

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

RENATA LUÍSA SANTOS DA SILVA

PAPEL DOS BIOPEPTÍDEOS NO PROCESSO CARIOSO

Porto Alegre

2014

RENATA LUÍSA SANTOS DA SILVA

PAPEL DOS BIOPEPTÍDEOS NO PROCESSO CARIOSO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientadora: Prof^a. Dra. Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo

Porto Alegre

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Silva, Renata Luísa Santos da
Papel dos Biopeptídeos no Processo Carioso /
Renata Luísa Santos da Silva. -- 2014.
31 f.

Orientadora: Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre,
BR-RS, 2014.

1. Biopeptídeos. 2. Processo carioso. 3. MMPs. 4.
Siblings. 5. Dentina cariada selada. I. Parolo,
Clarissa Cavalcanti Fatturi, orient. II. Título.

Dedico este trabalho à minha amada mãe Maria Luísa , mãe guerreira, que sempre lutou todos os dias pela felicidade de nossa família. Te agradeço pelo amor incondicional que tu me oferta, pela rigidez nos momentos em que foi necessário, por me educar, por ter-me ofertado condições para que eu estudasse, por ter financiado meus estudos, por acreditar em mim, no meu presente, no meu futuro e no meu potencial. Eu te amo muito.

À minha irmã Rochele que é um anjo na minha vida, irmã mais velha que sempre me espelhei, e que tanto amo. Obrigada por também ter colaborado com a concretização deste sonho.

À minha irmã Gabrielle, por ser outro anjo na minha vida, a nossa caçula, que ajudei a criar e que ilumina as nossas vidas. Te amo.

Ao Darwin por ser uma excelente pessoa, por nos tratar como filhas, por torcer pelo meu sucesso, por amar e cuidar da minha mãe e por ter um coração puro e livre de maldade.

Ao Edson Rosa, por torcer por mim e ter contribuído nesta jornada.

Aos amigos Rochele Veiga, Milene, Desirré e Gabriela que são anjos que iluminam minha vida mesmo de longe. Amigas que adquiri na família Tiradentes e que sem dúvidas serão para a vida toda. Obrigada por tudo.

À Deus e aos meus anjos, que me guiam, nesta jornada da vida, que foram a minha força interior e não permitiram que eu desistisse dos meus sonhos, por mais que eu tenha tropeçado e que nos momentos mais difíceis, me fizeram entender o sentido da palavra esperança, fé e perseverança. Ele é o caminho, a verdade e a vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo por ter-me dado a oportunidade de realizar este trabalho. Por ser sempre compreensiva, carinhosa, educada e amável comigo. Por ter-me dado a chance de aprender muito todas as vezes em que trabalhamos juntas, tanto na prática clínica como na laboratorial, assim como na vida, e por sempre ter sido prestativa quando precisei de sua ajuda, sempre respeitando a minha liberdade de escolha.

À professora Mariza Maltz por ter contribuído com a minha formação acadêmica, através de suas aulas e suas inúmeras pesquisas publicadas que é a base para que muitos trabalhos sejam desenvolvidos, assim como foi o meu.

À Nailê Damé Teixeira pela oportunidade de ter trabalhado junto à ela em suas pesquisas desenvolvidas no LABIM. Obrigada pelas dicas, pela companhia e pelo incentivo.

À técnica do laboratório Luiza Mercado por todo carinho e atenção. Por ter me ajudado a realizar inúmeras atividades ali no LABIM, e por ter sido meu ombro amigo diversas vezes.

À Vitória Signori Roso por ser uma garota incrível, que luta por seus ideais e pelo que gosta. Foi uma excelente companheira de LABIM. Obrigada por todos os momentos que tivemos a chance de trabalharmos juntas.

À Thaís, por todo carinho e por estar sempre disposta a me ajudar quando precisei, ou quando tive dúvidas.

Aos professores Rodrigo Artur e Juliana Jobim, por terem aceitado meu convite para ser a minha banca, e por serem excelentes profissionais que muito agregam na equipe de professores do LABIM.

À Cirurgiã-Dentista Raquel Dalalba que é uma excelente pessoa que tive o prazer de conhecer durante a faculdade. És uma pessoa iluminada, de coração puro e sincero assim como o meu. Obrigada por todo carinho e torcida de sempre, foi um prazer.

*“O Valor das coisas não está no tempo que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem. Por isso,
existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e
pessoas incomparáveis”.*

Fernando Sabino

*“Quando a mente se abre para uma nova idéia, ela
jamais retorna ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

RESUMO

SILVA, Renata Luisa Santos da. **Papel dos biopeptídeos no processo cariioso.** 2014. 31f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

Enzimas bacterianas por muito tempo foram consideradas como responsáveis isoladas pela degradação da matriz dentinária durante o processo cariioso. Todavia, a literatura sugere que biopeptídeos derivados do hospedeiro, que estão presentes na dentina e na saliva, podem contribuir de forma significativa nesse processo. Nessa revisão de literatura o papel dos biopeptídeos no processo cariioso será estudado. Metaloproteinases (MMPs) possuem a habilidade de degradar a matriz dentinária e são importantes na progressão e paralisação das lesões cariosas. O papel dos Inibidores das MMPs também é discutido quanto a sua importância no processo cariioso. Tal conhecimento é importante no entendimento do processo cariioso em nível molecular e no desenvolvimento futuro de ferramentas terapêuticas relevantes na paralisação do processo cariioso. A identificação desses biopeptídeos pode contribuir na regeneração tecidual dentária.

Palavras-chave: Biopeptídeos. Dentina. Processo cariioso. MMPs. Siblings. Inibidores de MMPs. Dentina cariada selada.

ABSTRACT

SILVA, Renata Luisa Santos da. **The role of biopeptides in the carious process.** 2014. 31f. Final Paper (Graduation in Dentistry) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

Bacterial enzymes have long been considered solely responsible for the matrix degradation during carious process. However, the literature suggests that biopeptides derived from the host and that are present in dentin and saliva, may have a strong contribution to this process. In this review of the literature, the role of the biopeptides in the carious process will be studied. Metalloproteinases (MMPs) poses the ability to degrade the dentin matrix and are important in the progression and arrestment of the carious lesions. The role of the MMPs inhibitors will be also discussed in relation to its importance in the carious process. These findings are important to the understanding of the carious process in the molecular level and in the development of future therapeutic tools important in caries progress arrestment. The identification of these biopeptides may contribute in the dentin tissue regeneration.

Keywords: Biopeptides. Dentin. Carious process. MMPs. Siblings. MMPs inibitors. Sealed carious dentin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular das MMPs.....	16
Figura 2 - Representação esquemática da ativação da MMP.....	16
Figura 3 - Esquema sobre a atividade das MMPs durante o processo cariioso.....	21
Figura 4 - Imunomarcção das MMPs2 e BSP em dentina transparente (esclerótica).....	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSP	Sialoproteína óssea (Proteína não colágena da família das SIBLINGS)
DMP1	Proteína da matriz dentinária 1 (Proteína não colágena da família das SIBLINGS)
DSP	Sialoproteína da dentina (Proteína não colágena da família das SIBLINGS)
DSPP	Sialofosfoproteína da dentina (Proteína não colágena da família das SIBLINGS)
HA	Hidroxiapatita
MEC	Matriz extracelular
MEPE	Glicoproteína fosforilada da matriz extracelular (Proteína não colágena da família das SIBLINGS)
MMP(s)	Metaloproteinases
MT1-MMP	Metaloproteinase de membrana tipo 1
OPN	Osteopontina (Proteína não colágena da família das SIBLINGS)
SIBLINGs	Small integrin binding ligands N-linked glycoprotein (família de proteínas não colágenas)
TIMP(s)	Inibidores endógenos das metaloproteinases

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	METODOLOGIA	13
3	REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1	ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DA DENTINA.....	14
3.2	ATIVAÇÃO E INATIVAÇÃO DOS BIOPEPTÍDEOS NA DENTINA CARIADA.....	14
3.2.1	MMPs (Metaloproteinases)	15
3.2.2	TIMPs (Inibidores de metaloproteinases)	17
3.2.3	SIBLINGS (Família de proteínas não colágenas)	17
4	EXPRESSÃO DE MMPS NA DENTINA	18
5	PROCESSO CARIOSO NA DENTINA	19
5.1	INTERAÇÃO ENTRE AS MMPS DA DENTINA E SALIVA.....	20
5.2	METALOPROTEINASES DA SALIVA.....	20
5.3	MMPS PRESENTES NO PROCESSO CARIOSO.....	21
6	MMPS X SIBLINGS X FORMAÇÃO DE DENTINA REACIONAL E TRANSPARENTE(ESCLERÓTICA)	23
7	BIOPEPTÍDEOS NA DENTINA SELADA	25
8	CONCLUSÃO	28
	REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

O processo de formação da cárie dentária envolve mecanismos complexos de interação entre as bactérias do biofilme e o dente. Outrora, entediase que a matriz orgânica da dentina, fosse destruída somente pelas enzimas proteolíticas bacterianas, ampliando a extensão da lesão de cárie. No entanto, atualmente, sabe-se que durante o processo cariioso além das enzimas microbianas que degradam o colágeno, existem mecanismos de desmineralização e remineralização da dentina que são mediados por moléculas sinalizadoras do próprio tecido do hospedeiro, tanto na saliva quanto na dentina. Essas moléculas que são secretadas por odontoblastos e estão inseridas na matriz extracelular sob a forma de zimogênio, quando são ativadas no processo de cárie, desencadeiam a degradação do colágeno e de outros componentes da matriz orgânica dentinária, além de também estarem envolvidas com a remineralização do tecido dentinário, na formação de dentina reacional ou esclerótica. Representando estes biopeptídeos temos as metaloproteinases (MMPs), as SIBLINGs (família de proteínas não colágenas) e as TIMPs (inibidores das metaloproteinases) que atuam mutualmente nos processos fisiológicos e patológicos na dentina, sendo o foco do trabalho revisar os achados quanto à imunoexpressão e a função destes biopeptídeos em tecido cariado. A interação no processo de desmineralização e remineralização é importante no processo fisiológico do *turn over* dentinário assim como também no processo patológico da cárie. Estes achados são relevantes uma vez que abrem novas opções para o entendimento do processo cariioso, possibilitando novas estratégias na prevenção e tratamento da doença cárie (CHAUSSAIN et al., 2013). Assim, o objetivo do presente estudo é determinar o papel dos biopeptídeos no processo cariioso.

2 METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão de literatura com estudos que foram publicados entre os anos de 2003 e 2014. A busca dos artigos foi feita na base de dados do *PUBMED*. Artigos com idioma Inglês e português foram selecionados. Os descritores utilizados foram biopeptídeos, MMPs, siblings e inibidores de MMPs. Fez-se também a busca manual através das referências citadas nos artigos encontrados.

As metodologias aplicadas nos estudos dessa revisão foram bastante variados. Alguns estudos avaliaram os biopeptídeos a partir de dentes extraídos (CHARADRAM et al., 2012; BOUSHELL et al., 2011), outros de amostras coletadas de dentes “*in vivo*” (CHIBINSK et al., 2014), e outro através de amostras de células da mucosa bucal (TANNURE et al., 2012). Outros artigos incluídos na revisão foram revisões de literatura (VISSE; NAGASE, 2003; CHAUSSAIN et al., 2013; NAVARRO et al., 2006; VISSE; NAGASE, 2006).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DA DENTINA

A dentina é formada pelos odontoblastos, que são responsáveis por guiar a mineralização dentinária, formando a dentina primária e secundária, esta última sendo secretada ao longo dos anos, mesmo após a erupção dentária e formação do ápice radicular. Por isto, a dentina é composta por túbulos dentinários, que contém em seu interior os prolongamentos odontoblásticos e fluído dentinário. Estes túbulos estão envoltos por uma dentina altamente mineralizada, denominada peritubular, e por entre estes túbulos, no meio da trama de fibras colágenas do meio extracelular, temos a dentina intertubular (PEREIRA;NETTO;GONÇALVES, 2014). Portanto, de acordo com a intensidade dos estímulos provenientes do processo cariioso, que agridem a polpa, os odontoblastos podem responder, através dos seus prolongamentos, de maneira, a produzir dentina terciária ou esclerótica para proteger a polpa. Estes mecanismos desencadeiam uma série de interações entre os biopeptídeos presentes na matriz extracelular da dentina e que são também secretados pelos odontoblastos. No que diz respeito à sua composição, a dentina é composta por uma matriz orgânica mineralizada, onde predomina principalmente colágeno tipo I, correspondendo a 90% da matriz, e colágenos tipo III e V, que correspondem entre 1-3% da matriz extracelular da dentina, organizado em uma rede de fibrilas, sob uma trama mineralizada por cristais de hidroxiapatita (HA), e associadas a elas outras proteínas não colágenas, que constituem cerca de 10% da matriz dentinária. Entre estas proteínas não colagenosas temos: glicoproteínas, proteoglicanas, MMPS (Metaloproteinases) e SIBLINGS (small integrin-binding N-linked glycoproteins) entre outras enzimas, fatores de crescimento e proteínas não fosforiladas. Estas MMPS e SIBLINGS estão presentes, além da dentina, em outros tecidos do organismo, como o ósseo, tecido cardíaco, neuronal, conjuntivo, epitelial, entre outros, associados em eventos fisiológicos e patológicos (CHAUSSAIN et al., 2013; BOUSHELL et al., 2011; PEREIRA;NETTO;GONÇALVES, 2014).

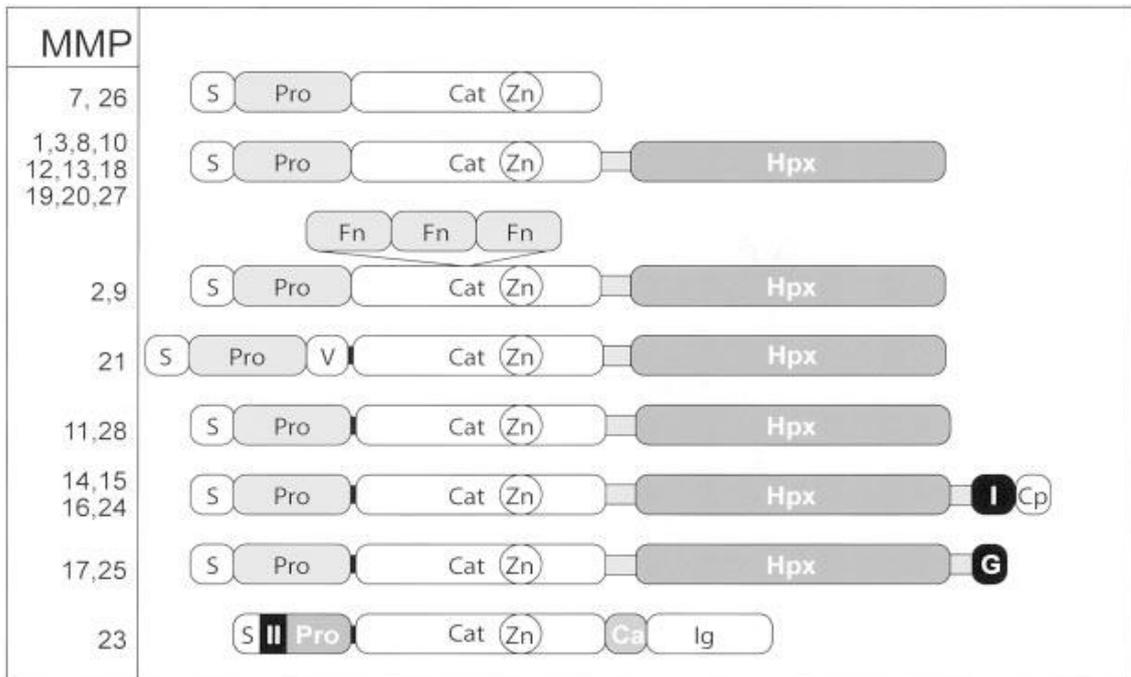
3.2 ATIVAÇÃO E INATIVAÇÃO DOS BIOPEPTÍDEOS NA DENTINA CARIADA

Neste capítulo serão abordadas as proteínas metaloproteinases, as TIMPs e as SIBLINGs.

3.2.1 MMPs (Metaloproteinases)

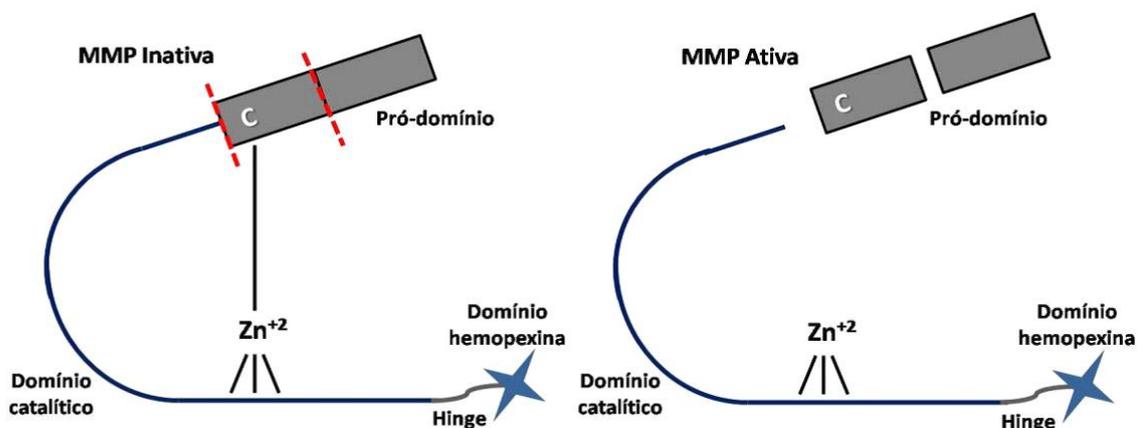
As MMPs formam um grupo de 23 enzimas, zínco dependentes, encontradas em humanos, que são sintetizadas e liberadas no meio extracelular (MEC), sob a forma de zimogênio (forma inativa da enzima) pelas células dos tecidos que são capazes de responder à ação dos fatores de crescimento e citocinas, como é o caso dos odontoblastos (NAVARRO et al., 2006; VISSE;NAGASE, 2003). Quanto à sua estrutura base, as MMPs possuem uma sequência sinal (S) na extremidade amino-terminal, que é responsável por direcionar a rota secretória destas enzimas. Em seguida, há o prodomínio (pró-peptídeo) que contém um grupo tiol (SH) que é responsável por manter a enzima em sua forma inativa. Logo em seguida, tem o domínio catalítico que contém um sítio de ligação ao zinco, podendo ter também, a presença da fibronectina, responsável pela união da enzima à molécula de colágeno. Logo em seguida, há um componente denominado hemopexina, ligada ao domínio catalítico por uma estrutura “H” denominada “hinge” (Figuras 1 e 2). É neste componente terminal em que as TIMPs (inibidores das MMPs) atuam nas MMPs, regulando sua atividade, mantendo a homeostase do tecido (VIDAL, 2012; NAVARRO et al., 2006). A figura a seguir (Figura 1), mostra a estrutura base das MMPs. Temos a representação esquemática da estrutura molecular das metaloproteinases como já foi citado logo acima, e em seguida alguns domínios adicionais relacionados com a ativação e com a interação destas enzimas com outras moléculas da MEC. Ao lado de cada estrutura molecular, está representado o número da MMP a qual corresponde. Para que as MMPs sejam ativadas algumas reações ocorrem na molécula (Figura 2). Quando ocorre a ativação da enzima, há uma quebra da molécula na região que liga o prodomínio ao domínio catalítico.

Figura 1– Classificação das MMPs de acordo com sua conformação estrutural



Fonte: VISSE;NAGASE, 2003

Figura 2- Representação esquemática da ativação da MMP



Fonte: VIDAL, 2012

As MMPs são subdivididas em 5 classes: collagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas e tipo membrana. Sua classificação deve-se à conformação de suas estruturas moleculares e seus substratos alvo. As metaloproteinases estão relacionadas com processos de degradação das fibras colágenas em situações patológicas, como no caso da cárie. No entanto, elas também atuam em processos de regulação da mineralização e remineralização dos

tecidos, clivando componentes da matriz extracelular, como as proteínas não colágenas da família SIBLINGS.

3.2.2 TIMPs (Inibidores de metaloproteinases)

São os inibidores das metaloproteinases (MMPs), os quais formam uma família de quatro enzimas, numeradas de 1 a 4 (TIMP 1, TIMP 2, TIMP 3, TIMP 4). As TIMPs possuem dois domínios estruturais, um domínio N-terminal e um C-terminal. Os TIMPs também tem a função biológica de regular o crescimento celular, a migração celular e a apoptose, além de atuar como inibidor endógeno das metaloproteinases, regulando a atividade das MMPs nos tecidos, mantendo a homeostase (VISSE;NAGASE, 2003). Qualquer uma das TIMPs podem atuar nas mais diversas metaloproteinases identificadas, desde que possuam o domínio hemopexina, que corresponde ao local onde elas se ligam às moléculas de MMPs. As outras MMPs que não possuem a hemopexina, provavelmente tem a sua atividade controlada por outros inibidores endógenos das MMPs, cujo mecanismo de ligação não foi identificada na literatura (VISSE; NAGASE, 2003).

3.2.3 SIBLINGs (Família de proteínas não colágenas)

As SIBLINGs compreendem as proteínas não colágenas, representadas por: Osteopontina (OPN), Sialoproteína óssea (BSP), Proteína da matriz dentinária 1 (DMP 1), Sialofosfoproteína dentinária (DSPP), glicoproteínas fosforiladas da matriz extracelular (MEPE) e são assim denominadas por apresentarem características genéticas e estruturais comuns. Elas formam complexos proteicos, ao se unirem às moléculas de MMPs, e tem íntima relação com células com alta taxa metabólica (OGBUREKE;FISHER, 2007). Acredita-se que as SIBLINGs estão relacionadas com a mineralização e remineralização da dentina, com a maturação e reorganização das fibras colágenas, mineralizando a matriz extracelular, norteando a deposição dos cristais de hidroxiapatita (HA) na dentina, tanto no processo de dentinogênese como na dentina reacional. Também, encontraram-se relatos na literatura, que indicam a atividade destas proteínas não colágenas com a degradação da MEC frente ao processo cariioso (CHAUSSAIN et al., 2013).

4 EXPRESSÃO DE MMPS NA DENTINA

Na dentina, as metaloproteinases são essenciais para o processo de dentinogênese, realizando a regulação do processo de mineralização da dentina, já que atua em sinergia com outras proteínas de origem não colágena, promovendo a remodelação do tecido conjuntivo, a partir da clivagem e associação com as SIBLINGs, colaborando com o processo de mineralização. Na dentina, as MMPs 2, 3, 8, 9, 13, 14 e 20 fazem-se presentes, sendo a gelatinase MMP 2, a estromelina MMP 3 e a gelatinase MMP 9 as mais expressas em dentina, principalmente durante a dentinogênese. Em processos de formação dentinária, há uma expressão mais significativa das MMPs 2, 3 e 9, que induzem a mineralização da dentina, e ficam inseridas na matriz extracelular sob a sua forma inativa. A MMP 2 tem sua importância no processo de dentinogênese, como já foi supracitado, atuando na degradação da membrana celular, promovendo o contato epitélio-mesênquima, sendo pré-requisito para a citodiferenciação entre os pré- ameloblastos e odontoblastos. A metaloproteinase 2 é a mais predominante em dentina sadia e é regulada pelo TIMP 2 (CHAUSSAIN, 2013).

Boushell et al. (2011) relataram que como a MMP 2 está envolvida nos processos iniciais de formação dentinária, também está relacionada com a remineralização da dentina, pois através dos testes de imunohistoquímica, ela mostra-se presente por toda a extensão da dentina, sendo as regiões de maior predomínio, o interior dos processos odontoblásticos na região de dentina do manto, região correspondente à junção amelodentinária. Também, identificou-se a marcação da sialoproteína do osso (BSP), que também está associada com ao processo de mineralização. Estes dois biopeptídeos formam o complexo protéico que atua induzindo a mineralização. A MMP 3 também apresenta-se em maior predomínio na região da dentina do manto, e é um importante ativador de outras metaloproteinases e SIBLINGs.

5 PROCESSO CARIOSO NA DENTINA

Do ponto de vista biocelular, assim que os patógenos adentram a matriz orgânica da dentina, os prolongamentos odontoblásticos, através de seus receptores celulares, são responsáveis por gerar uma resposta pulpar. Dependendo do tempo e da intensidade da agressão a polpa pode responder formando dentina terciária, gerar uma pulpíte, ou uma necrose pulpar. Com a resposta pulpar haverá a liberação de citocinas que modularão a resposta imune e inflamatória (FONSECA, 2014). Durante o processo carioso, com a queda de pH para o nível crítico, de 5,5 para os cristais de HA, haverá uma desmineralização da dentina, expondo a sua matriz orgânica. Sendo assim, são ativadas, no meio extracelular, as MMPs que antes estavam ali sob a sua forma inativa. Estas metaloproteinases são responsáveis por clivar as outras proteínas da MEC, colaborando na propagação do processo carioso. Sabe-se que as colagenases bacterianas não são capazes de degradar sozinhas as moléculas da MEC da dentina, e além disto elas não resistem por um período muito longo, ao meio ácido (pH 4,3), sendo portanto, necessário haver outros mecanismos, de proteases endógenas, que sejam capazes de propagar a degradação das fibras colágenas e de sua matriz extracelular, na dentina (CHAUSSAIN et al., 2013; ARAKAKI;MARQUES;SANTOS, 2009; BOUSHEL et al., 2011).

Mesmo que as moléculas de colágeno sejam conformadas em tripla hélice, as proteases da família das metaloproteinases (MMPs), e também as cisteíno-protease catepsina K(CT-K) são capazes de hidrolisar estas moléculas de colágeno (PEREIRA;NETTO;GONÇALVES, 2014; CHAUSSAIN, 2013). As cisteíno-catepsinas correspondem a outra classe de proteases, que elencam 11 proteases humanas identificadas. Elas ajudam na degradação da MEC, e são ativadas por outras proteases ou por uma autoativação através do pH ácido. Vidal (2012) relata que as cisteínas-catepsinas podem ser encontradas mais em associação com lesões profundas de cárie, ao contrário das MMPs, que foram mais associadas às regiões mais externas das lesões.

5.1 INTERAÇÃO ENTRE AS MMPS DA DENTINA E SALIVA

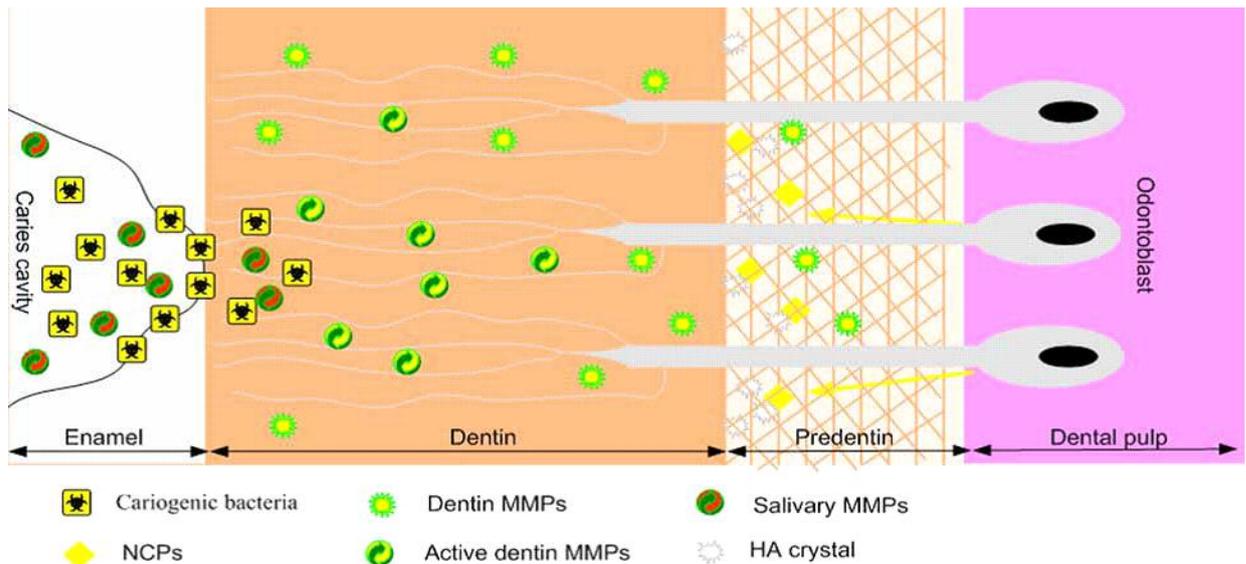
A ativação das MMPs presentes no interior dos processos odontoblásticos, na MEC da dentina e na saliva, ocorrerá devido a neutralização do pH do meio, após a desmineralização dos cristais de HA que compõem a matriz orgânica da dentina. Acredita-se que esta neutralização ocorre devido ao efeito tampão da saliva, e também pelo processo de liberação dos íons cálcio e fosfato, pela dissolução destes cristais de HA no meio extracelular, gerando uma alcalinização deste meio (VIDAL, 2012). Os íons cálcio também são responsáveis por estabilizar a atividade das enzimas de metaloproteinases. Frente ao evento patológico da cárie, a clivagem de outras MMPs, que potencializará a capacidade proteolítica das MMPs, e proteínas não colágenas, também serão clivadas e envolvidas no processo de hidrólise das moléculas que formam o colágeno, e de outras moléculas da matriz extracelular (CHAUSSAIN, 2013). Os biopeptídeos envolvidos na degradação da MEC na cárie, também estão envolvidos no processo de remineralização da dentina (CHAUSSAIN et al., 2013; ARAKAKI;MARQUES;SANTOS, 2009; BOUSHELL et al., 2011).

5.2 METALOPROTEINASES DA SALIVA

Sabe-se que as metaloproteinases presentes na cavidade bucal, que podem ter origem tanto do fluido crevicular gengival ou da secreção das glândulas salivares, desempenham papel fundamental na ativação das metaloproteinases da dentina. Além disso, apresentam-se como importantes adjuvantes na propagação do processo cariioso em dentina, colaborando com a degradação da MEC da dentina. As gelatinases MMPs 2 e 9 apresentam-se em abundância na saliva, degradando colágeno tipos I, II e III, que estão inseridas tanto na matriz dentinária, como nas membranas basais celulares (CHAUSSAIN, 2013; CHARADRAM, 2012; VISSE;NAGASE, 2006). A gelatinase MMP 2 é clivada a partir do pH de 6,49 (CHARADRAM et al., 2012) tendo assim a ativação do seu domínio catalítico. A MMP 2 é uma das principais metaloproteinases envolvidas no processo de dentinogênese, como já foi relatado, mas que também tem forte relação com a degradação do colágeno, na dentina cariada, juntamente com a gelatinase MMP 9 e a colagenase MMP 8, que foram identificadas com maior expressão nas regiões externas das lesões (VIDAL, 2012). A figura a seguir esquematiza a atividade das MMPs no processo cariioso (Figura 4). As bactérias cariogênicas produzem ácido na lesão de cárie. Com isto, ocorrerá a queda de pH, que resulta na desmineralização dos cristais de HA da matriz dentinária, libertando íons cálcio e fosfato no meio extracelular, sugerindo uma alcalinização do pH, ativando as MMPs da dentina e da

saliva. Haverá, também, uma neutralização do pH pelo sistema tampão da saliva, que participa na ativação das MMPs. Estas MMPs ativadas na cárie degradam as fibras colágenas da matriz dentinária desmineralizada, e outros componentes integrantes da MEC.

Figura 3 -Esquema sobre a atividade das MMPs durante o processo cariioso.



Fonte: CHAUSSAIN et al., 2013

5.3 MMPS PRESENTES NO PROCESSO CARIOSO

As MMPs proteoliticamente ativas durante o processo cariioso são as colagenases MMP1, MMP8 e MMP13, as gelatinases MMP 2, MMP 9, a matrilisina MMP 20, as tipo membrana MT1-MMP e a estromelisina MMP 3 (CHIBINSKI et al., 2014). As proteínas não colágenas, envolvidas no processo de remineralização da dentina e que pertencem à família das SIBLINGs, são: a sialofosfoproteína da dentina (DSPP), e a sialoproteína do osso (BSP) (CHARADRAM et al., 2012; CHIBINSKI et al., 2014). As MMPs 2, 8, 9 e 14 (MT1-MMP) são as que mais são expressas em dentina cariada.

A MMP 2, apesar de ser predominante em dentina sadia, tem sua imunexpressão mais intensa ainda em dentina cariada (TANNURE et al., 2012). A MMP 2 é ativada pela metaloproteinase tipo membrana (MT1-MMP), que frente a quadros de dentina cariada, tem sua atividade aumentada. As MMPs do tipo membrana (MT-MMP) são pró-MMP 2, com

exceção da MT4-MMP(VISSE;NAGASE,2003). Possuem, também, atividade colagenolítica, degradando colágeno tipos I,II e III, e também, digerem moléculas da matriz extracelular, sendo também relacionada com a angiogênese em processos patológicos, como nos casos de câncer (VISSE;NAGASE, 2003; VISSE;NAGASE, 2006). As MT1-MMP (MMP14) ficam mais expressas nos odontoblastos, durante o processo patológico da cárie, sendo, portanto, um potente ativador de outras metaloproteinases, sendo o principal ativador da MMP 2 (CHAUSSAIN, 2013). Em suma, na dentina, as MMPS fazem-se presentes, tanto na progressão como na reparação do processo cariioso e no processo inicial de dentinogênese (BOUSHELL et al., 2011).

As MMPs 13 que também estão presentes na matriz extracelular da dentina, também se mostram ativas frente ao processo cariioso, como é o caso das MMPs 2, 8 e 9 e 14. Na cárie, ela também atua na ativação de outras moléculas de MMPs, na degradação da MEC, mas também está relacionada com a remodelação dos tecidos, incluindo os odontoblastos. A sua imunexpressão também tem sido estudada com relação à suscetibilidade individual dos indivíduos à cárie (LORETO et al., 2014). Tannure et al. (2012) realizaram um estudo no Rio de Janeiro, entre 2009 e 2011, com 505 pacientes com idades entre 3 e 21 anos, que avaliou a suscetibilidade à cárie dos indivíduos de acordo com os polimorfismos em MMPs 2, 9, 13 e TIMP 2. Através de um questionário que buscou identificar dados étnicos, socioeconômicos, dietéticos e de exposição ao flúor, e com um exame clínico para identificar o CPOD ou ceod destes pacientes, avaliou-se por uma regressão logística binária, a associação entre as variáveis genóticas, obtidas através de uma amostra de células da mucosa bucal, com a suscetibilidade à cárie. Nos resultados encontrou-se associação positiva entre o polimorfismo da MMP 13 e a suscetibilidade à cárie, onde o genótipo GG foi identificado mais em pacientes livres de cárie. Esse estudo tenta explicar as diferenças individuais a partir de modificações genéticas e ambientais e ressalta a importância da MMP 13 nesse processo. Para as MMPs 2, 9, e a TIMP 2 não encontrou-se essa significância entre os polimorfismos e a suscetibilidade à cárie.

6 MMPS X SIBLINGS X FORMAÇÃO DE DENTINA REACIONAL E TRANSPARENTE(ESCLERÓTICA)

Charadram et al. (2012) relata que em testes de imunohistoquímica a MMP 2, a DSPP (Sialoproteína de dentina), MT1-MMP e TIMP 2 estão expressas em processos cariosos em que há formação de dentina reacional. Isto sugere que através da clivagem de MT1-MMP, no processo carioso, haverá uma ativação da pró-MMP 2. Este processo é regulado pela MT1-MMP e a TIMP 2, onde a molécula de MT1-MMP se liga a uma molécula de TIMP 2 inibindo a sua atividade, ativando a MMP 2 (VISSE;NAGASE, 2003). Em dentina cariada, a imunohistoquímica revela que a MMP 2 e a BSP apresentam o mesmo padrão de imunexpressão que em dentina sadia, apresentando-se por toda a extensão da dentina, associado aos prolongamentos odontoblásticos e inseridas na matriz extracelular da dentina, com maior expressão na região correspondente à dentina do manto. No entanto, há um aumento significativo da expressão destes biopeptídeos nos túbulos dentinários que estão afetados pela cárie (Figura 5). Apesar disso, quando se tentou relacionar a intensidade de expressão das MMPs 2 e BSP com diversos graus de severidade de cárie não foi possível ver essa associação (BOUSHELL et al.,2011).

Charadram et al. (2012) também descrevem que a sialofosfoproteína da dentina (DSPP) que é uma proteína de origem não colágena, da família das SIBLINGS, está relacionada com a mineralização da dentina, e que sua expressão está ativa, frente a um processo carioso, com a formação de dentina reacional, sendo que, esta dentina também apresenta formato tubular, semelhante à dentina primária que é formada na dentinogênese, e à dentina secundária, que segue sendo formada mesmo após a erupção dental e total formação radicular. O mecanismo de ação descrito para a formação de dentina reacional sugere que nos processos cariosos, haverá uma cascata de ativações como: ativação de MT1-MMP, que cliva a MMP 2, através da ativação de moléculas pró-MMP 2. A MMP2 cliva as moléculas de DSPP (sialofosfoproteína da dentina), que participam do processo de mineralização e remineralização, libertando moléculas maiores de DSP (sialoproteína da dentina), visto que a DSPP divide-se proteoliticamente em sialoproteína da dentina (DSP) e fosfoproteína da dentina (DPP) (BOUSHELL, 2011; CHARADRAM et al., 2012).

Em agressões de alta intensidade, podemos ter a morte de odontoblastos, e a formação de dentina esclerótica ou transparente. O mecanismo de formação da dentina esclerótica ou transparente, funciona através da desmineralização da dentina peritubular, devido à ação das

proteases bacterianas que desmineralizam a matriz extracelular, como foi anteriormente explicado. Haverá, portanto, uma calcificação dentro do túbulo dentinário como forma de proteger a polpa das bactérias. Acredita-se que este mecanismo é mediado pela ação das MMPS e das SIBLINGs, mas que ainda não está esclarecido (BOUSHELL et al., 2011). A presença de dentina transparente ou esclerótica, logo abaixo da lesão de cárie, e os testes de imunohistoquímica, confirmam um aumento da expressão de MMP 2 e BSP, nestes túbulos que sofreram a calcificação, reforçando a ligação entre estes dois biopeptídeos na mineralização dentinária (BOUSHELL et al., 2011). A imagem abaixo, de maior aumento, ilustra a alteração de mineralização na dentina afetada pela cárie (setas). A imagem de menor aumento (representando a dentina descalcificada) é do mesmo dente e identifica a intensa imunoreatividade para MMP2 e BSP nos túbulos dentinários afetados pela cárie (Figura 5).

Figura 4 – Imunomarcação das MMPs2 e BSP em dentina transparente (esclerótica)



Fonte: BOUSHELL et al., 2011

Acredita-se que esta calcificação deve-se à ligação das moléculas de MMP 2 e BSP em um complexo proteico, ligando-se a moléculas de colágeno e de cristais de HA, da dentina peritubular desmineralizada, direcionando o processo de mineralização destes túbulos, resultando em sua calcificação (BOUSHELL et al., 2011). Outras metaloproteinases como a MMP 3 e a MMP 9, também apresentam associação com as SIBLINGs, sendo a MMP 3 com a OPN, e a MMP 9 com a DMP 1. No entanto, ainda é necessário identificar a importância da atividade destes complexos proteicos na atividade da doença cárie (BOUSHELL, 2011; OGBUREKE; FISHER, 2007).

7 BIOPEPTÍDEOS NA DENTINA SELADA

A remoção parcial de dentina cariada faz-se necessária, em casos de lesões de cárie profunda, a fim de evitar uma exposição pulpar desnecessária que poderia comprometer a longevidade deste dente no ambiente bucal. No entanto, é necessário que a cavidade esteja bem selada. Isto reduz significativamente a quantidade de bactérias da lesão, tornando-as inviáveis e inativando a lesão (ALVES et al., 2010). Nos diferentes estudos com selamento de dentina cariada pode-se observar a modificação clínica da dentina e a reorganização do tecido (BJORNDAL, 2008; CORRALO; MALTZ, 2013). O entendimento do processo de remineralização dentinária começou a ser estudado com ênfase em seus mecanismos moleculares e, em especial, no papel dos biopeptídeos dentinários. Esse conhecimento traz contribuições interessantes para o estudo da cárie dental e deve ser uma linha de pesquisa a ser explorada em um futuro próximo. Muitos estudos que avaliam os biopeptídeos da dentina cariada, o fazem a partir de dentes extraídos, sendo que a dinâmica do complexo dentino - pulpar é bastante complexa e deve, na medida do possível, ser estudada *in vivo*.

Dentro dessa idéia, um estudo publicado recentemente avaliou a imunoexpressão de MMP 2, MMP 8 e MMP 9, colágeno tipo I, e BSP, em dentina cariada selada em uma amostra final de 34 dentes decíduos, com pacientes de idades entre 3 e 10 anos de idade. Os dentes selecionados não poderiam ter sinais de sintomas pulpares (CHIBINSKI et al., 2014). Nesse estudo, para evitar as diferenças individuais na expressão dos biopeptídeos, amostras do mesmo dente foram utilizadas na comparação dos resultados antes e após o selamento dentário por 60 dias. Foi feita uma coleta de dentina cariada antes do selamento, em uma região mais mesial da lesão e outra após o selamento de 60 dias com cimento de ionômero de vidro, em uma região mais distal da lesão. Técnicas de imunohistoquímica foram utilizadas para identificar as MMPs destas amostras. Essas metaloproteinases (MMP2, MMP 8 e MMP 9) foram escolhidas devido a sua relação já comprovada com a cárie dental em dentes extraídos (CHARADRAM et al., 2012; BOUSHELL et al., 2011; CHIBINSKI et al., 2014). A BSP foi escolhida por ser uma proteína não colagenosa importante na mediação da mineralização dentinária. A BSP apresenta afinidade com cálcio e com a hidroxiapatita, fazendo a conexão entre o colágeno recém-formado e a fase inorgânica da dentina (CHARADRAM et al., 2012). Os resultados de Chibinski et al. (2014) mostram uma maior expressão MMP 8, colágeno tipo I e BSP após o selamento da dentina cariada. As demais MMPs (MMP 2 e MMP 9) estavam presentes tanto antes quanto após o selamento. A

localização das MMPs variou no tecido dentinário cariado. O quadro a seguir resume o principais achados dessa pesquisa.

Tabela 1 - Resumo sobre biopeptídeos da dentina cariada selada.

ACHADOS	MMP 2	MMP 8	MMP 9	BSP	COLÁGENO TIPO I
Função já identificada	Associada com lesões de cárie; Presente na saliva;	Muito efetiva na hidrólise de colágeno; Produzida por odontoblastos e tecido pulpar; Presente na saliva;	Atividade gelatinolítica predominante na cárie; Presente na saliva;	Mediação da mineralização dentinária; Ação conjunta com a MMP-2;	Produzido pelos odontoblastos; Componente principal da dentina;
Antes do selamento	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
Após selamento	Presente	Expressão aumentada	Presente	Expressão aumentada	Expressão aumentada
Localização na dentina cariada selada	Ao redor dos túbulos dentinários;	Distribuída em toda a dentina e grande expressão nos túbulos dentinários;	Ao redor dos túbulos dentinários;	Ao redor dos túbulos dentinários;	Ao longo dos túbulos dentinários;
Principais resultados	Em dentina sadia sua localização é na pré-dentina e JAD; Na dentina cariada selada foi encontrada ao redor dos túbulos dentinários; Sua expressão não estava aumentada mas difere da dentina hígida; O pouco tempo de selamento pode explicar sua expressão não estar aumentada como se esperava	Apesar de hidrolisar colágeno, seu papel é importante na organização da dentina antes da mineralização; Ação conjunta com MMP-9 e MMP-2;	Em dentina sadia sua localização é na pré-dentina e JAD; Apesar de não estar com expressão aumentada, sua localização ao redor dos túbulos mostra diferença em relação a dentina hígida;	Indica que está ocorrendo remineralização da dentina cariada selada;	Sua expressão aumentada indica que os odontoblastos secretaram colágeno durante a remineralização da dentina selada;

Os achados de expressão aumentada de MMP 8, BSP e colágeno tipo I na dentina cariada selada, indicam que estes biopeptídeos estejam relacionados com a remodelação da dentina infectada e não com a progressão da doença cárie, e sugere-se que a imunoeexpressão destas proteínas descrevam o perfil inicial da reorganização da dentina, já que o período de selamento foi curto (60 dias). Acompanhamentos longitudinais de maior duração de dentes selados poderiam avaliar o papel desses biopeptídeos na continuação do processo de reestruturação dentinária e remineralização.

8 CONCLUSÃO

O conhecimento sobre os fatores bioquímicos envolvidos no processo cárie são de suma importância, uma vez que possibilitam o desenvolvimento de novas condutas que tenham o objetivo de aumentar a longevidade dentária. Através do esclarecimento, quanto a ação das endopeptidases metaloproteinases, em suas mais variadas formas de expressão, e seu relacionamento com as demais proteínas não colágenas presentes na matriz extracelular, nos possibilita entender a origem de muitos processos fisiológicos e patológicos, permitindo um aprofundamento maior na compreensão sobre a maneira de como estes eventos, se expressam clinicamente, permitindo-nos buscar soluções para os problemas que podem ser ocasionados pela interação destas proteínas.

Mesmo que, os resultados de diversos estudos, proponha a identificação destas metaloproteinases e SIBLINGs correlacionadas aos eventos de degradação da matriz extracelular, formação de dentina reacional e esclerótica, e também com a dentinogênese, ainda não foi completamente elucidado o mecanismo de ação concreto de cada uma delas. Sabe-se que na dentina, as MMPs atuarão degradando os componentes da MEC, mas também, participando do processo de formação de dentina reacional ou esclerótica, e que sua função vai depender da intensidade da agressão pulpar. Isto é reforçado através das identificações de MMPs 2, 8 e 9 com a degradação de matriz extracelular em processos cariosos, mas que também estão envolvidas na dentinogênese. Os desequilíbrios de expressão entre as MMPs e as TIMPs aumentam a degradação da matriz extracelular, já que as TIMPs são as responsáveis por regular a atividade das MMPs. Com relação à resposta pulpar com a remineralização de dentina, as MMPs 2 e BSPs foram apresentados nos estudos, em associação, em eventos de formação de dentina esclerótica. Já em dentina reacional, encontrou-se uma associação de MMP 2 com DSPP. Também relatou-se sobre um aumento na expressão de BSP na dentina, após a remoção parcial de tecido cariado e seu selamento.

Como são fundamentais, também para o processo de mineralização dos tecidos, estes biopeptídeos são expressos por toda a vida do indivíduo, sendo de extrema importância para o remodelamento dos tecidos. Portanto, mesmo que ainda tenha-se poucos dados sobre a ação precisa das MMPs, tendo algumas destas proteínas que continuam com seu mecanismo de ação sem esclarecimento (LORETO et al., 2014), sabe-se de suas funções, nos eventos fisiológicos e patológicos, permitindo o desenvolvimento de propostas de intervenção nos processos patológicos. E com relação a cárie, poderão ser desenvolvidas substâncias ou

materiais, que interfiram na atividade destas proteínas, reduzindo a degradação da matriz extracelular.

REFERÊNCIAS

- ALVES, L. S. et al. Qualitative and quantitative radiographic assessment of sealed carious dentin: a 10-year prospective study. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod**, St. Louis, v. 109, n. 1, p. 135-41, Jan 2010.
- ARAKAKI, P. A.; MARQUES, M. R.; SANTOS, M. C. MMP-1 polymorphism and its relationship to pathological processes. **J. Biosci**, Bangalore, v. 34, n. 2, p. 313-20, Jun 2009.
- BJØRNDAL, L. Indirect pulp therapy and stepwise excavation. **J. Endod**, Copenhagen, v. 34, n. 7 Suppl, p. S29-33, Jul 2008.
- BOUSHELL, L. W.; NAGAOKA, H.; YAMAUCHI, M. Increased matrix metalloproteinase-2 and bone sialoprotein response to human coronal caries. **Caries Res**, Basel, v. 45, n. 5, p. 453-9, 2011.
- CHARADRAM, N. et al. Regulation of reactionary dentin formation by odontoblasts in response to polymicrobial invasion of dentin matrix. **Bone**, Elmsford, v. 50, n. 1, p. 265-75, Jan 2012.
- CHAUSSAIN, C. et al. Dentin matrix degradation by host matrix metalloproteinases: inhibition and clinical perspectives toward regeneration. **Front. Physiol**, Lausanne, v. 4, p. 308, 2013.
- CHIBINSKI, A. C. et al. Bone sialoprotein, matrix metalloproteinases and type I collagen expression after sealing infected caries dentin in primary teeth. **Caries Res**, Basel, v. 48, n. 4, p. 312-9, 2014.
- CORRALO, D. J.; MALTZ, M. Clinical and ultrastructural effects of different liners/restorative materials on deep carious dentin: a randomized clinical trial. **Caries Res**, Basel, v. 47, n. 3, p. 243-50, 2013.
- FONSECA, A. S. **Odontologia Estética: Respostas às dúvidas mais frequentes**. São Paulo: Artes Médicas, 2014. 384 p.
- LORETO, C. et al. Immunohistochemical analysis of matrix metalloproteinase-13 in human caries dentin. **Eur. J. Histochem**, Pavia, v. 58, n. 1, p. 2318, 2014.
- NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc. Res**, London, v. 69, n. 3, p. 562-73, Feb 2006.
- NAVARRO, V. P. et al. The participation of matrix metalloproteinases in the physiopathological process of the oral cavity. **Rev. Odontol. UNESP**, v. 35, n. 4, p. 233-38, 2006.
- OGBUREKE, K. U.; FISHER, L. W. SIBLING expression patterns in duct epithelia reflect the degree of metabolic activity. **J. Histochem. Cytochem**, Baltimore, v. 55, n. 4, p. 403-9, 2007.
- PEREIRA, J. C.; NETTO, C. A.; GONÇALVES, S. A. **Dentística: Uma Abordagem**

Multidisciplinar. São Paulo: Artes Médicas, 2014. 480 p.

TANNURE, P. N. et al. MMP13 polymorphism decreases risk for dental caries. **Caries Res.**, Basel, v. 46, n. 4, p. 401-7, 2012.

VIDAL, C. M. P. **Estudo da Atividade Proteolítica da Dentina Humana Sadia e Cariada.** 2012. 161 f. Tese(Doutorado em Materiais Dentários) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2012.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ. Res.**, Baltimore, v. 92, n. 8, p. 827-39, May 2003.