



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ANA LETÍCIA GARCIA BAPTISTA

**DEGRADAÇÃO DO COLÁGENO DENTINÁRIO POR AÇÃO DE
METALOPROTEINASES E CISTEÍNO CATEPSINAS**

PIRACICABA

2021

ANA LETÍCIA GARCIA BAPTISTA

**DEGRADAÇÃO DO COLÁGENO DEVIDO AÇÃO DAS
METALOPROTEINASES E DAS CISTEÍNAS CATPESINAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Cirurgião Dentista.

Orientador: Profa. Me. Simone Gomes de Oliveira

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO PELA ALUNA ANA LETÍCIA GARCIA BAPTISTA E ORIENTADA PELA PROFA. ME. SIMONE GOMES DE OLIVEIRA.

PIRACICABA

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

B229d Baptista, Ana Letícia Garcia, 1996-
 Degradação do colágeno dentinário por ação de metaloproteinases e cisteíno
 catepsinas / Ana Letícia Garcia Baptista. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2021.

 Orientador: Simone Gomes de Oliveira.
 Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

 1. Colágeno. 2. Degradação. 3. Metaloproteases. 4. Cisteína. 5. Dentina. I.
Oliveira, Simone Gomes de, 1965-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações adicionais, complementares

Palavras-chave em inglês:

Collagen
Degradation
Metalloproteases
Cysteine
Dentin

Área de concentração: Dentística

Titulação: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 15-10-2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus familiares, principalmente meus pais Alessandra Beatriz Garcia Baptista e Luiz Alberto Baptista. Aos meus irmãos, Nicolle, Fernanda, Luiz Guilherme, Victor Hugo, à minha sobrinha Maria Victoria. E todos amigos, colegas e professores que me ajudaram e incentivaram durante esses anos de estudos e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos que durante toda a minha vida estiveram do meu lado me apoiando e orientando nas minhas tomadas de decisões. Agradeço todo o esforço feito ao longo desses anos, sem vocês não teria chegado onde cheguei.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu Diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, pela dedicação ao ambiente que eu pudesse alcançar o título de cirurgiã-dentista. A todos os professores que participaram e forneceram uma base sólida para a minha formação profissional. Aos funcionários da clínica e pré-clínica, e a Heloisa Ceccotti, pela atenção e ajuda na elaboração desse trabalho.

Aos meus amigos Melissa Matsuda, Ana Victória Fernandes, Ana Luísa Riceto, Júlia Ikeda que fazem parte da minha rede de apoio, que mesmo com a distância se fizeram presentes em minha vida todos esses anos. Não poderia deixar de agradecer a todos aqueles que conheci durante a o período de faculdade, principalmente aqueles que fizeram parte da minha turma e se tornaram grandes amigos, pessoas que estavam ao meu lado durante todo esse processo e me ajudaram diversas vezes a continuar trilhando esse caminho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Flavio Aguiar pela responsabilidade e oportunidade de me orientar em minha pesquisa de Iniciação Científica. E à minha orientadora deste trabalho e coorientadora de Iniciação Profa. Dra. Simone Gomes de Oliveira pelo apoio e ensinamentos durante este período.

RESUMO

A diminuição da longevidade e da força de união de restaurações adesivas levantam preocupações acerca da ação de enzimas proteolíticas que degradam o colágeno e afetam a camada híbrida. Este trabalho tem o objetivo de fazer uma revisão de literatura das enzimas metaloproteinases e cisteíno catepsinas e dos métodos utilizados para sua identificação e avaliação da ação dessas enzimas no substrato dentinário. O colágeno é uma das proteínas mais abundantes no corpo humano. Na dentina o principal componente orgânico é o colágeno tipo I. A degradação do colágeno tem sido investigada a partir da ação das metaloproteinases e cisteíno catepsinas, enzimas endógenas, altamente específicas quanto ao substrato que atuam. Elas degradam as fibrilas de colágeno e sua atividade pode ser induzida por alterações de pH. No processo restaurador adesivo a etapa de condicionamento ácido dos tecidos, nos sistemas convencionais, assim como nos sistemas adesivos autocondicionantes podem alterar pH e ativar essas enzimas que degradam as fibrilas de colágeno ligadas aos monômeros, prejudicando a interface adesiva. A compreensão de como ocorre a ação colagenolítica dessas enzimas auxilia no desenvolvimento e uso de inibidores naturais e sintéticos. Para isso, a identificação destas enzimas é realizada por diferentes métodos como a zimografia, a microscopia eletrônica de varredura e a microscopia confocal. Esses métodos permitem avaliações qualitativas e quantitativas. No entanto, apesar de permitirem a obtenção de muitas informações sobre estas enzimas, apresentam limitações que devem ser consideradas na análise dos resultados dos estudos que as utilizam.

Palavras-chave: Colágeno. Degradação. Metaloproteinases. Cisteínas. Dentina.

ABSTRACT

The decrease in longevity and bonding strength of adhesive restorations raise concerns about the action of proteolytic enzymes that degrade collagen and affect the hybrid layer. This work aims to review the literature of the enzymes metalloproteinases and cysteine cathepsins and the methods used for their identification and evaluation of the action of these enzymes on the dentin substrate. Collagen is one of the most abundant proteins in the human body. In dentin the main organic component is collagen type I. Collagen degradation has been investigated from the action of metalloproteinases and cysteine cathepsins, endogenous enzymes, highly specific to the substrate act that act. They degrade collagen fibrils and their activity can be induced by pH changes. In the adhesive restorative process, the tissue acid conditioning step, in conventional systems, as well as in self-etching adhesive systems, can change the pH and activate the enzymes that degrade the collagen fibrils linked to the monomers, harming the adhesive interface. Understanding how the collagenolytic action of these enzymes occurs can contribute to the development and use of natural and synthetic inhibitors. For this, the identification of these enzymes is performed by different methods, such as zymography, scanning electron microscopy, and confocal microscopy. These methods allow qualitative and quantitative evaluations. However, although they allow obtaining a lot of information about these enzymes, each method has limitations that must be considered when analyzing the results of studies that use them.

Keywords: Collagen. Degradation. Metalloproteinases. Cysteines. Dentin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO	11
3 REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 Tecidos dentários mineralizados	12
3.2 Colágeno	16
3.3 Proteases	18
3.4 Metodologias de análise	23
4 DISCUSSÃO	31
5 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35
ANEXO 1 – VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO	40

1 INTRODUÇÃO

O processo restaurador tem por objetivo substituir a estrutura dentária perdida por meio de cárie ou algum trauma, restabelecendo sua forma e função. Alguns fatores podem influenciar na durabilidade das restaurações adesivas como a técnica escolhida, o material utilizado e a degradação da camada híbrida devido à ação de enzimas endógenas.

O processo de adesão no esmalte e dentina se diferencia em alguns aspectos. No esmalte, o condicionamento ácido realiza uma desmineralização parcial e forma microporosidades que serão preenchidas pelos adesivos criando uma retenção estável, e favorecida pela ausência de umidade do substrato. Por outro lado, na dentina vários fatores podem afetar a adesão como a maior quantidade de água, natural deste substrato, a quantidade de colágeno que irá se ligar ao monômero, a profundidade da cavidade, a idade do paciente que, com o envelhecimento, a dentina se torna mais esclerótica, além da presença de enzimas proteolíticas presentes neste substrato (Perdigão, 2010).

O colágeno é uma estrutura importante da dentina, compondo a maior parte da sua matriz orgânica. O principal tipo de colágeno presente nesta matriz é o colágeno tipo I. Essa proteína é formada por três cadeias peptídicas sendo duas alfa-1 e uma alfa-2, enroladas em formato de tripla hélice (Sorusanova et al., 2019). A dentina possui duas enzimas endógenas que estão intimamente relacionadas à degradação do colágeno da camada híbrida e que conseqüentemente, afetam de forma negativa as restaurações adesivas (Tjäderhane et al., 2013).

As metaloproteinases (MMPs) são enzimas zinco dependente de atividade proteolítica, que possuem um papel importante na degradação do colágeno. Elas são secretadas na forma inativa e podem ser ativadas pela mudança de pH. Atualmente são identificados 23 tipos de MMPs nos seres humanos, que são classificadas em seis grupos, entre eles as collagenases e gelatinases. Essas enzimas são capazes de clivar a tripla hélice do colágeno em fragmentos, diminuindo a força de união do sistema adesivo e comprometendo a longevidade das restaurações (Tjäderhane et al., 2013).

As cisteíno catepsinas também são enzimas relacionadas à degradação do colágeno. Elas possuem alto grau de especificidade pelo seu substrato e também

possuem atividade regulada pelo pH (Chwieralski et al., 2006; Mazzoni et al., 2015). A catepsina K possui um papel importante como colagenase, sendo a mais potente encontrada em mamíferos (Sorsa et al., 2004). Sua atividade é observada tanto em dentina hígida quanto na cariada (Perdigão, 2010).

Estudos que estudam o papel das enzimas que degradam o colágeno dentinário utilizam métodos de análise que identificam a presença destas enzimas. Dentre eles, estudos que avaliam a capacidade de ação de agentes que possam atuar inibindo a ação destas enzimas. Dentre eles, a clorexidina (Carrilho et al., 2007; Pashley et al., 2004) e o galardin (Breschi et al., 2010) para as MMPs e o cloreto férrico para as catepsinas (Rodrigues et al., 2017).

Para avaliar a presença dessas enzimas e sua atividade são utilizados métodos como a zimografia, um dos métodos mais frequentemente utilizado para essa finalidade. São também utilizadas a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV ou *Scanning Electron Microscope - SEM*) e a Microscopia Confocal. Todos esses métodos muito contribuem para o conhecimento sobre o estudo da degradação do colágeno na dentina por ação das endopeptidases (MMPs e cisteíno catepsinas). No entanto, cada qual apresenta suas indicações e alcances, fatores a serem considerados na avaliação dos resultados de estudos que os utilizam.

2 PROPOSIÇÃO

O trabalho aqui apresentado visa realizar um levantamento na literatura a fim de reunir informações sobre a degradação do colágeno do substrato dentinário promovido pela ação das enzimas metaloproteinases e cisteínas catepsinas, ressaltando os métodos utilizados para a identificação e a avaliação da ação dessas enzimas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Tecidos dentários mineralizados

Em sua formação e desenvolvimento, o organismo passa por inúmeros processos de diferenciação celular a fim de alcançar uma especialização funcional. Nos tecidos dentários esse processo é denominado odontogênese. Os estágios de formação do dente se dão pelas fases de botão, capuz, campânula, coroa e raiz. Na campânula ocorre a formação de tecidos específicos que constituirão o dente e suas estruturas de suporte e esses processos recebem nomes específicos. A dentinogênese corresponde à formação de dentina, a amelogênese à formação do esmalte, a cementogênese a do cimento e a osteogênese a do osso (Katchburian & Arana, 2017)

3.1.1 Esmalte

O esmalte é um tecido extremamente duro, sendo ele o mais mineralizado do organismo. Isso se deve ao seu alto conteúdo inorgânico que representa 97% da sua composição, ele também é formado por cerca de 1% de material orgânico e 2% de água (Figura 1). Essa característica o faz um tecido extremamente friável. Sua fase mineral é composta por fosfato de cálcio na forma de cristais de hidroxiapatita e sua matriz é constituída basicamente por proteína. Mas, diferente dos outros tecidos não são de natureza colágena. Uma vez mineralizado, o esmalte não é passível de se remodelar devido à sua característica acelular. Seu órgão é formado por várias células, entre elas os ameloblastos que possuem como principal função formar e mineralizar o esmalte. As proteínas da sua matriz são secretadas, degradadas e removidas proteoliticamente pelos ameloblastos. O esmalte formado possui aspecto prismático, composto por bastonetes que se estendem até a porção de encontro entre a dentina e o esmalte, denominada junção amelodentinária, sendo ela uma estrutura muito ondulada que garante a imbricação entre os dois tecidos. Estudos atuais sugerem que o crescimento do cristal do esmalte inicia nas fibras de colágenos mineralizadas da dentina (Fincham et al., 1999; Katchburian and Arana, 2017; Mansoor et al., 2020).

Nesse tecido também foram detectadas a presença e atividade de MMPs e serina proteinase na sua matriz extracelular (Bartlett, 2013; Fincham et al., 1999). De acordo com Lacruz et al. em 2017 várias proteases foram descritas na amelogênese, entre elas as MMP-2, MMP-9, quimiotripsina C e catepsina C. A MMP20 é associada predominantemente ao estágio secretor e a peptidase 4 no estágio de maturação. Segundo esse autor, a MMP 20 é extremamente importante para formação do esmalte e para integridade da junção amelodentinária e possui como substrato principal a amelogenina (Lacruz et al., 2017).

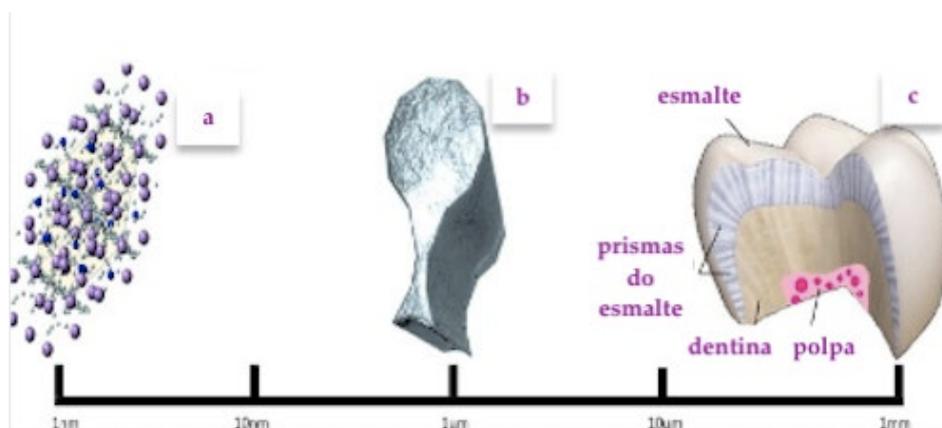


Figura 1- Estrutura hierárquica do esmalte humano
Adaptado de Mansoor et al, 2020

3.1.2 Dentina

A dentina é um tecido mineralizado, avascular, que não apresenta células no seu interior, sendo sua dureza considerada maior que a do osso. Coberta por esmalte em sua porção coronária e por cimento na porção radicular, ela compõe a maior parte da estrutura do dente. Sua composição é constituída em maior parte por mineral, 70% na forma de hidroxiapatita, e o restante, por aproximadamente 18% de material orgânico e 12% de água. No seu interior está localizada a polpa dentária, um tecido não mineralizado composto por células, vasos, nervos, fibras e substâncias intercelulares. A polpa se relaciona intimamente com a dentina, formando o complexo dentina-polpa (Katchburian and Arana, 2017).

A matriz orgânica da dentina é constituída pelas fibrilas colágenas e pela substância fundamental interfibrilar. O principal colágeno encontrado na dentina é o do tipo I, que representa 85% da matriz. E, em seguida, os colágenos tipo III e V, que equivalem a 5% da matriz. Os componentes não colágenos correspondem a 10% da matriz dentinária. Entre eles estão a sialoproteína dentinária e proteínas da matriz dentinária 1, 2 e 3 (DMP 1, DMP 2 e DMP 3). Recentemente estudos mostraram presença de algumas MMPs na matriz mineralizada da dentina. (Katchburian and Arana, 2017; Märten et al., 2010; Orsini et al., 2012).

A estrutura dentinária é formada por inúmeros canais microscópicos denominados túbulos dentinários (TDs), que são rodeados por uma parede de dentina peritubular. No interior dos TDs se localizam os prolongamentos dos odontoblastos, que se estendem da polpa à junção amelodentinária. Os TDs nem sempre vão possuir o prolongamento odontoblástico por toda sua extensão, podendo ser ocupados apenas por um líquido tissular, o fluido dentinário. Devido a essa estrutura tubular, o tecido dentinário é resiliente e amortece as forças da mastigação reduzindo a possibilidade de fraturas no esmalte. Há ainda na dentina, túbulos de menor calibre que comunicam os TDs. Estes são denominados canalículos dentinários. A quantidade de túbulos por mm^2 (densidade de túbulos) pode variar entre os dentes, com cerca de 15.500 túbulos / mm^2 nos incisivos a 20.100 túbulos / mm^2 nos molares e, também quanto à região e tipo da dentina ou ainda, de acordo com a idade do paciente (Figura 2) (Dai et al., 1991; Perdigão, 2010; Williams et al., 2015).

Gerada a partir de odontoblastos em diferenciação, a primeira camada de matriz de dentina formada é chamada de dentina do manto. Ela, por sua vez, não possui dentina peritubular. Os prolongamentos dos odontoblastos nesse caso são circundados por uma matriz calcificada. Os túbulos dentinários vão se ramificando devido a ramificação dos prolongamentos dos odontoblastos durante a formação desse manto. Nessa região de limite com o esmalte estão localizados túbulos com terminações em “delta”. Além disso, os túbulos são mais próximos entre si na região de pré-dentina, já que possui uma superfície menor que na região da junção amelodentinária, se abrindo em formato de leque no sentido da junção (Kwansirikul et al., 2020; Tjäderhane et al., 2012). Como a dentina é formada de maneira contínua durante toda a vida, com o avanço da idade os túbulos diminuem de diâmetro e podem

obliterar totalmente quando o indivíduo tem 50 anos ou mais, devido a deposição de dentina peritubular (Bajaj et al., 2006). Nesta situação ela é chamada de dentina esclerótica (Tjäderhane et al., 2012) e, de acordo com a idade do paciente, a luz dos TDs pode variar entre 4.9 μm , em pacientes entre 16 e 30 anos, a 2.9 μm , em pacientes entre 51 e 75 anos (Thaler et al., 2008) (Figura 3).

A dentina intertubular representa o maior volume do tecido e se localiza entre as colunas da peritubular. A intertubular possui sua matriz orgânica constituída principalmente por fibrilas de colágeno e é menos mineralizada quando comparada à peritubular. A dentina primária é gerada até o fechamento do ápice radicular e depois de completado, a dentina depositada é denominada de dentina secundária. Alguns fatores como cárie e procedimentos restauradores podem gerar outra dentina nomeada de terciária do tipo reacional, na tentativa de formar uma barreira e se afastar da agressão. Essa é irregular e não possui estrutura tubular ordenada (Tjäderhane et al., 2012).

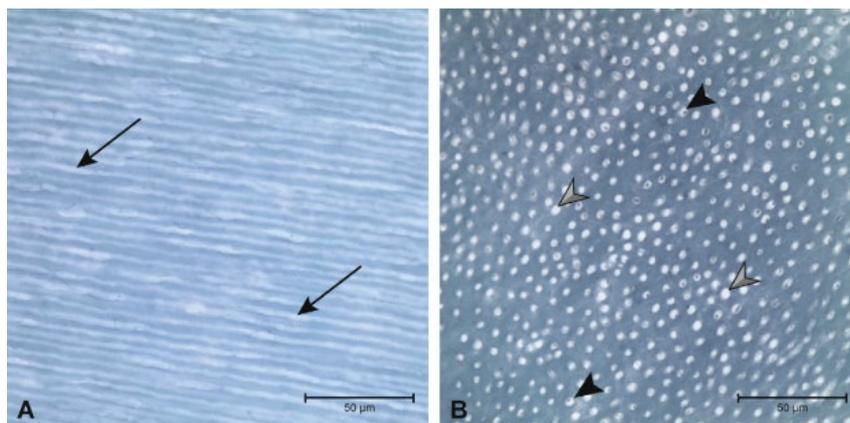


Figura 2 - Túbulos dentinários. Fotomicrografias de dentina humana: (A) secção longitudinal em que as setas apontam para túbulos dentinários, que se apresentam como estruturas lineares brancas. Em (B) as setas pretas apontam para as extensões citoplasmáticas dos túbulos dentinários e as setas claras apontam para túbulos dentinários vazios.

Adaptado de Williams et al., 2015.

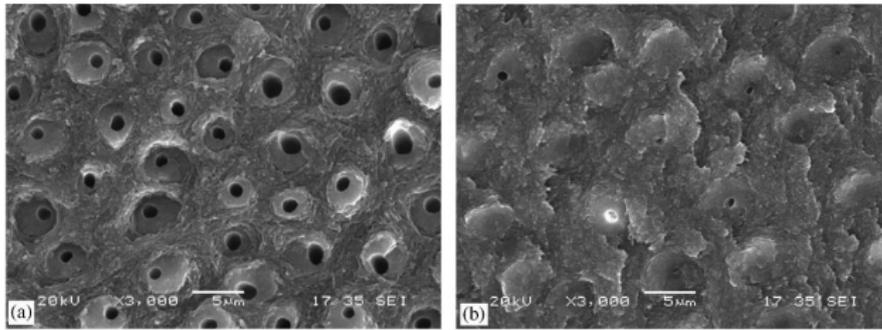


Figure 3 - Mudança da superfície dentinária devido ao envelhecimento. Micrografias da superfície dentinária: (a) dentina de paciente do sexo feminino de 20 anos e (b) paciente do sexo masculino com 50 anos de idade em que a maioria dos túbulos está ocluída.

Adaptado de Bajaj et al., 2006.

3.2 Colágeno

A parte orgânica da dentina, apesar de outros tipos de colágenos serem identificados, é composta quase que exclusivamente pelo tipo I, representando cerca de 90%. O colágeno é uma escleroproteína, uma proteína longa e filamentosa, e que se apresenta na estrutura terciária ou quaternária. É constituída por aminoácidos, sendo 33,5% de glicina, 12% de prolina, 10% hidroxiprolina e o restante é formado por vários outros aminoácidos. O colágeno é a proteína mais abundante no corpo humano, representando cerca de 30% do total das proteínas que formam o corpo humano, sendo encontrada principalmente no tecido conjuntivo. Nos vertebrados foram identificados 28 tipos de colágenos constituídos por cerca de 46 cadeias polipeptídicas distintas. As fibrilas de colágenos são constituídas por uma unidade protéica que se polimeriza chamada tropocolágeno, o que dá a elas uma estriação transversal atípica devido seu arranjo molecular. Essa molécula é composta por três cadeias peptídicas enroladas em hélice, O colágeno tipo I é formado por duas cadeias iguais entre si (alfa-1) e uma cadeia diferente (alfa-2), sendo a diferença entre elas devido a sequência dos aminoácidos. Cada cadeia conta com 1050 aminoácidos enrolados entre si e as propriedades de cada tipo de colágeno são devidas aos segmentos que interrompem essa tripla hélice e formam outro tipo de estrutura tridimensional. Essa tripla hélice é formada por três aminoácidos, sendo eles glicina,

prolina e hidroxiprolina formando Gly-Pro-X onde X pode significar qualquer aminoácido, tendo cada um deles uma função precisa. As ligações de hidrogênio ajudam a manter as três cadeias juntas, unindo a ligação peptídica NH de um resíduo de glicina com um grupo carbonil peptídeo em um polipeptídeo adjacente (Ricard-Blum, 2011; Shoulders and Raines, 2009; Sorushanova et al., 2019).

O formato de tripla hélice se dá pelo ângulo fixo da ligação C – N peptidil-prolina ou peptidil-hidroxiprolina fazendo com que se dobrem. Essas três cadeias se torcem dando o seu formato geométrico. As moléculas de colágenos se aproximam lado a lado e formam fibrilas de 50 a 200 nm. As fibrilas de colágeno do tipo I são bastante resistentes à tração e podem ser alongadas sem quebrar, quando agrupadas lado a lado em feixes paralelos, passando a se chamar de fibras de colágeno. As cadeias de colágenos são sintetizadas na forma de precursores chamados de pró-colágeno, e assim, as cadeias de peptídeos são transportadas para o lúmen do retículo endoplasmático rugoso e nesse momento elas sofrem várias outras reações de processamento. A glicosilação do procolágeno ocorre no retículo endoplasmático rugoso e no complexo de golgi, os restos da galactose e da glicose desta etapa são adicionadas aos restos de hidroxilisina. Oligossacarídeos formados são adicionados em alguns restos de asparagina no propeptídeo C-terminal, parte de um terminal C de uma molécula de procolágeno que está ausente do colágeno maduro. Da mesma forma, a porção do N-terminal também possui um propeptídeo. Em seguida, as três cadeias são alinhadas pelas ligações de dissulfeto intracadeia entre os propeptídeo N- e C- terminais e a forma de hélice tripla é dada pelo fechamento do terminal C ao N. Esse procolágeno tipo I é então secretado para o espaço extracelular e durante ou após a exocitose, as peptidases de procolágeno removem os propeptídeos N- terminal e C- terminal, formando o tropocolágeno (Bertassoni, 2017; Sorushanova et al., 2019) (Figura 4).

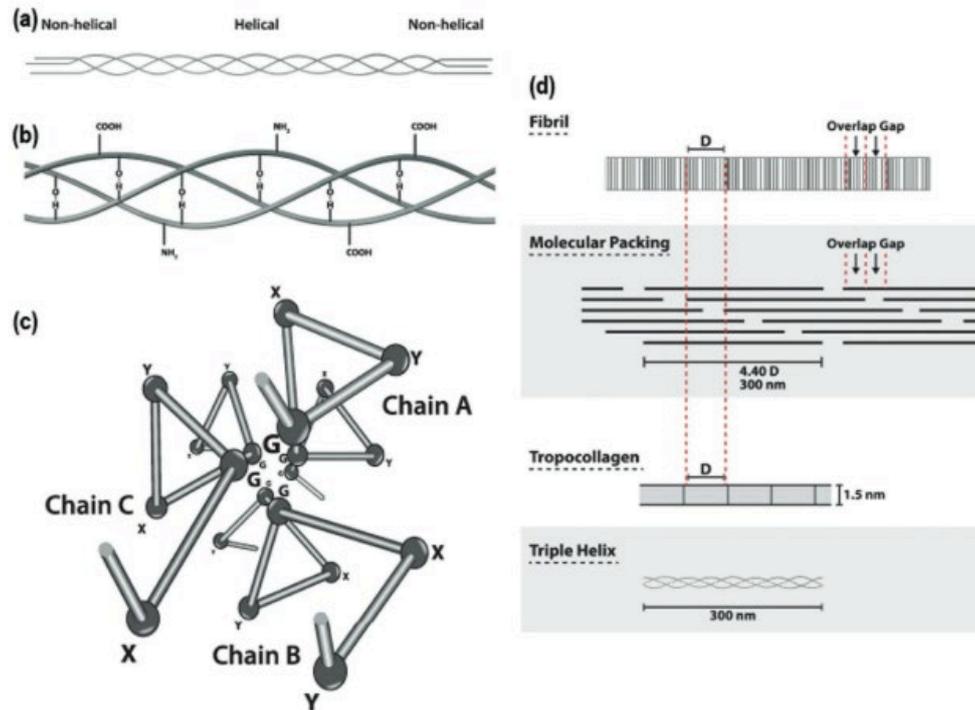


Figura 4 - Estrutura do colágeno; a) A estrutura do colágeno em tripla hélice; b) Ligações de hidrogênio dentro da tripla hélice do colágeno. c) Corte transversal da tripla hélice de colágeno. d) Representação esquemática do arranjo das moléculas de colágeno dentro das fibrilas.

Adaptado de Sorushanova et al, 2019

3.3 Proteases

Dentro dos estudos sobre colágeno, uma muito investigada é a degradação devido a ação de enzimas proteolíticas (Mazzoni et al., 2015) (Perdigão, 2010). Enzimas são catalisadores das reações que ocorrem nos sistemas biológicos, elas possuem alto grau de especificidade por seu substrato, aceleram reações químicas específicas e sua atividade é afetada pelo valor do pH (Kraur, 1988).

As proteases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas e são classificadas de acordo com sua especificidade, homologia e tipo catalítico. O local de sua atividade as classifica em endo e exopeptidases. Elas podem agir em peptídeos e proteínas de qualquer tamanho, diferentemente das oligopeptidases que atacam apenas pequenos peptídeos (Chwieralski et al., 2006).

3.3.1 Matriz metaloproteinases

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são um grupo de enzimas zinco dependentes que possuem atividade proteolítica, ou seja, quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. Elas apresentam um papel importante na remodelação da matriz extracelular e membranas basais. Além disso, elas possuem um papel importante na conversão de proteínas da matriz não colágena, em moléculas sinalizadoras que afetam a diferenciação celular (Laronha and Caldeira, 2020; Tjäderhane et al., 2013). As MMPs podem estar envolvidas em processos da fisiologia. Mas, também estão relacionadas à várias doenças como câncer, distúrbios neurológicos e doenças cardiovasculares (Raeeszadeh-Sarmazdeh et al., 2020). humanos já foram identificados 23 tipos de MMPs, que são divididas em seis grupos, sendo eles as collagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, metaloproteinases do tipo membrana (MT-MMPs) e outras metaloproteinases de acordo com a especificidade e homologia do substrato (Laronha and Caldeira, 2020; Raeeszadeh-Sarmazdeh et al., 2020).

No entanto, essas classificações não refletem a complexidade desse grupo, já que maior parte das MMPs são capazes de degradar vários substratos com especificidade variável. A exemplo disso, as collagenases (MMP-1 e MMP-3) conseguem degradar gelatina de forma lenta e enquanto, as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) degradam principalmente o colágeno tipo IV, mas também outros colágenos. Algumas dessas MMPs possuem um grande valor para área de odontologia por estarem ligadas aos processos de mineralização dentinária, erupção dental e remodelação do colágeno nos tecidos periodontais, entre outros (Perdigão, 2010; Raeeszadeh-Sarmazdeh et al., 2020).

O primeiro relato da degradação do colágeno dentinário ocorreu no início dos anos oitenta (Dayan et al., 1983) e após aproximadamente vinte anos, foi relatado o envolvimento das MMPs nesta atividade (Tjäderhane et al., 1998). Desde então inúmeros estudos tem demonstrado a presença de MMPs como, gelatinases (MMP-2 e MMP-9), collagenases (MMP-8), e MMP-20 no substrato dentinário (Mazzoni et al., 2015).

As MMPs são secretadas como pró- enzimas na forma inativa que são nomeadas de zimogênios, elas são ativadas quando uma parte, denominada

propeptídeo, é segmentada e sua atividade pode ser modulada por inibidores teciduais endógenos (Laronha and Caldeira, 2020; Tjäderhane et al., 2013). Nesse estado latente, as cisteínas não pareadas no pró-domínio produzem uma ponte com o zinco catalítico fazendo um mecanismo de "troca de cisteína" e a cisteína age como um ligante para o zinco, excluindo a molécula de água e torna a enzima inativa. Quando essa ligação é interrompida pela ação proteolítica por outras enzimas como as MMPs e as cisteínas catepsinas ou quimicamente pela ação de um ácido, essas MMPs se tornam ativas (Tjäderhane et al., 2013). A atividade das MMPs no substrato da matriz extracelular pode ser regulada por quatro fatores: por regulação na transcrição nos genes das MMPs; por ativação de precursores; por diferenças de especificidade de substrato; e por inibidores de MMPs (Checchi et al., 2020; Laronha and Caldeira, 2020) (Figura 5).

As collagenases MMP -1, -8, -13, a gelatinase MMP-2 e a tipo de membrana MMP -14 conseguem clivar a tripla hélice dos colágenos tipo I, II e III em fragmentos. Esses fragmentos desnaturam na temperatura corporal e depois são degradados por gelatinases ou outras proteinases. O colágeno intersticial, que é formado por três cadeias alfas em uma estrutura helicoidal tripla produz fibrilas de colágeno resistentes à maioria das proteases de vertebrados mas, incapazes de resistir à ação das (Mazzoni et al., 2015; Perdigão, 2010; Raeaszadeh-Sarmazdeh et al., 2020).

Há duas formas das MMPs degradarem as fibrilas de colágeno. Pela ação da MMP-1 modificada, em que essa enzima pode desenrolar fibrilas de colágeno para depois as enzimas do sítio ativo clivar as cadeias individuais e essas fibrilas podem ser então clivadas pela MMP-3 e por elastases neutrofilicas, que geralmente não atuam dessa maneira. Essa explicação pode ser parcialmente contestada, uma vez que a região onde o colágeno é clivado está protegida pelo colágeno C-telopeptídeo, impedindo a chegada das metaloproteinases nessas regiões. Para isso, o local deve ser exposto, com a remoção dessa proteção, para que as MMPs possam chegar, desenrolar e clivar as fibrilas de colágeno. Essa é uma hipótese muito interessante, considerando que a exposição e a desmineralização da matriz de colágeno (que podem expor o local para a clivagem) pode ocorrer devido a ação da cárie, do ácido fosfórico ou por monômeros. Além disso, a MMP-9 que está presente na dentina pode ser ativada pela alteração do pH. É sugerido que ela tenha um papel importante na

degradação da matriz dentinária na cárie. As cisteínas catepsinas também podem estar envolvidas, já que podem ativar as MMPs. É suposto que esse mecanismo esteja envolvido na lesão de cárie dentinária. As MMP-9 também podem clivar o C-telo-peptídeo e expor o local de clivagem das collagenases após ativação pelos ácidos (Sorsa et al., 2004).

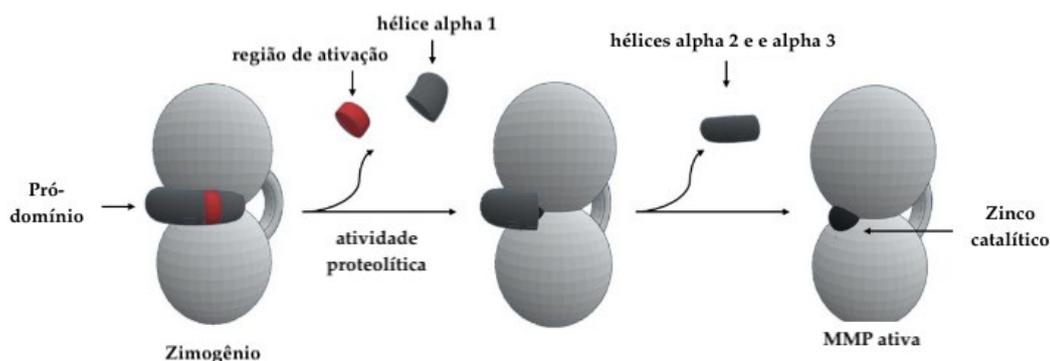


Figura 5 - Esquema do mecanismo de ativação das Metaloproteínases
Adaptado de Laronha, H., Caldeira, J., 2020.

3.3.2 Cisteíno Catepsina

As catepsinas são enzimas do tipo proteases ou peptidases por clivarem, por hidrólise, as ligações entre as sequências de aminoácidos das proteínas. As catepsinas foram inicialmente identificadas em lisossomos. Seu pH ideal para atividade é ligeiramente ácido, compatível com o ambiente do lisossoma. São classificadas de acordo com o aminoácido presente em seu sítio catalítico, local responsável pela ação da enzima. O aminoácido pode ser uma serina (Ser), treonina (Thr), cisteína (Cys), aspartato (Asp), glutamato (Glu) ou o zinco nas MMPs (Siklos et al., 2015). De acordo com a localização do sítio de ativação as proteases podem ser classificadas em exopeptidases, quando agem próximo à região terminal da cadeia polipeptídica, ou em endopeptidases, quando clivam regiões internas da cadeia polipeptídica (Chwieralski et al., 2006).

Essas enzimas eram conhecidas como caspases por apresentarem seu sítio ativo um resíduo de cisteína precedido de ácido aspártico (cysteine-aspartic-acid-proteases). Elas fazem assim, parte da família das cisteínas (Chwieralski et al., 2006). Em 1929 o termo catepsina foi introduzido e significa “enzima proteolítica lisossomal”, independente da classe da enzima (Willstätter and Bamann, 1929) (Figura 6).

As catepsinas pertencem ao grupo CA das cisteínas, são membros da família C1 de enzimas parecidas com as papaínas (proteína presente no mamão que contém enzimas proteolítica). As catepsinas B, H, L, C, X, F, O e V são expressas em todos tecidos humanos, enquanto as K, W e S são encontradas em tecidos específicos. Essas enzimas são sintetizadas na forma de zimogênios inativos, transportados para endossomos através de um receptor e ativadas pela mudança de pH do meio ou por outras proteases. As cisteínas são estáveis em pH moderadamente baixo (ácido) e instáveis em pH neutro e podem ser inativadas irreversivelmente neste meio, com exceção da catepsina S que se torna estável em pH neutro ou levemente alcalino. De acordo com estudos recentes, o complexo dentino-pulpar possui sequências de DNA codificantes da maior parte das catepsinas, sugerindo que há grande variedade dessas proteases em seus tecidos. A atividade das cisteínas foram identificadas tanto na dentina intacta quanto na dentina cariada e a catepsina B foi encontrada nos túbulos dentinários. Quando secretadas, essas proteases podem atingir com facilidade os túbulos dentinários e adentrarem na dentina. No tecido cariado da dentina foi identificado uma alteração da atividade enzimática, havendo um aumento significativo com aumento da profundidade se aproximando da polpa. Isso sugere que as cisteínas, geradas pelos odontoblastos ou pela polpa, podem ter papel fundamental nas lesões de cárie ativa. Em razão dos processos restauradores em sua maioria serem realizados em dentes com lesão de cárie com algum grau de inflamação pulpar, é possível que as cisteínas estejam presentes também nos túbulos dentinários sob a restauração (Sorsa et al., 2004).

Além disso, as catepsinas que possuem alta atividade colagenolítica são responsáveis pela remodelação da matriz extracelular, que é composta principalmente por colágeno e proteoglicanos, que foram identificados como substrato dessas enzimas. A gelatina da matriz pode ser clivada por várias catepsinas. As catepsinas B e L clivam extensões de colágenos no telopeptídeo não helicoidal enquanto que, a

catepsina K é a única que consegue clivar o colágeno na região helicoidal tripla. As catepsinas L e S liberam glicosaminoglicano (GAG). Por sua vez, os proteoglicanos (PGs) produzem ligações interfibrilares que absorvem água com GAGs de cargas negativas ao lado das cadeias de matriz de colágeno e os GAGs executam um papel importante na formação de complexos entre as cisteínas e seus substratos (Sorsa et al., 2004).

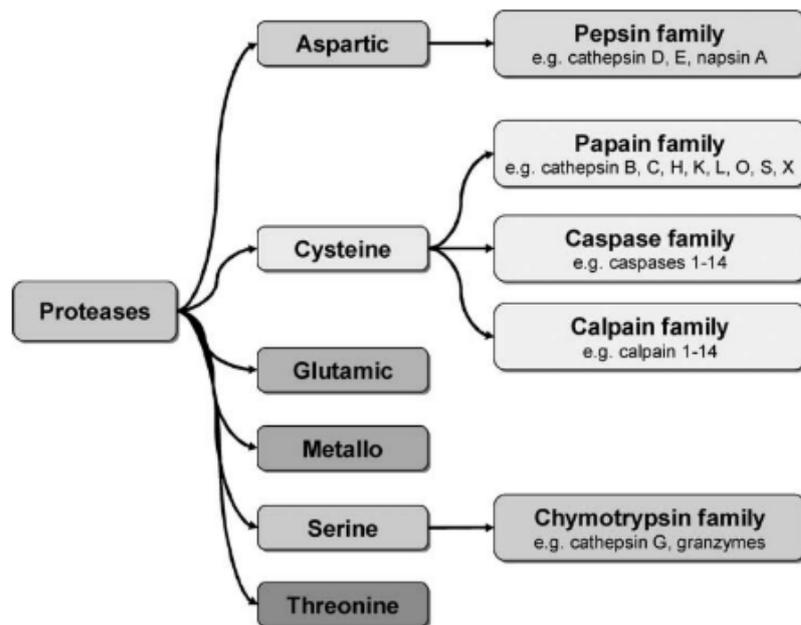


Figura 6 - Classificação das catepsinas

Adaptado de Chwieralski et al., 2006

3.4 Metodologias de análise

O estudo da ação de degradação no colágeno dentinário não é recente. Podemos encontrar estudos como o de Dayan e colaboradores (1983) que investigaram a ação colagenolítica em tecido cariado da dentina utilizando métodos em um período em que não era possível ainda identificar qual tipo de endopeptidase estaria atuando (Dayan et al., 1983). Nos últimos anos podemos observar que os estudos que investigam a ação das endopeptases (MMPs e cisteíno catepsinas) são preferencialmente realizados por técnicas que utilizam as características estruturais das enzimas, como a zimografia, ou por sua identificação visual, utilizando a microscopia eletrônica de varredura ou a microscopia confocal. De um modo geral,

estas metodologias permitem avaliar a ação das MMPs e cisteíno catepsinas pela sua presença, localização e distribuição no substrato dentinário.

3.4.1 Zimografia

Existem vários métodos para identificar e detectar atividade das enzimas proteolíticas, sendo a zimografia o método mais utilizado. Sua simplicidade, sensibilidade e capacidade de identificar formas ativas e latentes contribui para seu frequente uso. Isso é possível devido à diferença do peso molecular entre as formas ativas e latentes. Ela é uma técnica quali-quantitativa. A quantificação das endopeptidases é feita pela análise da densidade da coloração final das regiões correspondentes a cada enzima. A zimografia é feita através da eletroforese em gel de poliacrilamina sodium dodecyl sulfate poly- acrylamide gel electrophoresis (sodium dodecyl sulfate poly- acrylamide gel electrophoresis (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis - SDS-PAGE). A zimografia ser utilizada tanto para proteínas, como as endopeptidases, como para oligossacarídeos, lipídios, polissacarídeo e ácidos nucleicos (Wilkesman and Kurz, 2017).

Os métodos de zimografia podem ser classificados com o tipo de enzima que são capazes de detectar. Mas podem também ser classificadas em função do substrato a ser utilizado, sendo assim classificados em zimografia em gel (*in gel* zymography - IGZ), zimografia *in situ* (*in situ* zymography - ISZ) e zimografia em *in vivo* (*in vivo* zymography – IVZ) (Wilkesman and Kurz, 2017). A ISZ pode gerar dados quanto à localização das endopeptidases ativas nas amostras de tecidos frescos ou congelados. Sua vantagem em relação à outras formas de zimografia é a visualização das enzimas em seus contextos biológicos. A IVZ emprega sondas fluorogênicas, ativadas por proteases. Isso permite detectar simultaneamente várias enzimas, o que possibilitou o mapeamento de padrões de atividade de MMPs. Na IGZ é preciso a copolimerização do substrato com a acrilamida no gel de SDS-PAG. Em seguida, o gel é incubado em condições que permite a ação das endopeptidases, degradando enzimaticamente o substrato. As regiões em que ocorre a ação proteolítica fica detectável pela coloração. Na IGZ, é possível separar as enzimas segundo seu peso molecular e podem ainda ser detectadas de acordo com sua capacidade de degradação do substrato. As gelatinases MMP-2 e MMP-9 são frequentemente

estudadas por este tipo de zimografia (Vandooren et al., 2013; Wilkesman and Kurz, 2017).

Alguns estudos como o de Cunha e colaboradores (2020) utilizam mais de uma técnica de zimografia. Neste caso o objetivo foi avaliar os efeitos da radioterapia na atividade das endopeptidases dentinárias pelo estudo de IGZ e IVZ. Na IGZ a análise foi realizada pela densitometria das bandas obtidas pelo gel de eletroforese (Figura 7). Enquanto que a IVZ foi avaliada pela microscopia confocal a laser (Cunha et al., 2020).

A zimografia tem como limitação a sobreposição significativa de pesos moleculares, o que dificulta diferenciar com exatidão as bandas correspondentes às proteases. Outra limitação é que o processo de desnaturação parcial por SDS e eletroforese podem gerar uma modificação na conformação ativa da protease, tornando proteínas inativas em ativas. Para determinar a identidade e presença de uma protease de interesse, podem ser usados ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) ou Western Blots (Deshmukh et al., 2019).

Há ainda outras técnicas, como as bioquímicas, de imunohistoquímicas (Mazzoni et al., 2018b), de imunoabsorção enzimática (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA) ou Western Blot (Deshmukh et al., 2019), que se utilizam da estrutura das endopeptidases para identificar sua presença no substrato.

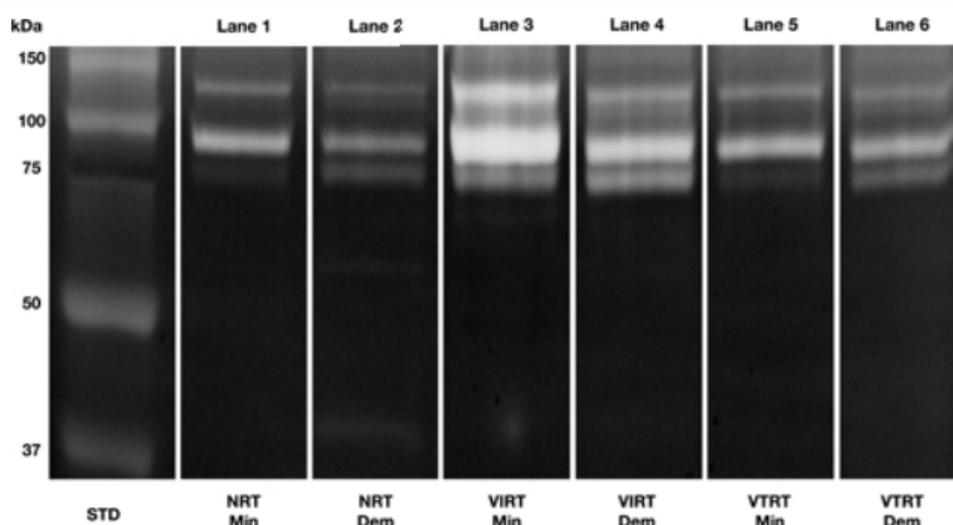


Figura 7 - Zimografia em gel de dentina irradiada e não irradiada. Cada coluna (Lane) corresponde a uma condição a ser comparada a primeira, que é o padrão, com os pesos moleculares previamente conhecidos. Lane 1: dentina mineralizada não irradiada. Lane 2: Dentina desmineralizada não irradiada. Lane 3: dentina mineralizada irradiado *in vivo*. Linha 4: dentina desmineralizada irradiada *in vivo*. Lane 5: dentina mineralizada irradiada *in vitro*. Lane 6: Dentina desmineralizada irradiada *in vitro*.

Adaptado de Cunha et al., 2020.

3.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) ou *Scanning Electron Microscope* (SEM) utiliza feixe de elétrons para escanear a superfície de uma amostra. A interação entre os elétrons e a amostra gera sinais da topografia que são capturados para formar as imagens. A resolução das imagens obtidas pode alcançar até um nanômetro e o contraste das imagens é obtido pelo relevo da amostra. Esta técnica não é capaz de identificar diretamente as endopeptidases. As imagens obtidas pelo MEV podem, no entanto, apresentar características que sugerem a ação colagenolítica dessas enzimas. É uma técnica muito utilizada na odontologia, sendo capaz de gerar imagens tridimensionais. Essa técnica pode utilizar a emissão de elétrons secundários, que são elétrons de baixa energia ou a emissão de elétrons retroespalhados, com mais energia que os secundários. As imagens obtidas com os

elétrons retroespalhados são de menor profundidade mas, com maior contraste, de acordo com o número atômico dos elementos presentes na amostra. Quanto maior o número atômico, maior será o contraste. Os equipamentos que realizam a MEV podem ser classificados de acordo com a pressão em alto vácuo ou baixo vácuo. A quantidade de pressão promovida nestes casos determinará o tipo de amostra a ser utilizada. Aqueles de baixo vácuo, permitem que amostras não condutivas sejam analisadas sem o uso de revestimento de uma superfície condutiva, como o recobrimento com ouro. A performance de um equipamento de MEV não deve ser avaliada pela sua resolução. A resolução espacial, por sua vez, é determinada pela geração do volume de sinal, que está associado ao volume de interação do elétron com a superfície (sólido) e o sinal utilizado. Suas limitações são a análise individual de cada amostra e exigir que as estas sejam desidratadas antes de observadas. Ainda assim, é a MEV capaz de permitir gerar uma ampla diversidade de informações, requisitar preparos simples das amostras e obter imagens com profundidade em alta resolução (Xing, 2016).

Estudos que estudam a ação de MMPs e cisteíno catepsinas comumente investigam o efeitos de condições experimentais ou agentes na superfície dentinária como o estudo de Fu e colaboradores (2020) que avaliaram o efeito que adesivos universal modificados por riboflavina, fotoativada com luz azul promovia na resistência à degradação colagenolítica ao longo do tempo. Eles verificaram a diferença entre o grupo controle e os grupos experimentais com riboflavina, que apresentaram uma camada híbrida mais espessa, com tags resinosos mais longos e bem formados. Enquanto que os demais grupos apresentaram camada híbrida fina e tags mais curtos (Fu et al., 2020) (Figura 8).

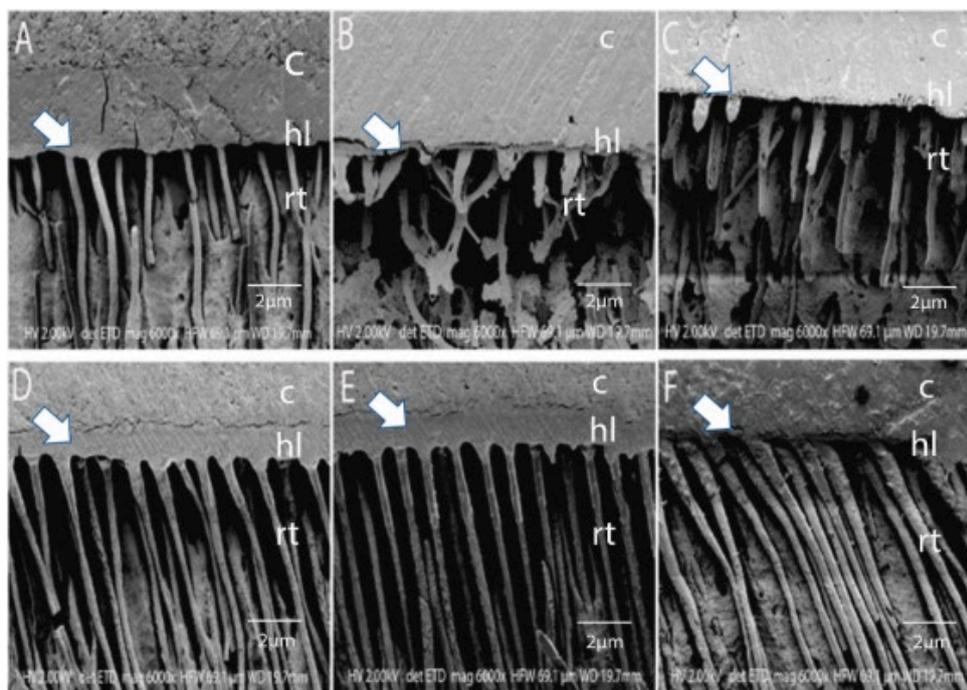


Figura 8 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). MEV de interface resina-dentina referente a estudo de adesivo experimental, ressaltando as características estruturais dos tecidos e da camada híbrida associadas à ação das endopeptidases. As imagens correspondem a grupos controle e experimentais. Em (A, B e C) a camada híbrida é mais fina com tags resinosos mais curtos, diferentemente de (D, E e F) que apresentam uma camada híbrida mais espessa e tags resinosos mais longos. Seta branca apontando para camada híbrida. c: resina composta; hl: camada híbrida; rt: tags resinosos.

Adapado de Fu et al., 2020.

3.4.3 Microscopia Confocal

A microscopia confocal (MC) tem como princípio produzir a partir de uma fonte de luz pontual e a rejeitar a luz fora de foco, de modo a não desfocar as imagens que estão sendo coletadas, produzir imagens com alta resolução em regiões profundas do tecido. A obtenção das imagens em diferentes profundidades possibilita a geração de imagens 3D. Isso é possível porque tanto a iluminação, quanto a detecção das imagens estão no mesmo ponto. Pouco ou quase nada do que está além da região de foco contribui para a formação da imagem. A obtenção das imagens pode ser feita pela movimentação da amostra, isto é, pela movimentação do estágio do microscópio, ou pela movimentação do feixe de luz. Isso requer uma elevada

precisão mecânica, o que está intimamente relacionado à qualidade da imagem obtida. A obtenção das imagens é caracteristicamente lenta, quando comparada aos demais tipos de microscopia por varredura. Os principais tipos de microscópios confocais são que fazem a captura da imagem por um sistema de escaneamento por feixe de laser (Laser Scanning Confocal Microscopes – LSCM), por um único ponto ou por vários pontos de luz (Spinning Disk Confocal Microscopes) ou por escaneamento híbrido em que ao invés de usar um único ponto ou vários pontos, utilizam uma fenda retangular. Isso diminui o tempo de captura da imagem (Elliott, 2020). No entanto, diminui a resolução da imagem e aumenta o seu branqueamento (Sheppard and Mao, 2007).

De um modo geral, os avanços nos microscópios confocais visam melhorar a qualidade das imagens obtidas, o tipo e forma de emissão das luzes. A aplicação da MC permite análises tridimensionais (3D) quanto às mensurações, localização e extensão ou ainda considerando o tempo (4D) e para vários conjuntos de dados (5D). Pode analisar amostras frescas ou fixadas. A escolha do microscópio depende de aspectos como a velocidade, a resolução e campo de visão da imagem (Elliott, 2020).

Assim como a MEV a utilização da MC em estudos da ação das endoproteases é associado a outras técnicas, como a zimografia. Em uma busca no banco de dados PubMed, podem ser observados que é uma técnica utilizada em número menor de estudos do que a MEV (Tabela 1). Foram encontrados 14 estudos no período entre 2012 e 2021, sendo que 8 estudos foram publicados nos últimos 5 anos. Estudos como o de Hass e colaboradores (2016) utilizam a MC como metodologia complementar à investigação da presença das endopeptidases (Hass et al., 2016) (Figura 9).

As limitações que a MC pode apresentar pode estar associada ao número limitado de comprimento de onda de excitação disponíveis para os sistemas de iluminação, como para os microscópios que utilizam o laser, que também pode causar danos fotoquímicos nos marcadores fluorescentes. Isso acelera seu decaimento devido à intensidade da emissão de laser. Uma desvantagem da MC é o elevado custo e manutenção do equipamento, principalmente para laboratórios de pequeno porte (Corrêa et al., 2014).

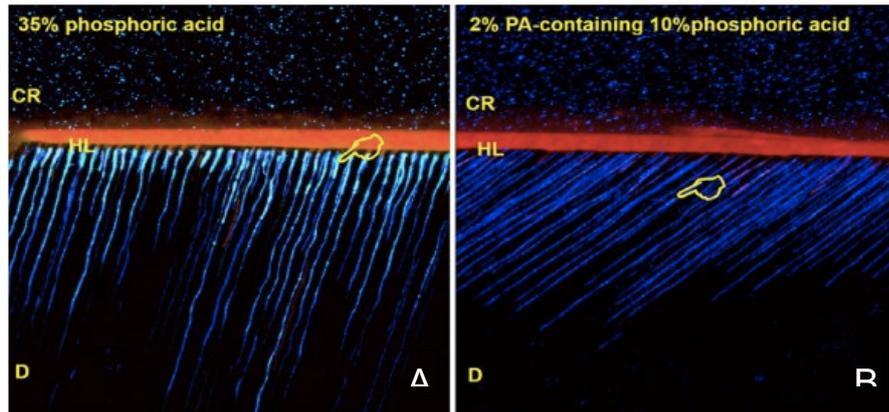


Figura 9 - Microscopia Confocal da superfície dentinária. Em (A) - grupo controle - a superfície foi tratada com 35% de ácido fosfórico, apresentando maior atividade de MMPs, com maior intensidade da cor (ciano), em comparação a (B). Em (B) - grupo experimental - a superfície foi tratada com 10% de ácido fosfórico e 2% de PA, que quase eliminou a ação das MMPs, pela quase ausência da cor ciano. As mãos em amarelo indicam a camada híbrida, abaixo das regiões de interesse (MMPs). camada híbrida. CR, resina composta; HL, camada híbrida; D, dentina.

Adaptado de Hass, V., Luque-Martinez, I., Muñoz, M. A., et al, 2016.

4 DISCUSSÃO

A estrutura, composição e fisiologia da dentina fazem deste substrato um ambiente complexo e naturalmente sujeito à ação de enzimas colagenolíticas. A especificidade ao substrato e a interrelação que MMPs e cisteíno catepsinas possuem torna ainda maior o desafio da manutenção da integridade a longo prazo das fibras colágenas e, conseqüentemente o sucesso das restaurações adesivas.

As últimas décadas são marcadas por grandes transformações tecnológicas que permitiram o desenvolvimento de técnicas e métodos de análise mais potentes (Deshmukh et al., 2019; Elliott, 2020; Wilkesman and Kurz, 2017; Xing, 2016), possibilitando ampliar o conhecimento de estruturas e componentes do tecido dentinário e o desenvolvimento de agentes que tenham a capacidade de impedir ou minimizar a ação das MMPs e cisteíno catepsinas (Carrilho et al., 2007; Pashley et al., 2004; Raeeszadeh-Sarmazdeh et al., 2020; Rodrigues et al., 2017; Siklos et al., 2015).

Ao longo deste mesmo período, os sistemas adesivos também se aprimoraram para oferecer melhores qualidade estética e propriedades mecânicas. Nos sistemas convencionais são utilizadas soluções ácidas com a aplicação de ácido fosfórico em esmalte e dentina ou apenas em esmalte na concentração de 30 a 40%. Esse condicionamento cria microporosidades e possibilita a penetração do adesivo na porosidade do esmalte, criando uma resistência. No entanto, na dentina, o ácido desmineraliza sua superfície removendo a *smear layer* e expondo as fibras de colágeno. Esta camada superficial desmineralizada posteriormente deve ser infiltrada por monômeros resinoso e após polimerizada formará a camada híbrida (Van Meerbeek et al., 2020). Porém, nesse método podem haver falhas na adesão devido a diferença entre a área desmineralizada e a área em que o adesivo infiltra (Mazzoni et al., 2018a; Tjäderhane et al., 2013; Turco et al., 2016). Nos adesivos autocondicionantes a desmineralização e infiltração do monômero são realizadas simultaneamente, com a aplicação de um monômero ácido na superfície da dentina que remove parcialmente a *smear layer* e obtendo-se uma camada híbrida com espessura de cerca de 1-2 µm (Van Meerbeek et al., 2020).

Dois mecanismos afetam e degradam a interface adesiva. A degradação das fibrilas de colágenos expostas, não envolvidas pelos monômeros resinosos adequadamente polimerizados são alvo da ação de enzimas proteolíticas, como as

MMPs. Além disso, há a degradação hidrolítica dos monômeros resinosos ao longo do tempo. Essas condições conseqüentemente propiciam a degradação da camada híbrida (Paken et al., 2021). A degradação ao longo do tempo da camada híbrida formada por adesivos hidrofílicos interfere na união entre dentina e resina. Isso pode ser explicado pela remoção incompleta de água associada à resina hidrofílica (Pashley et al., 2004). A característica hidrofílica dos adesivos favorece ao aumento da permeabilidade das camadas híbridas, tornando-se mais suscetíveis à degradação hidrolítica e lixiviação de resina (Rodrigues et al., 2017). Além disso, as matrizes de colágenos expostas após o condicionamento ácido podem ser degradadas por enzimas proteolíticas como as metaloproteinases e as catepsinas (Pashley et al., 2004).

Estudos apontam para a importância do papel das enzimas com ação colagenolítica e buscam formas para minimizar este efeito seja para o desenvolvimento de novos constituintes dos sistemas adesivo como monômeros funcionais, agentes reticuladores, solventes ou sistemas iniciadores, buscando maior estabilidade da interação com o substrato dentinário (Moszner and Hirt, 2012).

As técnicas utilizadas na análise de MMPs e cisteíno catepsinas tem auxiliado também no desenvolvimento de agentes inibidores. Os inibidores naturais das MMPs, são chamados de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Eles são capazes de atuar sobre colagenases, gelatinases e proteoglicanases. No entanto, sua ação é limitada. Por outro lado, inibidores sintéticos como a clorexidina tem sido objeto de inúmeros estudos, havendo atualmente evidência científica que suporte sua recomendação para o aumento da longevidade da resistência de união entre resina e dentina (Kiuru et al., 2021). A Clorexidina tem a capacidade de inibir atividade das MMP-2, MMP-8 e MMP-9 em concentrações baixas, respectivamente de 0,0001%, 0,02% e 0,002% (Carrilho et al., 2007). O cloreto férrico em concentrações reduzidas (0,08%) (Rodrigues et al., 2017) e o flúor na concentração de 5000 ppm, apresentaram ação inibitória à catepsina K, também responsável pela degradação colagenolítica. Isto sugere que o fluoreto de sódio seja um inibidor importante contra as cisteíno catepsinas (Zarella, 2017).

De forma semelhante é a contribuição que estas metodologias proporcionam ao conhecimento da estrutura e as condições em que a dentina pode

se encontrar, hígida (Inoue et al., 2009; Mazzoni et al., 2018b), cariada (Fu et al., 2020), esclerótica (Kwansirikul et al., 2020), envelhecida (Pashley et al., 2004), desidratada, irradiada (Cunha et al., 2020), sob ação de sistemas adesivos (Nikaido et al., 2015), tratamentos de superfície (Hass et al., 2016) ou sobre a influência de cargas (Bajaj et al., 2006), simulando as condições do ambiente intraoral.

Semelhante à importância destas técnicas ao conhecimento da ação das MMPs e cisteíno catepsinas na degradação do colágeno, é a compreensão das limitações de cada técnica. Sejam elas quanto à avaliações qualitativas, que podem ser ampliadas para uma avaliação quantitativa como a zimografia ou microscopia confocal, sejam para avaliações indiretas que sugerem cenários e condições que podem estar associadas à degradação do colágeno dentinário, como a microscopia eletrônica de varredura. O emprego rotineiro dessas técnicas, por outro lado, cria padrões que de acordo com desenhos experimentais semelhantes ou condições semelhantes, pode-se chegar a condições que proporcionam padrões comparáveis ou que sirvam de controle. Para isto é preciso não só o uso frequente das técnicas como também a descrição detalhada da técnica e das condições com que os estudos são realizados.

5 CONCLUSÃO

O tecido dentinário apresenta condições que favorecem à ação das MMPs e cisteíno catepsinas. As técnicas usualmente utilizadas para o estudo das proteases se baseiam na estrutura dessas enzimas e nas interações com a superfície dentinária. Os estudos que empregam as técnicas apresentadas têm aplicação em diferentes aspectos dos efeitos das proteínas colagenolíticas, contribuindo de forma efetiva para o conhecimento destas enzimas e do comportamento do substrato dentinário. As técnicas aqui apresentadas possuem limitações, que devem ser consideradas na interpretação dos resultados, uma vez que permitem análises preferencialmente qualitativas, dependentes de reações químicas ou bioquímicas ou não avaliam de forma direta a presença ou ação das MMPs ou cisteíno catepsinas. O detalhamento das condições experimentais e das técnicas e suas variações é recomendado a estudos futuros.

REFERÊNCIAS*

Bajaj D, Sundaram N, Nazari A, Arola D. Age, dehydration and fatigue crack growth in dentin. *Biomaterials* 2006;27:2507–17. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.11.035.

Bartlett JD. Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates. *ISRN Dent* 2013;2013:1–24. doi: 10.1155/2013/684607.

Bertassoni LE. Dentin on the nanoscale: hierarchical organization, mechanical behavior and bioinspired engineering. *Dent Mater* 2017;33:637–49. doi: 10.1016/j.dental.2017.03.008.Dentin.

Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L, et al. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dent Mater* 2010;26:571–8. doi: 10.1016/j.dental.2010.02.007.

Carrilho MRO, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjaderhane L, et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res* 2007;86:529–33.

Checchi V, Maravic T, Bellini P, Generali L, Consolo U, Breschi L, et al. The role of matrix metalloproteinases in periodontal disease. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17:1–13. doi: 10.3390/ijerph17144923.

Chwieralski CE, Welte T, Bühling F. Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis* 2006;11:143–9. doi: 10.1007/s10495-006-3486-y.

Corrêa PJR, Nagata PT, Dra P, Grace K, Nicola AM, Blawid DR, et al. *Microscopia Confocal Básica*. Brasilia - DF: UnB; 2014.

Cunha SR, Maravic T, Comba A, Ramos PA, Tay FR, Pashley DH, et al. In vivo and in vitro radiotherapy increased dentin enzymatic activity. *J Dent* 2020;Sep:103429. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103429.

Dai XF, Cate ART, Limeback H. The extent and distribution of intratubular collagen fibrils in human dentine. *Arch Oral Biol* 1991;36:775–8. doi: 10.1016/0003-9969(91)90045-V.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Dayan D, Binderman I, Mechanic GL. A preliminary study of activation of collagenase in carious human dentine matrix. *Arch Oral Biol* 1983;28:185–7. doi: 10.1016/0003-9969(83)90126-7.

Deshmukh AA, Weist JL, Leight JL. Detection of protease activity by fluorescent peptide zymography. *J Vis Exp* 2019;2019:1–8. doi: 10.3791/58938.

Elliott AD. Confocal Microscopy: principles and modern practices. *Curr Protoc Cytom* 2020;92:e68. doi: 10.1002/cpcy.68.

Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol* 1999;126:270–99. doi: 10.1006/jsbi.1999.4130.

Fu C, Deng S, Koneski I, Awad MM, Akram Z, Matinlinna J, et al. Multiscale in-vitro analysis of photo-activated riboflavin incorporated in an experimental universal adhesive. *J Mech Behav Biomed Mater* 2020;112. doi: 10.1016/j.jmbbm.2020.104082.

Hass V, Luque-Martinez I, Muñoz MA, Reyes MFG, Abuna G, Sinhoreti MAC, et al. The effect of proanthocyanidin-containing 10% phosphoric acid on bonding properties and MMP inhibition. *Dent Mater* 2016;32:468–75. doi: 10.1016/j.dental.2015.12.007.

Inoue G, Nikaido T, Foxton RM, Tagami J. The acid-base resistant zone in three dentin bonding systems. *Dent Mater J* 2009;28:717–21. doi: 10.4012/dmj.28.717.

Katchburian E, Arana V. *Histologia e Embriologia Oral*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda; 2017.

Kiuru O, Sinervo J, Vähänikkilä H, Anttonen V, Tjäderhane L. MMP Inhibitors and Dentin Bonding: Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Dent* 2021;27:9949699. doi: 10.1155/2021/9949699.

Kraur J. How do enzymes work? *Science* (80-) 1988;242:533–40.

Kwansirikul A, Sae-Lee D, Angwaravong O, Angwarawong T. Effect of different surface treatments of human occlusal sclerotic dentin on micro-tensile bond strength to resin composite core material. *Eur J Oral Sci* 2020;128:263–73. doi: 10.1111/eos.12699.

Lacruz RS, Habelitz S, Wright JT, Paine ML. Dental enamel formation and implications for oral health and disease. *Physiol Rev* 2017;97:939–93. doi: 10.1152/physrev.00030.2016.

Laronha H, Caldeira J. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells* 2020;9:1076. doi: 10.3390/cells9051076.

Mansoor A, Moeen F, Hussain A, Din SU, Khan MT, Said F. Age related changes in physiology of normal human tooth enamel: A review. *Pakistan J Physiol* 2020;16:35–40.

Märten A, Fratzl P, Paris O, Zaslansky P. On the mineral in collagen of human crown dentine. *Biomaterials* 2010;31:5479–90. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.03.030.

Mazzoni A, Angeloni V, Comba A, Maravic T, Cadenaro M, Tezvergil-Mutluay A, et al. Cross-linking effect on dentin bond strength and MMPs activity. *Dent Mater* 2018a;34:288–95. doi: 10.1016/j.dental.2017.11.009.

Mazzoni A, Maravic T, Tezvergil-Mutluay A, Tjäderhane L, Scaffa PMC, Seseogullari-Dirihan R, et al. Biochemical and immunohistochemical identification of MMP-7 in human dentin. *J Dent* 2018b;79:90–5.

Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, et al. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res* 2015;94:241–51. doi: 10.1177/0022034514562833.

Van Meerbeek B, Yoshihara K, Van Landuyt K, Yoshida Y, Peumans M. From Buonocore's Pioneering Acid-Etch Technique to Self-Adhering Restoratives. A Status Perspective of Rapidly Advancing Dental Adhesive Technology. *J Adhes Dent* 2020;22:7–34. doi: 10.3290/j.jad.a43994.

Moszner N, Hirt T. New polymer-chemical developments in clinical dental polymer materials: Enamel-dentin adhesives and restorative composites. *J Polym Sci Part A Polym Chem* 2012;50:4369–402. doi: 10.1002/pola.26260.

Nikaido T, Nurrohman H, Takagaki T, Sadr A, Ichinose S, Tagami J. Nanoleakage in Hybrid Layer and Acid-Base Resistant Zone at the Adhesive/Dentin Interface. *Microsc Microanal* 2015;21:1271–7. doi: 10.1017/S1431927615015068.

Orsini G, Jr AR, Mazzoni A, Nato F, Manzoli L, Putignano A, et al. A review of the nature, role, and function of dentin non-collagenous proteins. Part 1: proteoglycans and glycoproteins 2012;1–18.

Paken G, Çömlekoğlu ME, Sonugelen M. Detection of the hybrid layer biodegradation initiation factor with a scanning electron microscope. *Microsc Res Tech* 2021;84:2166–75. doi: 10.1002/jemt.23771.

Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004;83:216–21.

Perdigão J. Dentin bonding-Variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater* 2010;26:e24–37. doi: 10.1016/j.dental.2009.11.149.

Raeeszadeh-Sarmazdeh M, Do LD, Hritz BG. Metalloproteinases and Their Inhibitors: Potential for the Development of New Therapeutics. *Cells* 2020;9:1–34. doi: 10.3390/cells9051313.

Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:a004978.

Rodrigues R V, Giannini M, Pascon FM, Panwar P, Bromme D, Manso AP, et al. Effect of conditioning solutions containing ferric chloride on dentin bond strength and collagen degradation. *Dent Mater* 2017;33:1093–102.

Sheppard CJR, Mao XQ. Confocal microscopes with slit apertures. *J Mod Opt* 2007;35:1169–85. doi: 10.1080/09500348814551251.

Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* 2009;78:929–58. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.

Siklos M, BenAissa M, Thatcher GRJ. Cysteine proteases as therapeutic targets: Does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. *Acta Pharm Sin B* 2015;5:506–19. doi: 10.1016/j.apsb.2015.08.001.

Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis* 2004;10:311–8.

Sorushanova A, Delgado LM, Wu Z, Sholugo N, Kshirsagar A, Raghunath R, et al. The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development.

Adv Mater 2019;31:e1801651. doi: 10.1002/adma.201801651.

Thaler A, Ebert J, Petschelt A, Pelka M. Influence of tooth age and root section on root dentine dye penetration. *Int Endod J* 2008;41:1115–22. doi: 10.1111/j.1365-2591.2008.01486.x.

Tjäderhane L, Breschi L, Carrilho MR, Tay FR, Pashley DH. Dentin basic structure and composition-an overview. *Endod Top* 2012;20:3–29. doi: 10.1111/j.1601-1546.2012.00269.x.

Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto V-J, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res* 1998;77:1622–9. doi: 10.1177/00220345980770081001.

Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Carrilho MR, Carvalho RM, et al. Optimizing dentin bond durability : Control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater* 2013;29:116–35. doi: 10.1016/j.dental.2012.08.004.

Turco G, Frassetto A, Fontanive L, Mazzoni A, Cadenaro M, Di Lenarda R, et al. Occlusal loading and cross-linking effects on dentin collagen degradation in physiological conditions. *Dent Mater* 2016;32:192–9.

Vandooren J, Geurts N, Martens E, Van den Steen P, Opdenakker G. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nat Methods* 2013;10:211–220.

Wilkesman J, Kurz L. Zymography principles. *Methods Mol Biol* 2017;1626:3–10. doi: 10.1007/978-1-4939-7111-4_1.

Williams C, Wu Y, Bowers DF. ImageJ analysis of dentin tubule distribution in human teeth. *Tissue Cell* 2015;47:343–8. doi: 10.1016/j.tice.2015.05.004.

Willstätter R, Bamann E. Über die Proteasen der Magenschleim. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1929;180:127–43.

Xing Q. Information or resolution: which is required from an SEM to study bulk inorganic materials? *Scanning* 2016;38:1–16.

Zarella BL. Papel das proteases na erosão dentinária. Universidade de São Paulo; 2017.

ANEXO 1 – VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO

DEGRADAÇÃO DO COLÁGENO DENTINÁRIO POR AÇÃO DE METALOPROTEINASES E CISTEÍNO CATEPSINAS

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE



FONTES PRIMÁRIAS

1	repositorio.unicamp.br Fonte da Internet	8%
2	patents.google.com Fonte da Internet	1%
3	www.coursehero.com Fonte da Internet	1%
4	docplayer.com.br Fonte da Internet	1%
5	estudogeral.sib.uc.pt Fonte da Internet	1%
6	flatbutton.blogspot.com Fonte da Internet	1%
7	reformafinanzas.wordpress.com Fonte da Internet	1%
8	www.ans.gov.br Fonte da Internet	1%
9	www.redalyc.org Fonte da Internet	

		1 %
<hr/>		
10	Turco, Gianluca, Andrea Frassetto, Luca Fontanive, Annalisa Mazzoni, Milena Cadenaro, Roberto Di Lenarda, Franklin R. Tay, David H. Pashley, and Lorenzo Breschi. "Occlusal loading and cross-linking effects on dentin collagen degradation in physiological conditions", Dental Materials, 2016. Publicação	1 %
<hr/>		
11	hdl.handle.net Fonte da Internet	1 %
<hr/>		
12	idoc.pub Fonte da Internet	1 %
<hr/>		
13	library.olympic.org Fonte da Internet	1 %
<hr/>		