

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

JULIANA DE CAMARGO JETELINA

EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE GELATINASES NA POLPA DE DENTES DECÍDUOS
COM DIFERENTES GRAUS DE REABSORÇÃO RADICULAR E CONDIÇÃO PULPAR

RIBEIRÃO PRETO

2019

Juliana de Camargo Jetelina

EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE GELATINASES NA POLPA DE DENTES DECÍDUOS
COM DIFERENTES GRAUS DE REABSORÇÃO RADICULAR E CONDIÇÃO PULPAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Varella de Carvalho
Coorientadora: Prof. Dra. Yara Corrêa Silva Sousa

Ribeirão Preto

2019

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

Juliana, de Camargo Jetelina, 1978 -
Expressão e atividade de gelatinases na polpa de dentes decíduos com
diferentes graus de reabsorção radicular e condição pulpar

Juliana de Camargo Jetelina - Ribeirão Preto, 2019.
36 f.: il. color.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Varella de Carvalho.

Dissertação (doutorado) – Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,
Odontologia, área de concentração: Endodontia. Ribeirão Preto, 2019.

*“Dedico esse trabalho a **Deus** e aos meus filhos Helena e Arthur.”*

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Ribeirão Preto, por meio da Magnífica Reitora **Profa. Elmara Lúcia de Oliveira Bonini**, por possibilitar meu desenvolvimento intelectual e profissional.

À coordenadora do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, **Profa. Dra. Yara T. Corrêa Silva Sousa**, por não medir esforços para a manutenção e pela constante evolução do programa *stricto sensu*. Pela oportunidade concedida e por contribuir para o meu crescimento profissional e intelectual.

Aos docentes do curso de Pós-graduação da Universidade de Ribeirão Preto: **Prof. Dr. Edson Alfredo, Profa. Dra. Érica Alves Gomes, Prof. Dr. Fuad Jacob Abi Rached Junior, Profa. Dra. Larissa Moreira S. C. Raucci, Prof. Dr. Silvio Rocha Corrêa da Silva, Prof. Dr. Walter Raucci Neto e Profa. Dra. Yara T. Corrêa Silva Sousa**, pelos ensinamentos.

Aos docentes do curso de Pós-graduação da Faculdade Meridional, em especial a **Profa. Dra. Graziela Oro Cericato, Prof. Dr. Aloísio Oro Spazzin, Prof. Dra. Lilian Rigo e Prof. Dr. Rodrigo Varella de Carvalho**, pela amizade e ensinamentos.

Aos colegas de turma de doutorado, **Anamaria Estacia, Flávia Baldissarelli, Michele de Conto Ferreira, Alexandra Silveira, Larissa Cé, George Ruschel, Leandro Cericato, Rhuy Dall Agnol, Nereu Dartora, Leonardo Federizzi, Carlos Alberto Rech**, pela amizade e momentos de convivência. Vocês farão parte da minha história de vida.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Rodrigo Varella de Carvalho**, pela sua dedicação e carinho ao me orientar. Por todo o suporte na elaboração e execução de todos os experimentos. Pela paciência para me ensinar e tolerância ao me introduzir na pesquisa. Por sempre acreditar no meu potencial, me estimular perante às dificuldades, buscar alternativas para desenvolvimento da nossa pesquisa e me cobrar para que fizéssemos o melhor possível.

“A alegria que se tem em pensar
e aprender faz-nos pensar e
aprender ainda mais.”

(Aristóteles)

RESUMO

As metaloproteinases da matrix extracelular (MMPs) são enzimas proteolíticas que têm sido associadas à instalação e progressão de cárie, indicadoras de inflamação do tecido pulpar e parecem desempenhar papel importante na reabsorção óssea e dentária. Por isso, a possibilidade de detecção precoce da presença e atividade dessas enzimas nos tecidos dentários, ou mesmo na polpa, pode ajudar no diagnóstico e prognóstico pulpar em dentes decíduos, servindo como biomarcadores. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar a presença e atividade das MMPs (MMP-2 e MMP-9) presentes na polpa de pacientes saudáveis, com diferentes graus de reabsorção dentária e diferentes graus de comprometimento pulpar. Foram coletadas amostras de tecido pulpar de trinta e quatro pacientes, dentre eles pacientes com polpa sadia, inflamada e necrótica com diferentes graus de reabsorção radicular. Coletas pulpares foram realizadas, após isolamento absoluto, remoção de cárie e acesso a polpa coronária. Para polpa vital foi realizada a coleta por meio de curetas estéreis, já a polpa não vital por meio de cones de papel estéreis. Nos dentes extraídos, por motivos alheios a este estudo, a coleta foi realizada imediatamente após a extração. As amostras de tecido pulpar ou cones de papel foram incubadas em tubos de plástico de 2 mL contendo DMEM por 24h a 37°C. Após esse período, os tubos foram centrifugados (12000 rpm por 10 minutos), o sobrenadante foi aspirado e congelado a -20°C até o momento da realização da zimografia. A expressão e atividade das MMPs, foram representadas por regiões claras no gel de poliacrilamida, e foram quantificadas a partir do uso do software ImageJ. Assim, a estatística descritiva foi utilizada para demonstrar o percentual de distribuição dos casos de acordo com as variáveis categóricas. Para os dados quantitativos, o teste de normalidade foi aplicado e os dados foram analisados pelo teste Kruskal Wallis ($p < 0,05$). Concluiu-se que existe expressão e atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 na polpa de dentes decíduos. Não houve uma diferença significativa de expressão e atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 em dentes decíduos com ou sem reabsorção radicular. E em relação à condição pulpar, houve maior marcação de MMP-9 do que MMP-2. Porém, os que apresentavam polpa sadia tiveram menor marcação de MMP-9, em contra partida pacientes com sintomatologia marcaram mais MMP-9.

Palavras-chave: Polpa dentária. Metaloproteinases da matriz. Eletroforese em gel de poliacrilamida. Dente decíduo.

ABSTRACT

Extracellular matrix metalloproteinases (MMPs) are proteolytic enzymes that have been associated with the onset and progression of caries, indicative of inflammation of the pulp tissue and appear to play an important role in bone and dental resorption. Therefore, the possibility of early detection of the presence and activity of these enzymes in dental tissues, or even in the pulp, may help in the diagnosis and prognosis of pulp in deciduous teeth, serving as biomarkers. In this sense, the objective of the present study was to evaluate the presence and activity of MMPs (MMP-2 and MMP-9) present in the pulp of healthy patients with different degrees of tooth resorption and different degrees of pulp involvement. Pulp tissue samples were collected from thirty-four patients, among them patients with healthy, inflamed and necrotic pulp with different degrees of root resorption. Pulp collections were performed after absolute isolation, caries removal and access to the coronary pulp. For vital pulp the collection was carried out by means of sterile curettes, the non-vital pulp by means of sterile paper cones. In the extracted teeth, for reasons unrelated to this study, the collection was performed immediately after the extraction. Samples of pulp tissue or paper cones were incubated in 2 mL plastic tubes containing DMEM for 24 h at 37 ° C. After this time, the tubes were centrifuged (12000 rpm for 10 minutes), the supernatant was aspirated and frozen at -20°C until zimography was performed. The expression and activity of the MMPs were represented by clear regions on the polyacrylamide gel, and were quantified using the ImageJ software. Thus, descriptive statistics was used to demonstrate the percentage of distribution of cases according to categorical variables. For the quatitative data, the normality test was applied and the data were analyzed by the Kruskal Wallis test ($p < 0.05$). It was concluded that there is expression and gelatinolytic activity of MMP-2 and MMP-9 in the pulp of deciduous teeth. There was no significant difference in expression and gelatinolytic activity of MMP-2 and MMP-9 in deciduous teeth with or without root resorption. And regarding the pulp condition, there was greater labeling of MMP-9 than MMP-2. However, those with healthy pulp had lower MMP-9 marking, in contrast, patients with symptomatology scored more MMP-9.

Key words: Dental pulp. Matrix metalloproteinases. Polyacrylamide gel electrophoresis. Tooth Decay.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 PROPOSIÇÃO	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	15
3.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	15
3.3 COLETA DAS AMOSTRAS DE POLPA PARA ANÁLISE ENZIMÁTICA.....	16
3.4 ZIMOGRAFIA.....	17
3.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	18
4 RESULTADOS	19
4.1 ANÁLISE DESCRITIVA.....	19
4.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MMP-2.....	20
4.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MMP-9.....	21
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DA MMP-2 E MMP-9.....	21
5 DISCUSSÃO	24
6 CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS	29
APÊNDICE 1.....	32
ANEXO 1.....	33

1. INTRODUÇÃO

As metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) formam uma família de enzimas proteolíticas dependentes de metal que, coletivamente, são capazes de degradar todos os tipos de componentes proteicos da matriz extracelular (MEC), como colágenos intersticiais e de membrana basal, proteoglicanos e fibronectina (MACIEJCZYK et al., 2016). As MMPs podem ser divididas em seis subgrupos de acordo com o substrato que degradam: colagenases (MMP-1 e MMP-8), estromelinas (MMP-3, MMP-10, MMP-11 e MMP-20), gelatinases ou colagenases tipo IV (MMP -2 e MMP-9), matrilisina (MMP-7), metaloelastase (MMP-12) e metaloproteinases do tipo membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16 e MMP-17) (MAZZONI et al., 2012; JAIN & BAHUGUNA, 2015; MACIEJCZYK et al., 2016). As MMPs são secretadas como pró-enzimas inativas (zimogênios) e são ativadas no tecido pela clivagem do propeptídeo. Todos os membros desta família têm um domínio catalítico ligado ao zinco e ao cálcio, de modo que dependem desses íons para sua atividade. As MMPs estão amplamente distribuídas no corpo e estão envolvidas em processos fisiológicos e patológicos. As MMPs podem ser isoladas em uma série de tecidos e células orais, dentre eles destacam-se: a dentina, os odontoblastos, os odontoclastos, a polpa dentária e tecidos periapicais (MACIEJCZYK et al., 2016).

A polpa dental é constituída por um tecido conjuntivo frouxo formado por fibroblastos, odontoblastos, células endoteliais, colágeno, substância fundamental amorfa, células do sistema imune, além de vasos sanguíneos e nervos (FELDENS & KRAMER, 2012). O diagnóstico de vitalidade da polpa é tradicionalmente baseado em avaliações clínicas e radiográficas. No entanto, a extensão e gravidade da pulpíte podem variar e os sinais e sintomas clínicos podem estar mal correlacionados com a aparência histológica da polpa dentária envolvida (SELTZER et al., 1963). Portanto, métodos de diagnóstico quantitativos e qualitativos reproduzíveis para avaliar a saúde pulpar podem ser importantes ferramentas para o futuro da endodontia clínica.

As doenças pulpares e perirradiculares são respostas do sistema imunológico à microbiota, resultando na formação de produtos inflamatórios e fatores de reabsorção. No caso de inflamação pulpar, há degradação da proteína da matriz que é mediada por endopeptidases. As gelatinas desnaturadas são a laminina, elastina, fibronectina e colágeno associado à zona da membrana basal degradadas por MMP-2 e MMP-9. Cada vez mais, estudos relatam o papel das metaloproteinases no diagnóstico de processos inflamatórios dentários. Alguns estudos avaliaram a correlação entre a inflamação dos tecidos da polpa

dentária e dos níveis de MMPs (MMP-1, -2, -3, -8 e -9) e outros marcadores moleculares (interleucinas, prostaglandinas, entre outros) em dentes permanentes (GUSMAN et al., 2002; MENTE et al., 2016). Sabe-se também que, os odontoblastos isoladamente secretam MMPs em processos fisiológicos e em condições patológicas (JAIN & BAHUGUNA, 2015).

A cárie dentária é causada por uma infecção oportunista de conteúdo microbiano misto e sempre causará uma inflamação pulpar uma vez que atingiu a dentina. Em um estágio avançado, o processo inflamatório pode através das fibras nervosas nociceptivas desencadear dor. Como qualquer outra inflamação, a pulpíte está associada à degradação tecidual (GUSMAN et al., 2002). Durante o processo de formação da lesão de cárie ou em episódios de erosão em dentina, a parte mineral é dissolvida e a matriz orgânica desmineralizada é exposta para degradação. Esta quebra se dá pela presença de bactérias e por enzimas derivadas do hospedeiro, como as MMPs (TJÄDERHANE et al., 1998; CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006; BOUSHELL, NAGAOKA, YAMAUCHI, 2011; BUZALAF, KATO, HANNAS, 2012). No entanto, sabe-se que a contribuição das collagenases bacterianas para a degradação da matriz orgânica dental é menos importante do que se pensava inicialmente (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006). Por outro lado, tem sido demonstrado que atividades proteolíticas endógenas, incluindo derivadas das MMPs, tanto da dentina como da saliva, são capazes de degradar a matriz dentinária previamente desmineralizada por ácidos bacterianos (TJÄDERHANE et al., 1999; CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006).

Para Jain e Bahuguna (2015), vários estudos mostraram que as bactérias e seus produtos regulam MMP-1 e MMP-2 em células pulpares, mas não possuem efeito sob MMP-9. Os níveis de MMP-1, -2 e -3 expressados principalmente por monócitos/macrófagos e fibroblastos são significativamente maiores no tecido com pulpíte aguda do que no tecido pulpar saudável. A presença aumentada de MMPs em local de lesão cariada, polpa inflamada e tecido periapical, e o fato de que se a resposta inflamatória diminui, o nível de MMPs também diminui, leva a conclusão que as MMPs desempenham um papel importante na degradação da estrutura de colágeno e disseminação da patologia. Ao mesmo tempo, as MMPs são componentes essenciais no processo de remodelação tecidual fisiológica. Da mesma forma, a destruição da MEC seria a chave para o início da progressão da inflamação e para a renovação fisiológica do tecido pulpar, os quais requerem a atividade de distintas endopeptidases atuando sobre esse tecido. Sabe-se que as MMPs possuem papel importante nesse processo (GUSMAN et al., 2002; AHMED et al., 2013; MENTE et al., 2016). As MMPs demonstraram atuar nos casos de doença pulpar e estudos mostram que elas podem ser usadas como marcadores de diagnóstico não invasivo de doenças pulpares e marcadores

prognósticos de procedimentos como o manejo da cárie profunda. (ZEHNDER et al., 2011; SAMBANDAM & NEELAKANTAN, 2014; MENTE et al., 2016).

Para Abbott e Yu (2007), quando um dente está sendo examinado para doença pulpar, a condição dos tecidos periapicais também deve ser avaliada, e vice-versa, pois a condição periapical é geralmente associada a condições inflamatórias da polpa (isto é, pulpite reversível e irreversível), ou infecção do espaço pulpar após necrose da polpa ou após tratamento endodôntico prévio. Isso é, doenças periapicais são geralmente uma consequência direta e / ou uma continuação da interação com o sistema de canais radiculares. Segundo Alvares et al. (2017), a MMP-9 pode desempenhar um papel importante na manutenção das lesões periapicais, pois são essenciais para o início da reabsorção óssea e também participam como moduladores das respostas inflamatórias agudas e crônicas, uma vez que podem ativar mediadores pró-inflamatórios e imunorregulatórios (como o TGF- β 1). As proteínas da família MMP provocam dois papéis na patogênese da inflamação, estimulando as funções do sistema imunológico inato e / ou adaptativo, bem como destruição tecidual (SAMBANDAM & NEELAKANTAM, 2014).

Para entender a biologia da polpa em dentes decíduos, é necessário ampliar os conhecimentos das alterações histológicas da polpa em dentes decíduos durante a reabsorção radicular. Essas alterações são mediadas não apenas por células, mas também pelas interações entre células e proteínas na matriz extracelular, e isto pode explicar a reação dentária frente aos danos e ao tratamento ser modificada durante a reabsorção fisiológica. A expressão de tenascina, colágeno I e a osteonectina foi reduzida na matriz extracelular e odontoblastos durante a reabsorção radicular. Este fato pode estar relacionado à diminuição da resposta da polpa ao dano e tratamento durante a progressão da reabsorção radicular (BÖNECKER et al., 2009). Para Guedes-Pinto e Mello-Moura, 2016, dentes decíduos com mais de um terço de raiz reabsorvida respondem mal aos processos reparativos. Infelizmente, grande parte dos molares decíduos que sofrem intervenção pelo clínico, está nesta faixa ou com reabsorções radiculares mais avançadas. Assim, essa situação contraindica o uso de medicamentos que necessitem respostas pulpares reparadoras para o bom êxito do tratamento.

Uma importante diferença entre os dentes permanentes e dentes decíduos é que as raízes dos decíduos normalmente sofrem reabsorção, e esse processo é acompanhado por alterações graduais na polpa, principalmente nos seus estágios mais avançados. A participação da polpa na reabsorção fisiológica das raízes dos dentes decíduos é controversa, uma vez que este tecido também é eliminado e se mantém vital após o início da reabsorção (FELDENS & KRAMER, 2012). Para Linsuwanont et al. (2002) ao avaliar dentes decíduos

bovinos, mostraram que a MMP-9 é uma proteinase altamente expressa em osteoclastos, por isso tem sido postulado que desempenha um papel importante na reabsorção, mas o verdadeiro papel desta enzima durante a reabsorção dentária decídua ainda não foi esclarecido. O conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de reabsorção fisiológica dos dentes decíduos pode contribuir para o estudo da imunopatogenia das reabsorções dentárias e futuramente resultar na aplicação clínica de mediadores moleculares para atrasar ou mesmo inibir esse processo (DE ROSSI & DE ROSSI, 2010). Segundo Santos (2012), o tecido pulpar dos dentes decíduos parece ter participação ativa no processo de reabsorção radicular, seja este fisiológico ou inflamatório.

Com base no que foi exposto, nota-se a carência em estudos que expliquem as particularidades da polpa dos dentes decíduos, frente à cárie dentária, inflamação e necrose da polpa e a relação com a reabsorção fisiológica das raízes, e a relação destas alterações com a expressão e a atividade gelatinolítica de MMPs 2 e 9 na polpa dos dentes decíduos, podendo ser utilizadas como futuros biomarcadores.

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi comparar a expressão e atividade da MMP-2 e MMP-9, além da atividade gelatinolítica na polpa de dentes decíduos com padrões distintos de reabsorção radicular e condição pulpar.

Objetivo específico

1- Determinar se fatores como: (a) sintomatologia dolorosa atual ou anterior, (b) presença de cripta, (c) lesão periapical e (d) idade, podem influenciar na expressão da MMP-2 e MMP-9, e na atividade gelatinolítica das polpas de dentes decíduos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O presente estudo está de acordo com a Resolução CNS/CONEP 466/12 e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade Meridional (IMED), parecer n°2249269 (ANEXO 1).

3.2 Delineamento do estudo

Este estudo incluiu 38 pacientes, com faixa etária entre 4 e 10 anos, que foram convidados a participar do estudo a partir de contato direto com seus pais ou responsável legal, nas clínicas de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da IMED (Clínica Infantil I e II), no período de agosto de 2016 até junho de 2018, sendo coletada uma amostra de polpa dentária de dente molar por indivíduo. Os voluntários foram selecionados atendendo aos seguintes critérios de inclusão: (a) apresentar alguma evidência clínica das condições estudadas (dor, fistula, alteração de cor) ou radiográficas de uma lesão cariosa profunda próxima à câmara pulpar em pelo menos um dente decíduo. Os critérios de exclusão foram os seguintes: (a) paciente com qualquer doença sistêmica; (b) paciente com qualquer síndrome; (c) paciente sob prescrição de qualquer medicamento; (d) paciente onde não seria possível o uso de isolamento absoluto do campo operatório para o tratamento e coleta do tecido pulpar.

Espaçamento com 6 pts

Os pacientes foram submetidos ao exame anamnésico, exame clínico e radiográfico, de forma padronizada, de acordo com as normas das disciplinas de Clínica Infantil I e II da escola de Odontologia da Faculdade Meridional IMED. Foram então selecionados pacientes saudáveis, apresentando padrões distintos de condição pulpar (sadia, inflamada e necrótica) e de reabsorção radicular (presente ou ausente).

Espaçamento com 6 pts

As amostras de polpa, foram classificadas de acordo com a condição pulpar onde polpa sadia era aquela onde não havia histórico de dor ou sintomatologia dolorosa, não havia lesão periapical, nem lesão de cárie, eram amostras provenientes de elementos dentários indicados para exodontia por razões ortodônticas, polpas inflamadas devido ao paciente apresentar dor, não apresentar lesão periapical e apresentar sangramento no momento da abordagem, polpas necróticas, as quais poderiam apresentar histórico de dor ou sintomatologia dolorosa atual, lesão periapical ou não, e que ao realizar a abordagem não apresentasse sangramento.

A reabsorção radicular foi considerada presente quando mais de 1/3 apical estava reabsorvido e ausente quando ao exame radiográfico não se verificava essa alteração.

Após verificada a necessidade de tratamento pulpar, ou a necessidade de extração do elemento (ausência de cripta do dente permanente, mais de 2/3 de reabsorção radicular em alguma das raízes ou elemento dentário sem condições de restauração), as polpas foram obtidas e os dados relativos ao voluntário foram preenchidos em uma ficha com informações individuais desenvolvida para a pesquisa (APÊNDICE 1).

3.3 Coleta das amostras de polpa para análise enzimática

Para os pacientes incluídos no estudo, com necessidade de terapia pulpar radical, foi realizado o isolamento absoluto do campo operatório, e remoção de cárie com brocas e curetas. Após abordagem, a polpa vital foi coletada com cureta estéril, dispensada em placa de vidro estéril, imediatamente cortada com auxílio de bisturi número 11 e dispensada em tubos de plástico de 2 mL identificados contendo meio de cultura DMEM. Já a polpa necrótica foi coletada com o auxílio de cones de papel estéril. Os mesmos ficaram em contato com o tecido necrótico por 2 minutos e após dispensados em tubos de plástico de 2 mL contendo meio de cultura DMEM.

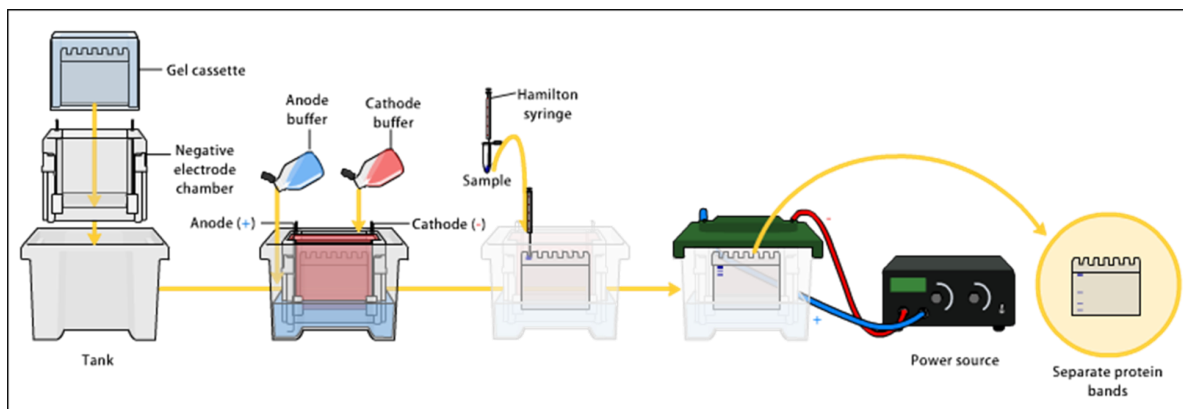
Os elementos decíduos que tiveram indicação de extração, por motivos ortodônticos ou por não se possível a realização de tratamento pulpar (devido a ausência de cripta, reabsorções de mais de 2/3 radiculares, ou impossibilidade de restauração) foram extraídos e imediatamente cortados com auxílio de uma turbina de alta rotação refrigerada com soro fisiológico, para posterior acesso à câmara pulpar e remoção da polpa coronária com curetas esterilizadas, seguindo o mesmo processamento descrito anteriormente.

Espaçamento com 6 pts

Após a obtenção das amostras provenientes das polpas dos voluntários, as mesmas foram levadas imediatamente ao laboratório de Biologia Molecular para o início do seu processamento para a extração das enzimas. Cada amostra foi individualmente e vigorosamente agitada em vórtex por três minutos. Após, foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi removido e congelado em freezer -20°C (Freezer Indrel/IULT 335D) até a análise por zimografia (VAN STRIJP et al., 2003; KATO et al., 2014). As amostras foram descongeladas e a concentração total de proteínas presente nos sobrenadantes foi determinada pelo método de Bradford de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), usando albumina de soro bovino como padrão.

3.4 Zimografia

Alíquotas de 15 uL das amostras de meio condicionado por tecido pulpar de cada voluntário foram misturadas numa proporção 5:1 em volume, em tampão não redutor (2% dodecil sulfato de sódio (SDS); 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% Glicerol, e 0.001% Azul de bromofenol). A seguir, as alíquotas foram incubadas por duas horas à temperatura de 26°C até o momento de sua inserção nos poços do gel, e então realizada a eletroforese, a 15 mA e 220V (Figura 1). Para a certificação de que as proteínas avaliadas são MMPs, um gel foi incubado em 0,5 mM de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético- Synth), um conhecido e poderoso inibidor de MMPs. Também foi usado um padrão de peso molecular de baixos intervalos SDS-PAGE (BenchMark Protein Ladder™, Cat 10747-012). Adicionalmente, enzimas recombinantes, MMP-2 (Chemicon International, Temecula, EUA) e MMP-9 (Invitex GmbH, Berlim, Alemanha) foram carregadas no gel utilizando 2 µL de cada MMP, como controles positivos. Os géis foram lavados duas vezes em solução de Triton X-100 a 10% por 60 min em temperatura ambiente. Cada gel foi incubado a 37°C overnight (19h) em tampão de 50 mM de Tris-HCl, pH 7.4, contendo 5 mM de CaCl₂ (Tris – CaCl₂). Por fim os géis foram corados com 0,2% Azul de comassie R-250 e descorados com solução aquosa de 10% de ácido acético e 10% de metanol. As atividades enzimáticas foram detectadas como bandas não coradas nos géis. Estas bandas foram escaneadas, digitalizadas e analisadas com o programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).



Fonte: autor.

Figura 1. Esquema da realização da eletroforese (Fonte: Wikipedia).

Legenda deve ser inserida acima da figura

3.5 Análise dos Resultados

Os dados obtidos pelo preenchimento da ficha clínica e da quantificação das bandas dos géis foram tabulados em uma planilha do Excel 2016 para posterior análise do pacote estatístico SPSS (Estatística para Mac OS Versão 25.0. Armonk, NY/ IBM Corp). Assim, a ficha clínica forneceu variáveis categóricas (dor atual, histórico de dor, cripta, lesão periapical, condição pulpar e reabsorção radicular), enquanto a quantificação das bandas forneceu as variáveis quantitativas (MMP-2, MMP-9 e atividade gelatinolítica). Estatística descritiva foi utilizada para demonstrar o percentual de distribuição dos casos de acordo com as variáveis categóricas. Para os dados quantitativos, o teste de normalidade foi aplicado e os dados foram analisados pelo teste Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

Retirar o espaçamento com 6 pts

Quando uma das categorias obteve tamanho (n) menor que 12 sujeitos, as variáveis quantitativas foram representadas diretamente por mediana e intervalo interquartilico e comparados por testes não paramétricos - Mann-Whitney (variáveis: Sintomatologia Dolorosa, Histórico Dor, Cripta, Lesão Periapical e Reabsorção) ou Kruskal-Wallis (variável: Condição Pulpar). Quando o teste Kruskal-Wallis foi significativo o teste post-hoc de Dunn foi realizado. Para verificar a correlação das medidas MMP-9, MMP-2 e Atividade Gelatinolítica e idade foi realizado a correlação de Spearman.

Retirar o espaçamento com 6 pts

As proporções das variáveis estudadas foram comparadas entre as marcações (positivo vs negativo) de Atividade Gelatinolítica (composta pelas marcações de MMP9 + MMP2). Quando um dos marcadores teve resposta zero a Atividade Gelatinolítica foi classificada como negativa. Para realizar a associação entre a Atividade Gelatinolítica (Negativa e Positiva) e as variáveis estudadas foi realizado o teste qui-quadrado. Quando significativo, foi usada a análise de resíduos padronizados ajustados.

Retirar o espaçamento com 6 pts

O nível de significância adotado foi de 0,05. As análises foram realizadas no SPSS v.25.

4. RESULTADOS

4.1 Análise descritiva

As amostras das polpas de dentes decíduos de pacientes com idade entre 4 e 10 anos foram avaliadas no presente estudo, com média de idade e desvio-padrão de $7,4 \pm 1,6$ anos e as demais variáveis quantitativas representadas pela mediana e intervalo interquartilico (mediana [p25; p75]), dependendo da distribuição verificada pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

Das 38 amostras obtidas, quatro foram desconsideradas, pois não ocorreu marcação no gel de poliacrilamida, possivelmente por remoção de material insuficiente durante a coleta, pois esses dentes já estavam em processo avançado de rizólise, com muito pouco tecido pulpar presente na câmara pulpar, por isso foram consideradas 34 amostras de tecido pulpar.

A estatística descritiva para as variáveis categóricas revelou que dos 34 pacientes avaliados 18 (53%) apresentavam dor relacionada ao dente em questão no momento do tratamento e 23 (67,7%) haviam sentido dor no passado ou estavam com dor no momento do tratamento. A cripta do elemento permanente estava presente em 17 dos casos (50%). Quinze elementos dentários (44,1%) apresentavam lesão periapical e reabsorção radicular estava presente em 16 (47,1%). (Tabela 1)

Tabela 1- Distribuição das variáveis categóricas (número absoluto seguido pelo percentual).

Variáveis categóricas	Sim	Não
Sintomatologia dolorosa presente	18 (53%)	16 (47%)
Sintomatologia dolorosa passada	23 (67,7%)	11 (32,3%)
Presença de cripta	17 (50%)	17 (50%)
Lesão periapical	15 (44,1%)	19 (55,9%)
Reabsorção radicular	16 (47,1%)	18 (52,9%)

Alinhamento errado da Tabela

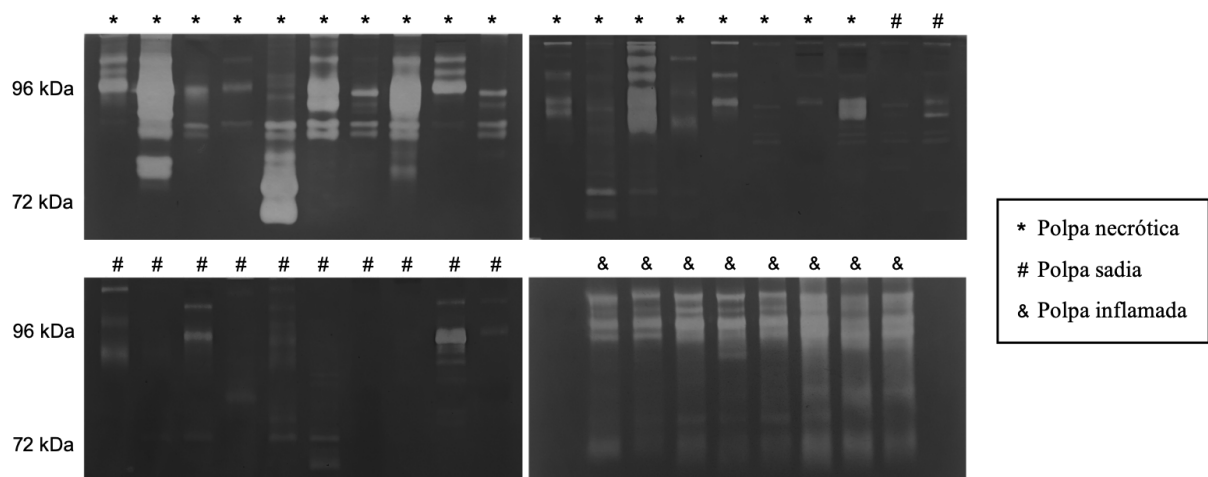
Sobre a condição pulpar, foram consideradas sadias 8 polpas (23,5%), 8 polpas (23,5%) com processo inflamatório e 18 polpas (52,4%) necróticas. (Tabela 2).

Tabela 2- Condição pulpar das amostras avaliadas, (número absoluto seguido pelo percentual).

Condição pulpar	Número de casos (%)
Polpas saudias	8 (23,5%)
Polpas inflamadas	8 (23,5%)
Polpas necróticas	18 (53%)

alinhamento errado da tabela

As atividades enzimáticas foram detectadas como bandas não coradas nos géis. Estas bandas foram escaneadas, digitalizadas e analisadas com o programa ImageJ (Figura 2).



Legenda deve ser inserida acima da figura

Figura 2. Imagem digitalizada dos 4 géis de poliacrilamida com as 38 amostras analisadas. As colunas marcadas com (*) indicam amostras obtidas de polpas necróticas, enquanto (#) indica amostras de polpa sadia e (&) amostras de polpa inflamada.

4.2 Avaliação da expressão de MMP-2

Como pode ser observado na Tabela 3, a presença de lesão periapical e condição pulpar foram estatisticamente significantes para MMP-2 ($p < 0,05$). Polpas dentárias com lesão periapical envolvida apresentaram valores de MMP-2 maiores do que aquelas que não apresentavam essa condição ($p < 0,05$). Para a variável condição pulpar, polpas saudias apresentaram menor expressão de MMP-2 quando comparadas a polpas necróticas ($p < 0,05$).

Em relação à presença ou ausência de cripta e a presença ou ausência de reabsorção radicular, não houve diferença significativa, quanto à expressão de MMP-2 ($p > 0,05$).

4.3 Avaliação da expressão de MMP-9:

Os indivíduos que apresentavam sintomatologia dolorosa atual ou passada e lesão periapical tiveram maior marcação de MMP-9 ($p < 0,05$). Em termos de condição pulpar, ocorreu uma maior marcação de MMP-9 ($p < 0,05$), porém, os que apresentavam polpa sadia, obtiveram menor marcação de MMP-9 ($p < 0,05$). Em relação à presença ou ausência de cripta e de reabsorção radicular não houve diferença significativa, quanto à expressão de MMP-9.

4.4 Avaliação da atividade gelatinolítica

As variáveis, sintomatologia dolorosa atual ou passada, lesão periapical e condição pulpar foram estatisticamente significantes para atividade gelatinolítica ($p < 0,05$). Para a variável condição pulpar, as polpas sadias demonstraram menor atividade gelatinolítica em relação à polpa necrótica somente ($p < 0,05$). Sobre a presença ou ausência de cripta e reabsorção radicular, não houve diferença significativa, quanto a atividade gelatinolítica ($p > 0,05$).

Tabela 3 - Comparação da MMP-9, MMP-2 e atividade gelatinolítica entre as variáveis categóricas estudadas.

		MMP-9		P
		mediana [p25; p75]	min- máx	
Dor Atual+	Sim	24.876.822 [11.455.569; 33.544.782]	1.267.054 - 46.814.347	0,014*
	Não	7.345.397 [2.042.737; 13.061.631]	1.200.205 - 43.638.175	
Histórico Dor+	Sim	24.671.711 [11.304.711; 33.544.782]	1.267.054 - 46.814.347	0,002*
	Não	2.546.882 [1.522.024; 12.854.673]	1.200.205 - 43.638.175	
Cripta+	Presente	13.268.589 [6.704.036; 33.044.853]	1.267.054 - 46.814.347	0,983
	Ausente	12.466.731 [2.546.882; 25.213.468]	1.200.205 - 40.878.782	
Lesão Periapical+	Sim	25.081.933 [18.144.711; 33.544.782]	7.884.368 - 40.878.782	0,004*
	Não	6.704.036 [1.805.005; 12.854.673]	1.200.205 - 46.814.347	
Condição Pulpar++	Sadia	2.042.737 [1.396.196; 2.584.933] A	1.200.205 - 12.854.673	0,001*
	Inflamada	11.961.150 [8.064.752; 33.857.968] B	3.766.033 - 43.638.175	
	Necrótica	24.876.822 [13.268.589; 33.544.782] B	1.267.054 - 46.814.347	
Reabsorção+	Presente	11.961.150 [2.413.675; 25.147.701]	1.200.205 - 40.878.782	0,422
	Ausente	18.606.883 [6.704.036; 33.044.853]	1.267.054 - 46.814.347	
		MMP-2		P
Dor Atual+	Sim	10.080.922 [3.305.021; 15.416.232]	0 - 40.122.146	0,365
	Não	3.106.141 [1.588.701; 10.900.663]	0 - 43.439.125	
Histórico Dor+	Sim	10.438.170 [3.305.021; 16.888.296]	0 - 43.439.125	0,098
	Não	2.589.188 [1.478.075; 9.205.304]	0 - 42.766.803	
Cripta+	Presente	9.205.304 [1.256.589; 13.904.614]	0 - 42.766.803	0,786
	Ausente	8.226.008 [2.589.188; 15.356.312]	0 - 43.439.125	
Lesão Periapical+	Sim	13.904.614 [8.226.008; 16.888.296]	0 - 43.439.125	0,036*
	Não	2.663.995 [1.256.589; 9.723.674]	0 - 42.766.803	
Condição Pulpar++	Sadia	2.473.708 [1.588.701; 3.106.141] A	1.256.589 - 9.205.304	0,026*
	Inflamada	1.652.511 [0; 23.534.656] AB	0 - 42.766.803	
	Necrótica	12.171.392 [8.226.008; 16.888.296] B	0 - 43.439.125	
Reabsorção+	Presente	5.868.139 [2.028.777; 12.220.840]	0 - 43.439.125	0,443
	Ausente	9.987.124 [1.478.075; 20.421.196]	0 - 42.766.803	
		Atividade Gelatinolítica		P
Dor Atual+	Sim	34.737.404 [23.537.683; 50.126.646]	7.884.368 - 71.472.614	0,020*
	Não	11.738.520 [3.980.307; 33.415.898]	3.221.350 - 86.404.978	
Histórico Dor+	Sim	35.651.638 [19.112.752; 54.743.836]	7.884.368 - 71.472.614	0,001*
	Não	4.944.463 [3.766.033; 14.111.262]	3.221.350 - 86.404.978	
Cripta+	Presente	23.537.683 [10.009.057; 43.312.634]	3.766.033 - 86.404.978	0,786
	Ausente	33.307.941 [6.095.169; 47.548.292]	3.221.350 - 56.983.563	
Lesão Periapical+	Sim	35.651.638 [32.973.668; 54.743.836]	7.884.368 - 56.983.563	0,010*
	Não	11.010.309 [4.101.058; 41.389.200]	3.221.350 - 86.404.978	
Condição Pulpar++	Sadia	4.522.761 [3.708.995; 8.552.739] A	3.221.350 - 14.111.262	0,001*
	Inflamada	11.961.150 [9.717.263; 57.392.624] AB	3.766.033 - 86.404.978	
	Necrótica	37.800.987 [32.973.668; 54.743.836] B	7.884.368 - 56.983.563	
Reabsorção+	Presente	16.612.007 [5.519.816; 41.599.965]	3.221.350 - 56.983.563	0,365
	Ausente	33.009.261 [10.009.057; 50.126.646]	3.766.033 - 86.404.978	

+Teste de Mann-Whitney ++Teste de Kruskal-Wallis (Teste post-hoc de Dunn)

#letras distintas representam distribuições diferentes estatisticamente

A tabela 4 demonstra a comparação entre as variáveis condição pulpar (polpa sadia, inflamada e necrótica) e atividade enzimática (MMP-2, MMP-9 e atividade gelatinolítica). Pode-se observar que para as polpas sadias não houve diferença estatística entre MMP-2 e MMP-9 ($p>0,05$), já para as polpas inflamadas e necróticas a expressão e atividade da MMP-9 foi estatisticamente maior que a MMP-2 ($p<0,05$). Independente da condição pulpar, a atividade gelatinolítica foi maior do que a expressão e atividade da MMP-2 e MMP-9 ($p<0,05$). A expressão e atividade da MMP-2 foi estatisticamente menor nas polpas sadias, quando comparada com as polpas inflamadas e necróticas ($p<0,05$). O mesmo ocorreu para a MMP-9 e a atividade gelatinolítica, que demonstraram uma expressão e atividade maiores em polpas inflamadas e necróticas ($p<0,05$).

A palavra "Tabela" é em negrito

Tabela 4. Avaliação da expressão e atividade da MMP-2, MMP-9 e atividade gelatinolítica, de acordo com a condição pulpar (polpa sadia, inflamada e necrótica).

Condição Pulpar	Expressão e atividade proteica		
	MMP-2	MMP-9	Gelatinolítica
Sadia	30,9 (\pm 9,1) Aa	32,6 (\pm 13,8) Aa	63,6 (\pm 14,2) Ab
Inflamada	116,4 (\pm 61,9) Ba	193,9 (\pm 53,9) Bb	310,4 (\pm 113,6) Bc
Necrótica	147,4 (\pm 27,4) Ba	242,1 (\pm 29,3) Bb	389,5 (\pm 34,4) Bc

Letras maiúsculas diferentes demonstram diferença estatística significativa [comparação em colunas ($p<0,05$)].
Letras minúsculas diferentes demonstram diferença estatística significativa [comparação em linhas ($p<0,05$)].

5. DISCUSSÃO

Autores com letras devem ser padronizadas em “MAIÚSCULAS”
substituir & por ;

As metaloproteinases da matrix extracelular (MMPs) são enzimas proteolíticas que têm sido associadas à instalação e progressão de cárie, indicadoras de inflamação do tecido pulpar e parecem desempenhar papel importante na reabsorção óssea e dentária. O presente estudo descreve um método viável e reprodutível para avaliar a expressão e a atividade gelatinolítica de MMPs da polpa de dentes decíduos por meio de uma análise enzimática por zimografia. A análise enzimática por zimografia tem sido considerada um método simples, quantificável e sensível. Esse método é amplamente utilizado para o estudo de enzimas que degradam a matriz extracelular, como as gelatinases (MMP-2 e MMP-9). A técnica de detecção de metaloproteinases por zimografia é extremamente sensível, sendo capaz de detectar nas amostras níveis inferiores à 10 pg de MMP-2, tendo um desempenho superior até mesmo ao método ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) (LEBER & BALKWILL, 1997). Dessa forma, em nosso melhor conhecimento da literatura, esta é a primeira descrição deste tipo de avaliação em polpas de dentes decíduos.

Com o intuito de avaliar condições de normalidade, inflamação e necrose da polpa de dentes decíduos, e sua relação com a presença ou ausência de reabsorção radicular e outros fatores, nossos resultados mostraram uma maior marcação de MMP-9 em pacientes com polpa necrótica e sintomatologia dolorosa. O que está de acordo com [Gusman et al.\(2002\)](#), os quais avaliaram os níveis de MMPs (-1, -2, -3, e -9) em polpas dentais humanas, de dentes permanentes com condições de normalidade e inflamação, através dos ensaios ELISA e zimografia. De acordo com os resultados, a alta quantificação absoluta de MMP-9 em polpas inflamadas e a correlação positiva com a atividade gelatinolítica, sugerem que a MMP-9 tem uma importância na degradação do tecido pulpar em processos inflamatórios. Já para MMP-2, houve um maior valor absoluto para polpas saudáveis. Os dados obtidos sugerem um papel fundamental MMP-9 na quebra do tecido pulpar humano inflamado, em dentes permanentes. A MMP-9 parece ser um marcador proteico promissor para avaliar a saúde pulpar. E de acordo com [Mente et al.\(2016\)](#), pacientes com pulpites apresentam maior marcação de MMP-9, são estes pacientes que em nosso trabalho são classificados apresentando dor, e que também demonstraram maior atividade da MMP-9 e atividade gelatinolítica.

O número de amostras avaliadas em nosso trabalho foi de 34 polpas de dentes decíduos, onde neste total existiam 8 polpas saudáveis, 8 polpas inflamadas e 18 polpas necróticas, número semelhante ao investigado no trabalho de [Accorsi-Mendonça et al. \(2013\)](#), onde foram avaliados 20 espécimes de tecido pulpar de dentes permanentes, sendo 10

amostras clinicamente saudáveis, obtidas de terceiros molares impactados após exodontia e 10 polpas inflamadas, oriundas de posterior exposição cariosa. No trabalho de [Accorsi-Mendonça et al. \(2013\)](#), os resultados demonstraram níveis aumentados de MMP-2 ativa e MMP-9 em polpas inflamadas em comparação com os tecidos saudáveis, o que concorda com nossos resultados. Por outro lado, ao contrário dos resultados do nosso estudo, a MMP-2 ativa não foi mostrada em amostras saudáveis. Ainda assim, pode-se considerar que em geral os resultados de [Accorsi-Mendonça et al. \(2013\)](#) estão de acordo com os resultados obtidos em nosso estudo, já que houve menor marcação de MMP-2 e MMP-9 em polpa sadia e maior atividade de MMP-2 e MMP-9 em dentes que apresentam dor, por consequência de estarem inflamados.

Da mesma forma, houve diferença significativa entre MMP-2, MMP-9 e atividade gelatinolítica, nos casos de pacientes com dor ou histórico de dor, onde nossos resultados demonstraram maior marcação de MMP-9. O que está de acordo com a revisão sistemática de [Chua e Neelakantan \(2015\)](#), que relata que o nível de MMP-9 foi significativamente elevado em polpas dentárias humanas inflamadas. Em contraste, os níveis de MMP-2 e MMP-3 foram reduzidos em polpas inflamadas sintomáticas em comparação com polpas normais. Isto sugere o papel principal da MMP-9 na degradação do tecido pulpar humano inflamado. O papel de MMP-9 na polpa inflamada é ainda apoiado por outro trabalho que também observou que o gene mRNA da MMP-9 era aumentado em polpas inflamadas. Além disso, a localização *in situ* da expressão de MMP-9 em amostras de polpa mostrou maior expressão de MMP-9 em polpas inflamadas em comparação com polpas saudáveis (TSAI et al., 2005). Ainda, o aumento da atividade de MMP-9 e MMP-2 também foi mostrado no fluido gengival crevicular de dentes com lesões periapicais. E dentes sintomáticos tiveram níveis de MMP-9 significativamente maiores do que aqueles com polpa saudável. Dessa forma, reforçando que o uso de MMP-9 e MMP-2 como marcadores biológicos pode ser suportado.

Para Zehnder et al. (2011), o diagnóstico pode ser melhorado usando marcadores moleculares encontrados no fluido dentinário. Foi realizado um estudo piloto onde avaliaram a detecção de MMP-9 no líquido dentinário de polpas sintomáticas e polpas saudáveis. As amostras de dentes sintomáticos tiveram MMP-9 significativamente em maior quantidade do que nas polpas saudáveis. Nenhum dos espécimes saudáveis continham quantidades detectáveis de MMP-9 em dentes permanentes. Em contra partida, nossos resultados demonstram que esses mesmos marcadores podem ser encontrados na polpa dentária dos dentes decíduos, e que dentes decíduos sintomáticos apresentam marcação para MMP-9.

Somando-se a estes trabalhos, [Martinho et al.](#)(2016), salienta que MMPs, TIMPs e seus complexos estão envolvidos na periodontite apical, interagindo no desenvolvimento de características clínicas e na gravidade da destruição óssea. Esse trabalho relacionou a MMP-9 ao aumento de dor a percussão, enquanto níveis mais altos de MMP-2 diminuíram a chance de sintomatologia clínica. MMP-1, -2 e -9 foram encontradas em dentes com lesões radioluscentes de tamanho maior, isto é, com maior área de destruição óssea em dentes permanentes. Nosso trabalho mostrou uma maior expressão de MMP-2, MMP-9 e atividade gelatinolítica nos casos onde existia lesão periapical nos dentes decíduos. Concordando com [Carneiro \(2006\)](#), que concluiu em seu trabalho que as imunomarcações nos granulomas periapicais para MMP-2 apresentou um padrão mais difuso em comparação com a MMP-9 que apresentou um padrão mais localizado e restrito e [Wan et al. \(2014\)](#), que avaliaram se a MMP-9 estava envolvida na formação e progressão de lesões periapicais em ratos e obtiveram a conclusão que quanto maior a presença de MMP-9, maior a lesão periapical e maior a resposta inflamatória.

O trabalho de [Ahmed et al.](#) (2013), avaliou a hipótese de que a expressão de MMP-9 é significativamente elevado em pacientes com periodontite apical sintomática em dentes permanentes e correlacionou com a quantidade de bactérias gram-negativas. Os resultados demonstraram uma correlação positiva entre a presença de bactérias gram-negativas, MMP-9 e lesões periapicais sintomáticas, sugerindo que as bactérias poderiam ativar a MMP-9. Resultados similares foram encontrados em nosso trabalho, onde a expressão de MMP-9 e atividade gelatinolítica foram maiores em amostras de polpas de pacientes que apresentavam dor e lesão periapical, com a diferença que nossos resultados referem-se a dentes decíduos. [Faustino et al. \(2016\)](#), concluíram que MMP-2 e MMP-9 são altamente expressos em lesões periapicais de infecções endodônticas primárias. Além disso, o trabalho sugere que a MMP-2 é mais expressa no granuloma periapical e nos casos associados à dor, o que diverge dos nossos resultados, onde apenas a MMP-9 foi associada aos casos relacionados à dor.

Em nosso estudo não foi possível demonstrar associação entre expressão de MMP-2, MMP-9 e atividade gelatinolítica com reabsorção das raízes em dentes decíduos. Esses resultados divergem dos encontrados por [Oshiro et al. \(2001\)](#), os quais sugerem que os mecanismos celulares de reabsorção radicular fisiológica em dentes decíduos parecem ser semelhantes aos da reabsorção óssea osteoclástica, com o envolvimento de MMP-9 dentre outras enzimas. [De Rossi e De Rossi \(2010\)](#), também afirmam que no processo de rizólise, o início da reabsorção da matriz parece ser regulado por colagenases (MMP-1), e que sua progressão envolve a ação das gelatinases (MMP-2 e -9), que também atuam na degradação

de colágeno, laminina, elastina e fibronectina. Sugerem ainda que a expressão da MMP-9 está aumentada nos dentinoclastos durante o processo de rizólise. Assim, a caracterização e função específica das MMPs envolvidas nos diferentes estágios de reabsorção dentária não estão completamente definidas. Embora a MMP-9 tenha sido relatada por desempenhar esse papel, a associação desta enzima durante a reabsorção dentária decídua ainda não foi esclarecido (LINSUWANONT, et al., 2002). Também, é possível que a polpa não seja o tecido mais apropriado para a investigação da rizólise, já que a maior parte dos eventos ocorrem com participação do tecido periapical. Santos (2012), avaliou histologicamente as características morfológicas e comparou a expressão imunoistoquímica de fatores envolvidos na reabsorção fisiológica e reabsorção inflamatória radicular de dentes decíduos e constatou que existe um aumento na expressão de MMP-9 nos processos de reabsorção radicular de dentes decíduos, sendo maior nos casos de reabsorção radicular inflamatória. Algumas importantes diferenças devem ser levadas em consideração entre o presente estudo e o de Santos (2012), já que a autora investigou polpas de dentes decíduos, mas também o ligamento periodontal. Outra diferença importante é a de que a autora utilizou o método imunoistoquímico, que permite apenas identificar a presença das enzimas, enquanto que a zimografia identifica a presença e atividade das mesmas.

Por fim, o presente estudo sugere que assim como acontece nas polpas de dentes permanentes, a MMP-9 e a atividade gelatinolítica também participam da degradação do tecidual em dentes decíduos com polpas inflamadas e necróticas. Demonstra que além da associação já existente com relação à progressão da lesão de cárie em dentina, essa associação também ocorre para a evolução de uma inflamação do tecido pulpar até a necrose do mesmo. Além disso, ficou demonstrado que a MMP-9 e a atividade gelatinolítica estão fortemente associadas à presença de lesão periapical, além da presença e histórico de dor. Sendo assim, a possibilidade de detecção precoce da presença e atividade dessas enzimas nos tecidos dentários, ou mesmo na polpa, pode ajudar no diagnóstico e prognóstico pulpar em dentes decíduos, servindo como biomarcadores.

6. CONCLUSÕES

Formatar o texto com espaçamento 1,5.

Diante da metodologia empregada e com base nos resultados obtidos foi possível concluir que:

- 1- Foi detectada a expressão e a atividade gelatinolítica de enzimas MMP-2 e MMP-9 na polpa de dentes decíduos.
- 2- Em relação à condição pulpar (polpa sadia, inflamada ou necrótica), houve maior marcação de MMP-9 do que MMP-2. Porém, os que apresentavam polpa sadia obtiveram menor marcação de MMP-9. Pacientes que apresentaram sintomatologia dolorosa ou história de dor marcaram mais MMP-9.
- 3- Amostras de polpa com lesão periapical marcaram MMP-2 e MMP-9.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, P.V.; YU, C. A clinical classification of the status of the pulp and the root canal system. Australian Dental Journal, v. 52, n.1, p. 17-31, 2007.

AHMED, G.M.; EL-BAZ, A.A.; HASHEM, A.A.R.; SHALAN, A.K. Expression levels of matrix metalloproteinase 9 and gram-negative bacteria in symptomatic and asymptomatic periapical lesion. J Endod, v.39, n.4, p.444-8, 2013.

ALVARES, P.R.; ARRUDA, J.A.A.; SILVA, L. P.; NASCIMENTO, G.J.F.; SILVEIRA, M.F.; SOBRAL, A.P.V. Expressão imunoistoquímica de TGF- β 1 e MMP-9 em lesões periapicais. Braz. res oral, v. 31, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-3107bor-2017.vol31.0051>

ACCORSI-MENDONÇA, T.; SILVA, E.J.N.L.; MACACCINI, A.M.; GERLACH, R.F.; DUARTE, K.M.R.; PARDO, A.P.S.; LINE, S.R.P.; ZAIA, A.A. Evaluation of Gelatinases, Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-2, and Myeloperoxidase Protein in Healthy and Inflamed Human Dental Pulp Tissue. J Endod, v.39, p. 879-882, 2013.

BÖNECKER, M.; MANTESSO, A.; ARAÚJO, N.S.; ARAÚJO, V.C. Expression of proteins in the extracellular matrix of pulp tissue in human primary teeth during physiologic root resorption. Quintessence International, v. 40, n.7, p.553-8, 2009.

BOUSHELL, L. W.; NAGAOKA, H.; YAMAUCHI, M. Increased matrix metalloproteinase-2 and bone sialoprotein response to human coronal caries. Caries Res, v.45, n.5, p. 453-459, 2011. doi:10.1159/000330601

BUZALAF, M. A.; KATO, M. T.; HANNAS, A. R. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. Adv Dent Res, v. 24, n. 2, p. 72-76, 2012. doi:10.1177/0022034512455029

CARNEIRO, E. Análise da expressão de MMP-2, -9, -14, TIMP-1, -2 e RECK em granulomas e cistos periapicais. Tese. Faculdade de Bauru, USP, 2006.

CHAUSSAIN-MILLER, C.; FIORETTI, F.; GOLDBERG, M.; MENASHI, S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. J Dent Res, v.85, n.1, p. 22-32, 2006. doi:10.1177/154405910608500104

CHUA, E.; NEELAKANTAN, P. Biomarkers in the Dentin-Pulp Complex: Role in Health and Disease. The Journal of Clinical Pediatric Dentistry, v.39, n.2, p. 94-99, 2015.

DE ROSSI, A.; DE ROSSI, M. Mecanismos celulares e moleculares envolvidos na reabsorção radicular fisiológica de dentes decíduos. Pesq Bras Odontop Clin Integr, v.10, n. 3, p. 505-511, 2010.

FAUSTINO, ISP.; AZEVEDO, R.S.; TAKAHAMA, A. Metalloproteinases 2 and 9 imunoexpression in periapical lesions from primary endodontic infection: possible relationship with the histopathological diagnosis and the presence of pain. *J Endod*, v. 42, n.4, p. 547, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2015.12.020>

FELDENS, C.A.; KRAMER, P.F. Traumatismos na Dentição Decídua: Prevenção, Diagnóstico e Tratamento. 2 ed. São Paulo: Ed. Santos, 2012.

GUEDES-PINTO, A.C.; MELLO-MOURA, A.C.V. Odontopediatria. 9 edição. Ed. Santos. Rio de Janeiro, 2016.

GUSMAN, H.; SANTANA, R.B.; ZEHNDER, M. Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. *Eur J Oral Sci*, v.110, p. 353-357, 2002.

JAIN, A.; BAHUGUNA, R. Role of matrix metalloproteinases in dental caries, pulp and periapical inflammation: An overview. *Journal of oral Biology and craniofacial Research*, v.5, p.212-218, 2015.

LEBER, T.M.; BALKWILL, F.R. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Analytical Biochemistry*, v.15, p.24-8, 1997.

LINSUWANONT. B.; TAKAGI, Y.; OHYA, K.; SHIMOKAWA, H. Expression of matrix metalloproteinase-9 mRNA and protein during deciduous tooth resorption in bovine odontoclasts. *Bone*, v.31, n. 4, p.472-8, 2002.

MACIEJCZYK, M.; PIETRZYKOWSKA, A.; ZALEWSKA, A.; KNÁS,M.;DANISZEWSKA, I. The Significance of Matrix Metalloproteinases in Oral Diseases. *Adv Clin Exp Med*, v.25, n.2, 383-90, 2016.

MARTINHO, F.C.; TEIXEIRA, F.F.C.; CARDOSO, F.G.R.; FERREIRA, N.S.; NASCIMENTO, G.G.; CARVALHO, C.A.T.; VALERA, M.C. Clinical Investigation of Matrix Metalloproteinases, Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases, and Matrix Metalloproteinase/Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinase Complexes and Their Networks in Apical Periodontitis. *J Endod*, v.42, n.7, p. 1082-8, 2016. doi:10.1016/j.joen.2016.04.001.

MAZZONI, A.; BRESCHI, L.;CARRILHO, M.; NASCIMENTO, F.; ORSINI, G.; RUGGERI JR, A.; GOBBI, P.; MANZOLI, L.; TAU, F.; PASHLEY, D.; TJÄDERHANE, L. A review of the nature role, and function of dentin non-collagenous proteins. Part II: enzymes, serum proteins, and growth factors. *Endodontic topics*, v.21, p.19-40, 2012.

MENTE, J.; PETROVIC, J.; GEHRIG, H.; RAMPF, S.; MICHEL, A.; SCHÜRZ, A.; ERBER, R. A Prospective Clinical Pilot Study on the Level of Matrix Metalloproteinase-9 in Dental Pulpal Blood as a Marker for the State of Inflammation in the Pulp Tissue. *J Endod*, v.42, n.2, p. 190-197, 2016. doi:10.1016/j.joen.2015.10.020

OSHIRO, T.; SHIBASAK, Y.; MARTIN, T.J.; SASAKI, T. Immunolocalization of Vacuolar-Type H1-ATPase, Cathepsin K, Matrix Metalloproteinase-9, and Receptor Activator of NFkB Ligand in Odontoclasts During Physiological Root Resorption of Human Deciduous Teeth. *The Anatomical Record*, v.264, p. 305-311, 2001.

SAMBANDAM, V.; NEELAKANTAN, P. Matrix Metalloproteinases (Mmp) in Restorative Dentistry and Endodontics. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, v.39, n.1, p. 57-59, 2014.

SANTOS, Bianca Zimmermann dos. Estudo imunoistoquímico das reabsorções radiculares fisiológica e inflamatória de dentes decíduos. 2012. 185f. Tese (Doutorado em Odontologia - Área de Concentração Odontopediatria) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SELTZER, S.; BENDER, IB.; ZIONTZ, M. The dynamics of pulp inflammation: Correlation between diagnostic data and actual histologic findings in the pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v.16, p.846-871, 1963.

SHIN, SJ.; LEE, JI.; BAEK, SH.; LIM, SS. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *J Endod*, v.28, n.4, p.313-315, 2002.

TJÄDERHANE, L.; LARJAVA, H.; SORSA, T.; UITTO, V. J.; LARMAS, M.; SALO, T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res*, v.77, n.8, p.1622-1629, 1998.
doi:10.1177/00220345980770081001

TJÄDERHANE, L.; SULKALA, M.; SORSA, T.; TERONEN, O.; LARMAS, M.; SALO, T. The effect of MMP inhibitor metastat on fissure caries progression in rats. *Ann N Y Acad Sci*, v.878, p. 686-688, 1999.

TSAI, C-H.; CHEN, Y-J.;HUANG, F-M.; SU, Y-F.; CHANG, YC. The upregulation of matrix metalloproteinase-9 in inflamed human dental pulps. *JOE*, v.31,n.12, p.860-862, 2005.

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

WAN, C.; YUAN, G.; YANG, J.;SUN, Q.;ZHANG,L.; ZHANG, J.; ZHANG, L.; CHEN, Z. MMP9 Deficiency Increased the Size of Experimentally Induced Apical Periodontitis. *J Endod*, v.40, p. 658–664, 2014.

APÊNDICE 1**FICHA DE INCLUSÃO NA PESQUISA**

CÓDIGO DO PACIENTE:

IDADE:

SINTOMATOLOGIA DOLOROSA: PRESENTE AUSENTEEXPOSIÇÃO PULPAR ACIDENTAL: SIM NÃOHISTÓRIA DE DOR: SIM NÃOCRIPTA: PRESENTE AUSENTELESÃO PERIAPICAL: SIM NÃOPOSSIBILIDADE DE RESTAURAÇÃO: SIM NÃO

INSERÇÃO NO GRUPO:

 GRUPO 1: Dente decíduo sadio SUBGRUPO A1: Reabsorção radicular ausente ou incipiente SUBGRUPO B1: Reabsorção radicular em fase intermediária SUBGRUPO C1: Reabsorção radicular em estágios finais GRUPO 2: Dentes decíduos com polpa viva SUBGRUPO A2: Reabsorção radicular ausente ou incipiente SUBGRUPO B2: Reabsorção radicular em fase intermediária SUBGRUPO C2: Reabsorção radicular em estágios finais GRUPO 3: Dentes decíduos com polpa não-vital SUBGRUPO A: Reabsorção radicular ausente ou incipiente SUBGRUPO B: Reabsorção radicular em fase intermediária SUBGRUPO C: Reabsorção radicular em estágios finais

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência da doença cárie e do seu tratamento na expressão e atividade de enzimas proteolíticas na saliva humana

Pesquisador: Rodrigo Varela de Carvalho

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 74493817.5.0000.5319

Instituição Proponente: Faculdade Meridional - IMED

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.249.269

Apresentação do Projeto:

Influência da doença cárie e do seu tratamento na expressão e atividade de enzimas proteolíticas na saliva humana

A possibilidade de detecção precoce da presença e atividade dessas enzimas nos tecidos dentários, ou mesmo na saliva, pode ajudar no diagnóstico e tratamento precoce da doença cárie. Também, a detecção de produtos com capacidade de inibir a atividade dessas enzimas tem sido considerada uma possível estratégia para o tratamento em estágios iniciais das lesões de cárie.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do presente estudo será avaliar a presença e atividade das MMPs e catepsinas presentes na saliva de pacientes saudáveis e com diferentes graus de sequelas promovidas pela doença cárie. Também, pretende-se acompanhar a expressão e atividade das MMPs e catepsinas após o tratamento das sequelas da doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos desse estudo para o paciente serão mínimos, já que os protocolos propostos no estudo

Endereço: Senador Pinheiro 304

Bairro: centro

CEP: 99.070-220

UF: RS

Município: PASSO FUNDO

Telefone: (54)3045-6100

Fax: (54)3045-6107

E-mail: cep@imed.edu.br

Continuação do Parecer: 2.249.269

são comumente utilizados na odontologia. Não será utilizada nenhuma técnica experimental sem comprovação científica para o tratamento das crianças. Pacientes que sentirem desconforto relacionado ao uso dos agentes para bochecho usados no trabalho (clorexidina e flúor) serão instruídos a abandonar o estudo. O desconforto

nesses casos pode estar relacionado ao gosto do produto, no entanto serão utilizados produtos comerciais aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ainda, se a criança se sentir constrangida por ter que cuspir em um recipiente de plástico, nós a levaremos para o consultório de Triagem, um local reservado, que permite o atendimento de apenas um paciente por vez e que está localizado no terceiro andar da Faculdade de Odontologia – IMED. Se ainda assim a criança se sentir constrangida, interromperemos o processo e ela será instruída a abandonar a pesquisa.

Benefícios:

Este estudo apresenta como benefício direto para os pacientes com doença cárie a possibilidade de tratamento odontológico nas dependências da Faculdade de Odontologia da IMED sem qualquer custo, lembrando que se o Sr.(a) não permitir a participação do seu(ua) filho(a) ou se seu(ua) filho(a), o(a) mesmo(a) será igualmente atendido(a), sem qualquer prejuízo para o plano de tratamento. Aqueles pacientes selecionados, mesmo sem doença cárie, para participar da pesquisa terão como benefício a possibilidade de exame bucal completo de rotina, reforço na educação para higiene oral e acompanhamento profissional durante todo o período de duração do projeto. Ainda, a participação do seu(ua) filho(a) na pesquisa possibilitará um maior entendimento da comunidade odontológica sobre a doença cárie, o que poderá facilitar o diagnóstico e tratamento precoce dessa doença no futuro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A expressão e atividade das MMPs, representada por regiões claras no gel de poliacrilamida, será quantificada a partir do uso do software ImageJ.

Já a expressão das catepsinas será quantificada por absorbância em um leitor de microplacas. Após, os dados serão submetidos a Análise de Variância segundo dois critérios (tipo de tratamento e período de coleta da amostra), seguido pelo teste complementar de Tukey ($p < 0,05$). Para comparações intragrupo (baseline x pós tratamento) cada grupo será comparado com o teste t pareado ($p < 0,05$).

Tamanho da Amostra no Brasil: 90;

Não haverá uso de fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc);

Utilização da saliva para identificar se você tem alto ou baixo risco à doença cárie em as crianças

Endereço: Senador Pinheiro 304

Bairro: centro

CEP: 99.070-220

UF: RS

Município: PASSO FUNDO

Telefone: (54)3045-6100

Fax: (54)3045-6107

E-mail: cep@imed.edu.br

Continuação do Parecer: 2.249.269

que irão participar dessa pesquisa têm de 6 a 12 anos de idade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão devidamente anexados e assinados

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Caro pesquisador, o projeto foi considerado aprovado. Solicitamos, ao final do estudo, anexar na Plataforma Brasil os resultados, bem como eventuais questões éticas. O CEP IMED fica à disposição para esclarecimentos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Caro pesquisador, o projeto foi considerado aprovado. Solicitamos, ao final do estudo, anexar na Plataforma Brasil os resultados, bem como eventuais questões éticas. O CEP IMED fica à disposição para esclarecimentos.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_975584.pdf	24/08/2017 16:58:03		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOCEP.docx	24/08/2017 16:57:17	Rodrigo Varella de Carvalho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ASSENTIMENTO.docx	24/08/2017 15:47:58	Rodrigo Varella de Carvalho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	24/08/2017 15:47:40	Rodrigo Varella de Carvalho	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CONFIDENCIALIDADE.pdf	24/08/2017 15:45:13	Rodrigo Varella de Carvalho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORIZACAOLocal.pdf	24/08/2017 15:44:10	Rodrigo Varella de Carvalho	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	10/08/2017 14:23:24	Rodrigo Varella de Carvalho	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Senador Pinheiro 304

Bairro: centro

CEP: 99.070-220

UF: RS

Município: PASSO FUNDO

Telefone: (54)3045-6100

Fax: (54)3045-6107

E-mail: cep@imed.edu.br

FACULDADE MERIDIONAL -
IMED/RS



Continuação do Parecer: 2.249.269

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PASSO FUNDO, 30 de Agosto de 2017

Assinado por:
DENIZ ANZILIERO
(Coordenador)

Endereço: Senador Pinheiro 304

Bairro: centro

CEP: 99.070-220

UF: RS

Município: PASSO FUNDO

Telefone: (54)3045-6100

Fax: (54)3045-6107

E-mail: cep@imed.edu.br