora of sound and carious human root surfaces. **J Dent Res**. 73, p. 1727-1734, 1994.

INGMAN, T.; SORSA, T.; LINDY, O.; KOSKI, H. e KONTTINEN, Y.T. Multiple forms of gelatinases / type IV collagenases in saliva and gingival crevicular fluid of periodontitis patients. **J. Clin. Periodontol** 21, p. 26-31, 1994.

KATZ, S.; PARK, K.K. e PALENIK, C.J. In vitro root surface caries studies. **J. Oral Med** 42, p. 40-48, 1997.

KAWASAKI, K. e FEATHERSTONE, J.D. Effects of collagenase on root demineralization. **J. Dent Res** 76, p. 588-595, 1997.

KLOCK, B. Prediction and prevention of caries. A study in school children. **Caries Res**. 27, p. 424-430, 1993.

KOBAYASHI, H.; SHIMITT, M.; GORETZKI, N.; CHUCHOŁOWSKI, J.; CALVETE, J.; KRAMER, M. e GUNZLER, W. Cathepsin B efficiently activates the soluble and tumour cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA). **J. Biol. Chem.** 266, p. 5147-5152, 1991.

KRASSE, B. Risco de Cáries, **Quintessence Ed. Ltda.**, 1<sup>o</sup> edição, 1986.

LELOUP G.; PEETERS-JORIS, C.; DELAISSE, J.M.; OPDENAKKER, G. e VAES, G.J. Tissue and urokinase plasminogen activators in bone tissue and their regulation by parathyroid hormone. **Bone Miner. Res.** 6, p. 1081-1090, 1991.

LI, Z.; YASUDA, Y.; LI, W.; BOGYO, M.; KATZ, N.; GORDON, R. E.; FIELDS, G.B. e BRÖMME, D. Regulation of collagenase activities of human cathepsins by glycosaminoglycans. **J. Biol. Chem.** 279, p. 5470-5479, 2004.

LINDE, A. e GOLDEBERG, M. Dentinogenesis. **Crit Rev Oral Biol Med** 4, p.679-728, 1993.

LOESCHE, W. J. Cárie Dental, uma infecção tratável. **Ed. Cultura Médica** 349, 1993.

LOESCHE, W.J.; ROWAN, J.; STRAFFON, L.H. e LOOS, P.J. Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. **Infect. Immun.** **11**, p. 1252–1260, 1975.

MÄKELÄ, M.; SALO, T.; UITTO, V.J. e LARJAVA, H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. **J. Dent Res.** **73**, p. 1397-1406, 1994.

MANDEL, I.D. e WOTMAN, S. The salivary secretion en health and disease. **Oral Sci. Rev.** **8**, p. 25-47, 1976.

MEDEIROS, J.B. e ANDRADE, M.M. Manual de Elaboração de Referências Bibliográficas. **Editora Atlas**, p. 58-73, 2001.

MENAKER, L. Cáries Dentárias Bases Biológicas. **Ed. Guanabara Koogan S.A.** **422**, 1984.

NEWBRUM, E. Cariology. **Baltimore Williams & Wilkins**, 2° edition, 1983.

OKADA, Y.; NAKA, K.; KAWAMURA, K.; MATSUMOTO, T.; NAKANISHI, I. e FUJIMOTO, N. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-KDa gelatinase/type IV collagenase=gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. **Lab Invest** **72**, p. 311-322, 1995.

PALOSAARI, H.; WAHLGREN, J.; LARMAS, M.; RÖNKÄ, H.; SORSA, T. e SAOL, T. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF- $\beta$  1. **J. Dent Res** **79**, p. 77-84, 2000.

ROWE, P.S.N.; KUMAGAI, Y.; GUTIERREZ, G.; GARRET, I.R.; BLACHER, R.; ROSEN, D.; CUNDY, J.; NAVVAB, S.; CHEN, D.; DREZNER, M.K.; QUARLES, L.D. e MUNDY, G.R. MEPE has the properties of an osteoblastic phosphatonin and minhibin. **Bone** **34**, p. 303-319, 2004.

SMITH, A.J.; TOBIAS, R.S.; CASSIDY, N.; PLANT, C.G.; BROWNE, R.M.; BÈGUE-KIRN, C. Odontoblast stimulation in ferrets by dentine matrix components. **Arch Oral Biol** **39**, p. 13-22, 1994.

SORSA, T.; DING, Y.L.; INGMAN, T.; SALO, T.; WESTERLUND, U. e HAAPASALO, M. Cellular source, activation and inhibition of dental plaque collagenase. **J. Clin. Periodontol** **22**, p. 709-717, 1995.

SPECTOR, T. Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 microgram of protein. **Anal. Biochem.** **86**, p. 142-146, 1978.

STRIJP, A.J.; JANSEN, D.C.; DEGROOT, J.; CATE, J.M. e EVERTS, V. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. **Carie Res.** **37**, p. 58-65, 2003.

- STRIJP, A.J.P.; STEENBERGEN, T.J.M. e CATE, J.M. Bacterial colonization of mineralized and completely demineralized dentine in situ. **Caries Res** **31**, p. 349-355, 1997.
- SULKALA, M.; WAHLGREN, J.; LARMAS, M.; SORSA, T.; TERONEN, O.; SALO, T. e TJÄDERHANE, L. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. **J Dental Res** **80**, 1545-1549, 2001.
- TENUDA, L. M. A.; LIMA, J. E. O.; CARDOSO, C. L. et al. Efeito do acúmulo de placa e de fatores salivares na desmineralização do esmalte e composição da placa dental in situ. **Pesqui. Odontol. Bras.**, vol.17, p. 326-331, 2003.
- THEILADE, J. Role of plaque in the etiology of periodontal disease and caries. **Oral Sci. Rev.** **9**, p. 23-63, 1976.
- THYLSTRUP, A. e FEJERKOV, O. Cariologia Clínica. **Ed. Santos**, 2a. edição, 1995.
- TJÄDERHANE, L.; LARJAVA, H.; SORSA, T.; UITTO, V.J.; LARMAS, M. e SALO, T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. **J Dental Res** **77**, p. 1622-1629, 1998.
- TJÄDERHANE, L.; SULKALA, M.; SORSA, T.; TERONEN, O.; LARMAS, M. e SALO, T. The effect of MMP inhibitor Metastat on fissure caries progression in rats. **Ann NY Acad Sci** **878**, p. 686-688, 1999.
- UITTO, V.J.; SUOMAMAINEN, K. e SORSA, T. Salivary collagenase. Origin, characteristics and relationship to periodontal health. **J. Periodont Res.** **25**, p. 135-142, 1990.
- WESTERLUND, U.; INGMAN, T.; LUKINMAA, P.L.; SALO, T.; KJELDSSEN, L. e BORREGAARD, N. Human neutrophil gelatinase and associated lipocalin in adult and localized juvenile periodontitis. **J. Dent. Res.** **75**, p. 1553-1563, 1996.
- WOTMAN, S. The salivary secretions in health and disease. **Oral Sci. Rev.** **8**, p. 25-47, 1976.
- YAJIMA, T.; SAKAKURA, Y.; TSURUGA, E.; HIRAI, T.; IKEDA, Y.; FUJII, S. e SHIDE, N. Collagen-phagocytosing ability of periodontal osteoblasts at the bone surface. **Arch. Histol. Cytol.** **62**, p. 17-25, 1999.

## ANEXO I

### Termo de Consentimento

Eu, \_\_\_\_\_ RG \_\_\_\_\_ abaixo-assinado, dou pleno consentimento a Dra. Christiane Laporta Minciotti, cro 65.942, para realização de qualquer procedimento que seja necessário para a realização de sua pesquisa. Autorizo, de forma livre e voluntária, o tratamento e terapêutica que me foram apresentados, dos quais recebi explicações de que o material a ser coletado tem finalidade científica, para que haja um esclarecimento melhor do processo evolutivo da cárie. Além de saber que o tratamento segue os adequados princípios técnicos e científicos reconhecidos pela Odontologia.

Autorizo a realização de fotografias e remoção de qualquer tecido bucal com a finalidade científica e didática, desde que resguarde a minha privacidade, não devendo expor as minhas condições bucais desnecessariamente.

Mogi das Cruzes, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_ .

---

assinatura do paciente ou responsável

## ANEXO II

nome \_\_\_\_\_  
endereço \_\_\_\_\_ n° \_\_\_\_\_ bairro \_\_\_\_\_  
cidade \_\_\_\_\_ CEP \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_ tel. \_\_\_\_\_  
profissão \_\_\_\_\_ idade \_\_\_\_\_ anos

Tem algum problema de saúde?	Sim ( )	Não ( )	
Qual? _____			
Está tomando algum medicamento?	Sim ( )	Não ( )	
Qual? _____			
Está grávida?	Sim ( )	Não ( )	
Já tomou anestesia local?	Sim ( )	Não ( )	
Sentiu se mal durante a anestesia?	Sim ( )	Não ( )	
Tem ou já teve convulsões ou desmaios?	Sim ( )	Não ( )	
Já teve algum tipo de reação alérgica?	Sim ( )	Não ( )	
O que causou a alergia? _____			
Tem diabetes?	Sim ( )	Não ( )	
Tem algum problema no coração?	Sim ( )	Não ( )	
Sua pressão arterial costuma ser	normal ( )	alta ( )	baixa ( )
Tem sentido dor nos dentes ou na gengiva?	Sim ( )	Não ( )	
Tem sentido gosto ruim na boca?	Sim ( )	Não ( )	
Está satisfeito com a aparência dos seus dentes?	Sim ( )	Não ( )	
Nota algum ruído quando mastiga ou abre a boca?	Sim ( )	Não ( )	
Tem hábito de ranger ou apertar os dentes?	Sim ( )	Não ( )	
Quanto tempo faz que visitou o dentista ? _____			
Qual é o motivo que te trouxe ao dentista? _____			

Eu, \_\_\_\_\_ RG \_\_\_\_\_ CPF \_\_\_\_\_  
declaro para todos os fins legais que os esclarecimentos que foram dados, referentes ao meu estado de saúde, são verdadeiros e que nenhum fato importante foi omitido.

Mogi das Cruzes , \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_.

\_\_\_\_\_  
assinatura do paciente ou responsável

## **ANEXO III**

### **Comitê de Ética de Pesquisa - CEP -**

**Título:** “Participação de cisteíno-proteínases e metaloproteínases no desenvolvimento da cárie de dentina”

**Autores:** Christiane Laporta Minciotti e Ivarne Luis dos Santos Tersariol

**Processo CEP:** 127/2002

Parecer de membro do Comitê de Ética de Pesquisa, avaliado em 26/11/2002

#### **Parecer**

O presente projeto obedece os aspectos éticos da pesquisa em seres humanos estabelecidos pela Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

**Conclusão: O projeto está aprovado quanto aos aspectos éticos.**

Mogi das Cruzes, 27 de novembro de 2002.

**Prof. Ivarne Luis dos Santos Tersariol  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa**

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)