

FACULDADE IMED
CURSO DE ODONTOLOGIA

DEBORA CORONETTI

**EFEITO DO FLUORETO DE SÓDIO 2% NA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE
GELATINOLÍTICA SALIVAR *IN VIVO*.**

PASSO FUNDO

2018

DEBORA CORONETTI

**EFEITO DO FLUORETO DE SÓDIO 2% NA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE
GELATINOLÍTICA SALIVAR *IN VIVO*.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado pela acadêmica de Odontologia Debora Coronetti, da Faculdade IMED, como requisito para a obtenção de grau em Odontologia.

PASSO FUNDO

2018

DEBORA CORONETTI

**EFEITO DO FLUORETO DE SÓDIO 2% NA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE
GELATINOLÍTICA SALIVAR *IN VIVO*.**

Orientador:

Prof. Dr.: Rodrigo Varella de Carvalho

PASSO FUNDO

2018

APRESENTAÇÃO

Acadêmica: Debora Coronetti

Nome: Debora Coronetti

E-mail: dehcoronetti@gmail.com

Telefone: Celular: (054) 99911-4681

Área de Concentração: Clínica odontológica.

Linha de Pesquisa: Propriedades físicas e biológicas dos materiais odontológicos e das estruturas dentais.

Orientador:

Nome: Rodrigo Varella de Carvalho

E-mail: rodrigo.carvalho@imed.edu.br

Telefones: Celular: (54) 98116-2015

DEDICATÓRIA

Dedico imensamente e com muito amor este trabalho aos meus pais Adagir Coronetti, Ana Borilli Coronetti, por serem os maiores exemplos da minha vida, principalmente durante toda a caminhada, por me apoiarem em todas as decisões, me darem forças para sempre seguir em frente independente das dificuldades, pela compreensão e por sempre apostarem e acreditarem em mim, por batalharem a cada dia mais para fazer com que meu sonho se tornasse realidade.

Aos meus irmãos Loeri, Rodrigo, por sempre estarem ao meu lado, me apoiarem e ampararem sempre que precisei, e aos meus sobrinhos Bruna, João Matias, Gustavo e Ana Isabela por alegrarem minha vida, nos momentos mais difíceis.

Á vocês, que são as pessoas mais importantes da minha vida, agradeço profundamente e lhes dedico o resultado deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por sempre me guiar e iluminar, por me dar forças e coragem para seguir em frente, por não me deixar desistir nos momentos de dificuldade e poder alcançar todos os meus objetivos.

*Agradeço de forma especial ao meu pai **Adagir Coronetti** e à minha mãe **Ana Borilli Coronetti**, por entenderem a minha ausência diária, pelo amor, pelo incentivo, pelo apoio incondicional, pela paciência e por seus ensinamentos. Por não medirem esforços, muitas vezes deixando de realizar seus próprios sonhos para que eu pudesse levar meus estudos adiante e chegar onde cheguei. Obrigada por terem sido esses heróis, sempre me apoiando e incentivando nas horas difíceis de desânimo e de cansaço. Agradeço pelos sacrifícios que vocês fizeram em razão da minha educação e dos meus irmãos. Quero que saibam que apesar das dificuldades, da distância e da saudade, serei sempre muito grata à vocês e a todo o amor que sempre me deram.*

Em especial a minha mãe que sempre me deu forças e sempre me fez colocar os estudos em primeiro lugar, que sempre acendia sua vela para que eu fosse bem nas provas e trabalhos, que mesmo após ter partido me manda forças e sei que me acompanha por onde eu for, sem isso seria impossível seguir em frente nessa caminhada. Minha imensa gratidão por ti e pelo teu amor. Saudades eternas! Ao meu pai que sempre me deu apoio, mas que hoje me ampara de ambos os lados, sendo pai e mãe, sempre me dando muita força, mas mais ainda desde que perdemos a mãe. Sem suas palavras, abraços e calma não conseguiria seguir em frente. Gratidão infinita por ser filha de vocês! Hoje nós comemoramos essa vitória. Essa conquista que também é de vocês.

*Aos meus irmãos **Loeri** e **Rodrigo** por sempre torcerem por mim e me apoiarem em todas as decisões, por sempre estarem ao meu lado, apesar da distância diária, por me ampararem nos momentos mais difíceis e por nunca me deixarem desistir. Essa conquista não seria possível se não fossem vocês. Em especial a minha irmã **Loeri**, que a um ano (desde que perdemos nossa mãe) se tornou uma mãe pra mim e está do meu lado para tudo e em todos os momentos, sem todo seu amor e apoio não conseguiria seguir em frente.*

*Aos meus cunhados **André** e **Marilene**, por sempre estarem do meu lado, me apoiando e compartilhando dos meus sonhos e conquistas.*

*Aos meus sobrinhos **Bruna, João Matias, Gustavo e Ana Isabela**, por serem minha maior alegria, por sempre me esperarem voltar pra casa com um sorriso no rosto e um abraço apertado, por me ajudarem a superar a saudade de casa e por me fazerem lembrar que muitas vezes não precisamos levar a vida tão a sério, gratidão por vocês terem nos escolhido, vocês sem dúvida nos dão forças para seguirmos em frente.*

*Gratidão à minha amiga/irmã **Débora Oliboni**, que compartilhou comigo desde o início dessa jornada, 24 horas por dia, foram anos de muito companheirismo e cumplicidade, onde aprendemos uma com a outra, erramos juntas e crescemos juntas também. Vivíamos grudadas, tanto que, chegar na aula ou em qualquer lugar sozinha já era motivo de questionamento dos professores e amigos. Sempre compartilhamos conhecimentos com o maior prazer, quantos resumos trocados, quantas noites viradas estudando... a gente sempre vibrou e se desesperou juntas também. Esse último ano, foi sem dúvida o mais intenso de todos, onde nos aproximamos mais do que nunca e nossa irmandade virou realmente pra vida toda, curtimos cada dia do nosso jeito, e que jeito! Gratidão por todas as conversas, desabafos e pelas risadas, enfim, sou imensamente grata por ter ganhado muito mais que uma amiga e sim uma irmã.*

*Agradeço à minha amiga **Luana Boschi** que se tornou uma das maiores e melhores amigas que poderia ter, onde compartilhamos de muitos momentos juntas, estudos, alegrias, festas, e quantas festas hein?! Obrigada pelas experiências trocadas, conversas e conselhos, pelas risadas. Ela que em muitas ocasiões foi capaz de me ouvir e, igualmente, dizer palavras de conforto e de estímulo, foi companheira e amiga de todas as horas e que vai continuar presente em minha vida, com certeza. Espero que nossa amizade dure para sempre.*

***Débora e Luana** vocês foram essenciais e eu agradeço a Deus por ter me dado as melhores amigas parceiras nesses quatro anos. Olha só, nossa história não termina aqui hein?! Eu amo muito vocês!*

*À minhas amigas e companheiras de todas as horas **Rafaella Stein e Hyllua Hamad**, obrigada por estarem comigo em todos os momentos dessa jornada, mesmo longe, ouvindo minhas conquistas, alegrias e meus desabafos, agradeço de coração e imensamente à amizade de vocês.*

À **Emanuela Gavioli**, mestranda do curso de Odontologia, agradeço por sempre me ajudar, tirando dúvidas e me ouvindo nos momentos de desespero quando o TCC não seguia como planejado, por todas as dicas e sugestões para aprimorar o trabalho.

Agradeço às minhas **colegas e amigas** por aceitarem ser voluntárias do trabalho, sem vocês não conseguiria concretizar o mesmo.

Ao meu professor e orientador **Dr. Rodrigo de Carvalho Varella** por toda a ajuda prestada, por compartilhar seu conhecimento e sua experiência, obrigada por tudo, sem você não teria sido possível concretizar esse trabalho, e muito menos meu sonho.

A **todos os professores do curso**, que sempre transmitiram suas experiências e sua sabedoria, pelo carinho, paciência, pela dedicação e pelo entusiasmo demonstrado ao longo da graduação. Por nos ensinarem além das teorias e técnicas, acima de tudo a termos caráter para sermos pessoas melhores.

Aos **futuros colegas de profissão**, que nesses quatro anos, se tornaram amigos que levarei por toda a vida comigo, foram aqueles com quem compartilhei experiências, risadas, festas, muitos momentos bons e momentos em que foram necessários um ombro amigo. Além disso, agradeço por compartilharem do mais importante ensinamento, que é o saber aprender a viver e conviver com as diferenças. O mundo nos espera de braços abertos!

Agradeço ao **curso de Odontologia** e à **Faculdade IMED** que me proporcionou nesses quatro anos de formação a chance de expandir os meus horizontes.

Por fim, minha gratidão a todos os que colaboraram de uma forma ou outra para a concretização de mais esse grande sonho. Meus sinceros agradecimentos.

*“Faça o teu melhor, na condição que você tem,
enquanto você não tem condições melhores,
para fazer melhor ainda!...”*

(Mário Sérgio Cortella)

RESUMO

Metaloproteinases da Matriz (MMPs) constituem uma família importante de endopeptidases metalodependentes que são capazes de degradar quase todas as matrizes extracelulares (MEC). Possuem papel importante na remodelação tecidual (normal ou patológica), migração celular (normais ou malignas), cicatrização de feridas e formação do esmalte dentário. O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão das metaloproteinases 2 e 9 na saliva de pacientes antes e após o uso de fluoreto de sódio 2% (NaF). Se trata de um ensaio clínico exploratório, onde foram avaliadas e comparadas as expressões das MMP-2 e MMP-9 derivadas da saliva total de 4 pacientes saudáveis antes e após o uso do fluoreto de sódio 2% (NaF). As amostras foram obtidas de alunos do VIII nível do curso de Odontologia, com idade entre 20 e 23 anos, sem sinais clínicos de atividade de cárie. Os voluntários foram orientados a não escovar os dentes, ou usar qualquer produto enxaguatório duas horas antes da coleta, que foi realizada na Clínica Odontológica da Faculdade IMED. A saliva total estimulada, após cada período experimental, (T1) e (T2), foi coletada em frascos estéreis e levada em recipiente refrigerado para o início do seu processamento. Cada amostra de saliva foi primeiramente agitada em vórtex por três minutos, mantida sempre sob refrigeração e congeladas até o momento do seu processamento para os ensaios por zimografia. A expressão e atividade das enzimas, representada por regiões claras no gel de poliacrilamida, foram quantificadas com o software ImageJ e os dados foram submetidos ao teste T pareado ($p < 0,05$). Após essas análises comparativas, foi verificado se houve eficácia do fluoreto de sódio na expressão das metaloproteinases 2 e 9 na saliva de pacientes após o uso do NaF. As MMPs 2 e 9 foram detectadas na saliva nos dois momentos de coleta T1 e T2. Foi possível observar uma maior expressão da MMP-9, quando comparada à MMP-2, nos dois tempos avaliados. Foi observado que a expressão da MMP-9 foi inibida no T2, quando comparada ao T1 ($p = 0,027$). Portanto, conclui-se que o NaF se mostrou eficaz na inibição da atividade gelatinolítica salivar *in vivo*.

Palavras-chave: Metaloproteinases da Matriz. Saliva. Fluoreto de sódio. Eletroforese em gel de poliacrilamida.

ABSTRACT

Matrix metalloproteinases (MMPs) constitute an important family of metal-dependent endopeptidases that are able to degrade almost all, if not all, extracellular matrices (ECMs). They have an important role in tissue remodeling (normal or pathological), cell migration (normal or malignant), wound healing and tooth enamel formation. The present study aimed to evaluate the expression of metalloproteinases 2 and 9 in the saliva of patients before and after the use of 2% sodium fluoride (NaF). This is an exploratory clinical trial, where the expressions of MMP-2 and MMP-9 derived from the total saliva of 4 healthy patients were evaluated and compared before and after the use of 2% sodium fluoride (NaF). The samples were obtained from eighth grade students of the Odontology course, aged 20 to 23 years, with no clinical signs of caries activity. The volunteers were instructed not to brush their teeth, or to use any rinse product two hours prior to collection, which was performed at the Dental Clinic of the IMED Faculty. The stimulated total saliva, after each experimental period, (T1) and (T2), was collected in sterile bottles and taken in a refrigerated container for the beginning of its processing. Each saliva sample was first vortexed for three minutes, kept continuously under refrigeration, and frozen until the time of its processing for zymography assays. Expression and activity of the enzymes, represented by clear regions in the polyacrylamide gel, were quantified with the ImageJ software and the data were submitted to paired T-test ($p < 0.05$). After these comparative analyzes, it was verified whether there was efficacy of sodium fluoride in the expression of metalloproteinases 2 and 9 in the saliva of patients after the use of NaF. MMPs 2 and 9 were detected in the saliva at the two collection moments T1 and T2. It was possible to observe a greater expression of MMP-9, when compared to MMP-2, in the two evaluated times. It was observed that MMP-9 expression was inhibited in T2 as compared to T1 ($p = 0.027$). Therefore, it is concluded that NaF has been shown to be effective in inhibiting salivary gelatinolytic activity *in vivo*.

Key Words: Matrix Metalloproteinases. Saliva. Sodium fluoride. Polyacrylamide gel electrophoresis..

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3	OBJETIVOS.....	22
4	METODOLOGIA.....	23
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	23
4.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	23
4.3	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	24
4.4	COLETA E AMOSTRA DOS DADOS.....	24
5	RESULTADOS.....	26
5.1	ANÁLISE DESCRITIVA DOS DADOS.....	26
5.2	ANÁLISE INFERENCIAL DOS DADOS.....	27
6	DISCUSSÃO.....	28
7	CONCLUSÃO.....	31
	REFERÊNCIAS.....	
	APÊNDICES.....	
	ANEXOS.....	

1 INTRODUÇÃO

Metaloproteinases da Matriz (MMPs) constituem uma família importante de endopeptidases metalodependentes que são capazes de degradar quase todas, se não todas as matrizes extracelulares (MEC). Possuem papel importante na remodelação tecidual (normal ou patológica), migração celular (normais ou malignas), cicatrização de feridas e formação do esmalte dentário (HANNAS et al., 2007). Elas necessitam de ativação para causar degradação, pois são secretadas como precursores inativos, podem ser ativadas por diversos fatores, como fatores de crescimento, agentes químicos, forças mecânicas e inclusive baixo pH, mas necessitam da neutralização deste ambiente para exercer degradação. (TJÄDERHANE et al., 1998). Atualmente são descritas 24 tipos de MMPs, sendo que 23 delas foram identificadas em humanos. Cada uma é capaz de degradar um determinado tipo de substrato e assim surgiram nomenclaturas específicas baseadas no tipo de substrato de ação, como as colagenases (MMP 1, 8, 13, 18), que têm a capacidade de degradar fibrilas intactas de colágeno, e as gelatinases (MMP 2 e 9) que têm a capacidade de degradar colágeno desnaturado (gelatina) (HANNAS et al., 2007).

Certas MMPs são identificadas em estruturas dentárias e saliva humana e têm diferentes papéis na formação e manutenção do complexo dentino-pulpar. Também possuem papel fundamental na progressão de cárie (SULKALA et al., 2001) e erosão dentinária (BUZALAF et al., 2012) devido à degradação do colágeno da dentina desmineralizada (MMP 2, 8, 9). Estão envolvidas ainda na formação do esmalte e na fluorose (MMP 2, 20), na remodelação da matriz orgânica dentinária (MMP 2, 8, 9), têm sido identificadas tanto em processos inflamatórios na região pulpar e periapical, em doenças periodontais (HANNAS et al., 2007) e na degradação da matriz de colágeno em regiões de restaurações que não foram completamente infiltradas (TJÄDERHANE et al., 2013), nas metástases em alguns tipos de tumores e nas desordens da articulação temporomandibular. As MMPs são necessárias para remover as proteínas da matriz de esmalte durante a sua maturação, resultando em um tecido altamente mineralizado,

também são fundamentais na formação e na mineralização dos tecidos dentários, no momento da formação do esmalte e da dentina. (NAVARRO et al., 2006)

Segundo Tjaderhanel et al., (1998) as MMPs do hospedeiro podem estar envolvidas na progressão das lesões de cárie dentária. O processo de cárie dentária envolve a desmineralização de minerais inorgânicos, principalmente hidroxiapatita, por ácidos produzidos por bactérias orais (*Streptococcus mutans* e outros), esta desmineralização ocorre quando o pH na placa dental cai abaixo de 5,5 após a ingestão de açúcar até ser neutralizado por tampões salivares. A desmineralização é seguida pela destruição da matriz orgânica colagenosa da dentina e a degradação da matriz dos tecidos vertebrados é mediada principalmente por proteases pertencentes à família de metaloproteinases da matriz (MMPs).

Segundo Kato et al., (2014) o fluoreto (F) é importante na prevenção da cárie dentária, produzindo um equilíbrio favorável na remodelação e remineralização dos dentes. Quando a cárie afeta a dentina, sua parte mineral é dissolvida e os DOM (matriz orgânica desmineralizada) são expostos à decomposição por enzimas derivadas de bactérias e hospedeiros, como as metaloproteinases de matriz (MMPs). Devido à presença de MMPs degradantes de colágeno na cavidade oral os DOM não podem persistir em lesões cariogênicas. A inibição das MMPs salivares elimina a degradação do DOM exposto ao ácido e reduz a taxa de progressão da cárie da dentina. Entre os compostos do fluoreto disponíveis utilizados em produtos dentários, o fluoreto de sódio (NaF) é o mais utilizado. Mais recentemente, o gel de fluoreto de sódio (NaF) a 1,23% reduziu significativamente a degradação do DOM, isso levou à hipótese de que, além de seu efeito estabelecido no ciclo de desmineralização, o fluoreto poderia também inibir MMPs. O fluoreto de sódio (NaF) diminuiu as atividades de formas pró e ativas de MMPs-2 e -9 humanas salivares e purificadas de uma forma dose-resposta.

Para analisar o papel das MMPs na remodelação de tecidos em condições normais e patológicas, é importante ter métodos de detecção confiáveis. A expressão de MMPs pode ser analisada com várias técnicas, a mais utilizada é a zimografia, que identifica as MMPs pela degradação do seu substrato preferencial e pelo seu peso molecular. Usando esta técnica, pode-se determinar se a MMP está numa forma ativa ou latente. Em conclusão, a zimografia é uma ferramenta valiosa para fins de pesquisa

e para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e terapias para condições patológicas. (BEURDEN; HOFF, 2005). A hipótese nula a ser testada foi a de que não haveria diferença na expressão das MMPs salivares antes e após a aplicação do fluoreto de sódio gel 2% (NaF).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A finalidade de um estudo de Sulkala et al., (2001) foi analisar a inibição de MMPs salivares humanas ativadas por ácido por tetraciclinas quimicamente modificadas não antimicrobianas (CMTs), utilizaram um ensaio de atividade funcional com gelatina marcada como substrato. Para abordar o papel das MMPs na progressão da cárie da fissura in vivo, administraram os inibidores de MMP CMT-3 e zoledronato em ratos jovens por via oral durante 7 semanas, 5 dias por semana. As lesões de cárie foram visualizadas pelo reagente de Schiff em molares mandibulares seccionados sagitalmente. A redução marcada da atividade gelatinolítica das MMPs salivares humanas foi observada com CMT-3. O CMT-3 e o zoledronato, isoladamente e em combinação, também reduziram a progressão da cárie dentinária nos ratos. Estes resultados mostraram que as MMPs tiveram um papel importante na patogênese da cárie da dentina, e que os inibidores de MMP revelaram-se úteis na prevenção da progressão da cárie.

Mazzoni et al. (2007) em uma pesquisa com o objetivo de analisar a hipótese nula de que a MMP-9 não é encontrada na matriz dentinária, já que as metaloproteinases da matriz da dentina (MMPs) podem desempenhar um papel fundamental na cárie dentinária e na degradação das matrizes de dentina coladas a resina. Utilizaram zimografia de gelatina para extrair e isolar todas as formas moleculares de MMPs gelatinolíticas em pó de dentina madura desmineralizada obtido de molares humanos extraídos, caracterizando e identificando as enzimas por Western blotting. Os resultados mostraram que as MMPs gelatinolíticas foram detectadas em extratos de matriz de dentina desmineralizada e foram identificadas como MMP-2 e MMP-9. A sua ativação pôde contribuir para a degradação da matriz dentinária, que ocorreu durante a progressão da cárie e após a ligação da resina. A inibição da atividade proteolítica de MMP-2 e MMP-9 retardaram a progressão da cárie e aumentaram a durabilidade das ligações resina-dentina.

Um outro estudo teve por finalidade avaliar a localização e distribuição de MMP-2 e -9 na matriz orgânica da dentina humana através de microscopia eletrônica de varredura

por emissão de campo (FEISEM) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Os espécimes de dentina foram submetidos a uma técnica de pré-incorporação ou imunomarcação pós-imobilização utilizando anticorpos monoclonais primários anti-MMP-2 e anti-MMP-9 e expostos a um anticorpo secundário conjugado com nanopartículas de ouro. As marcações MMP-2 e MMP-9 foram identificadas na matriz de dentina desmineralizada como partículas de ouro altamente densas em elétrons dispersas nas fibrilas de colágeno. Através da correlação de FEI-SEM / TEM confirmaram que MMP-2 e MMP-9 são componentes endógenos da matriz orgânica da dentina humana e revelaram a relação tridimensional entre estas proteinases e as fibrilas de colágeno, mostrando que ambos os anticorpos produziram um padrão de marcação semelhante. Concluíram então, que MMP-2 e MMP-9 são constituintes intrínsecos da rede fibrilar da matriz orgânica da dentina humana, apoiando a hipótese de que essas enzimas podem desempenhar papéis importantes na degradação da matriz orgânica da dentina. (MAZZONI et al., 2009).

Um estudo teve como objetivo investigar a localização de MMPs em dentina cariada, pois as metaloproteinases na matriz dentinária (MMPs) podem participar da destruição da dentina após a mineralização dos ácidos bacterianos. As secções de cárie dentinária foram congeladas e após preparadas sem desmineralização, sendo imersas em anticorpo monoclonal contra MMP-2, -8, -9 e -20. As secções foram marcadas com IgG conjugado com partículas coloidais de ouro e observadas sob FE-SEM. Os índices de marcação (número de partículas de ouro / 1m^2) da dentina cariada externa e interna, respectivamente, com e sem infecção bacteriana, foram comparados com os da dentina normal. A MMP-2 foi distribuída em dentina cariada e normal, onde observou-se que o nível de MMP-2 não mostrou diferença significativa entre as cáries externas, cárie interna e dentina normal. Os índices de marcação de MMP-8 e MMP-9 diminuíram significativamente na dentina cariada interna em comparação com o nível de dentina normal, mas intensificaram-se novamente na região da cárie externa. O índice de marcação da MMP-20 foi o mais elevado na dentina normal, reduzindo a cárie externa. (SHIMADA et al., 2009).

O objetivo de um outro estudo foi examinar a expressão diferencial da metaloproteinase-2 da matriz (MMP-2) no sulco coronal e radicular humano e em

dentina cariada, utilizando-se a técnica combinada de coloração com tricromo e a técnica de imunofluorescência. Para isso os pré-molares recém extraídos foram fixados com formaldeído, desmineralizados com 10% de EDTA (pH 7,4), desidratados e seccionados para microscopia de luz e imunofluorescência. Metade das seções foram coradas com tricrômico de Masson e examinadas com microscopia de luz para identificar regiões nas partes coronal e radicular dos dentes que continham dentina sadia, afetada por cárie e afetada por cárie. O resto das seções foram hibridizadas com anticorpo primário MMP-2 anti-rato e anticorpo secundário conjugado com FITC. A imunofluorescência do FITC que foi indicativa da distribuição da MMP-2 na dentina coronal e radicular foi analisada por microscopia óptica de fluorescência. A coloração com tricromo revelou uma zona verde de dentina sadia não afetada, regiões irregulares vermelhas de dentina infectada com cárie e regiões rosadas de dentina afetada por cárie. Os sinais de imunofluorescência que foram indicativos da expressão de MMP foram os mais baixos na dentina sadia e os mais intensos na dentina infectada com cárie. A dentina afetada pela cárie apresentou imunorreatividade intermediária. As variações nas intensidades de imunofluorescência corresponderam bem à distribuição da dentina infectada por cárie e afetada por cárie nas seções coradas com tricrômio, tanto para a dentina coronária quanto radicular. Concluíram então que a cárie estimula a expressão de MMP-2, resultando na expressão diferencial desta protease em dentina sadia e afetada por cárie. A expressão mais intensa de MMP-2 em dentina afetada por cárie em comparação com a dentina sadia implica uma degradação mais rápida da camada híbrida quando a dentina afetada por cárie é empregada como substrato para restaurações ligadas. (TOLEDANO et al., 2010).

Nascimento et al., (2011) em um estudo teve como objetivo examinar a presença, fonte e atividade de cisteína catepsinas em cárie humana. A catepsina B foi detectada com imunocoloração. A catepsina de saliva e cisteína dentinária e as atividades de MMP em lesões de cárie foram analisadas espectrofluorometricamente. A imunocoloração demonstrou catepsinas B mais fortes em dentina cariada do que em dentina saudável. Na dentina cariada, a atividade cisteína catepsina aumentou com o aumento da profundidade e idade em lesões crônicas, mas diminuiu com a idade em lesões ativas. A atividade da MMP diminuiu com a idade tanto nas lesões ativas quanto

nas crônicas. As atividades de MMP salivar foram maiores em pacientes com lesões ativas do que crônicas e com aumento da profundidade das lesões, enquanto as atividades de cisteína catepsina não mostraram diferenças. Os resultados indicaram que, juntamente com as MMPs, as catepsinas de cisteína são importantes, especialmente em cárie ativa e profunda.

Sloppo et al., (2012) avaliaram a influência do fluoreto sobre a viabilidade celular e a atividade das metaloproteinases da matriz (MMP) -2 e -9 agregadas por pré-osteoblastos. Os pré-osteoblastos (linha celular murina MC3T3-E1) foram cultivados em suplemento de meio MEM com 10% de soro bovino fetal (FBS) e nucleósidos / ribonucleósidos sem ácido ascórbico. As células aderentes foram tratadas com diferentes concentrações de F (como fluoreto de sódio-NaF) em meio (5×10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M e 10^{-3} M) durante 24, 48, 72 e 96 h a 37°C, 5% de CO₂. As células de controle foram cultivadas somente no MEM. Após cada período, a viabilidade do pré-esqueleto foi avaliada pelo ensaio MTT. As atividades de MMP-2 e -9 foram realizadas por zimografia de gel. Além disso, a atividade de fosfatase alcalina (ALP) foi quantificada por colorimetria em todos os grupos experimentais. Foi demonstrado que as células cultivadas com a dose mais alta de F (10^{-3} M) por 96 h diminuíram a viabilidade do pré-esqueleto, enquanto doses mais baixas de F não a alteraram quando comparadas às células não tratadas. Não foram observadas diferenças na atividade de ALP entre os grupos. Além disso, em comparação com o controle, o tratamento de células com F em baixa dose aumentou ligeiramente as atividades de MMP-2 e -9 após 24 h. Concluiu-se que F modula a viabilidade do pré-esqueleto de forma dependente da dose e também pode regular o remodelamento da matriz extracelular.

Segundo Kato et al. (2014) a importância do fluoreto (F) na prevenção da cárie dentária interferindo favoravelmente nos processos de desmineralização-remineralização está bem estabelecida, portanto, este estudo avaliou a capacidade de fluoreto (F) para inibir as gelatinases humanas salivares e purificadas MMPs-2 e -9. Foi coletada saliva de 10 indivíduos saudáveis e após reunida, foi centrifugada e os sobrenadantes foram incubados durante 1 hora a 37°C e submetidos a zimografia. Adicionaram fluoreto de sódio (50-275 ppm F) ao tampão de incubação, onde a reversibilidade da inibição de MMPs-2 e -9 por NaF foi testada pela adição de NaF

(250-5000 ppm F) ao tampão de incubação, após foi realizado uma incubação adicional na ausência de F. O fluoreto diminuiu as atividades de formas pró e ativas de MMPs humanas salivares e purificadas de uma maneira dose-resposta. As gelatinases purificadas foram completamente inibidas por 200 ppm F (IC₅₀ = 100 e 75 ppm F para MMPs-2 e -9, respectivamente) e MMP-9 salivar por 275 ppm F (IC₅₀ = 200 ppm F). A inibição foi parcialmente reversível a 250-1 500 ppm F, mas foi irreversível a 5 000 ppm F. Este foi o primeiro estudo a descrever a capacidade do NaF de inibir completamente as MMPs.

Segundo Scariot et al. (2014) o flúor presente na pasta de dente a 1.100 µg / g é considerado efetivo no controle de cáries. No entanto, sob alto desafio cariogênico devido ao aumento da exposição ao açúcar, pode ser necessária uma maior concentração de flúor (5.000 µg / g) para compensar o desequilíbrio no processo de cárie. Isso foi testado em um regime de ciclagem de pH, que avaliou o efeito da concentração de flúor em relação à pasta de dente na redução da desmineralização do esmalte em condições de dois níveis de desafio cariogênico. As placas de esmalte (n = 20) foram submetidas a dois regimes de ciclagem de pH, simulando 8x e 16x / dia de exposição ao açúcar e foram tratadas com soluções contendo: 0 (sem flúor), 275 ou 1.250 µg F / mL, resultando em 6 grupos de tratamento : 4-h / 0-F; 8-h / 0-F; 4-h / 275-F; 8-h / 275-F; 4 h / 1,250-F e 8 h / 1,250-F. As concentrações de 275 e 1.250 µg F / mL simulam a diluição salivar da boca quando são utilizadas 1.100 e 5.000 µg / g de pastas dentífricas. A desmineralização do esmalte foi avaliada por superfície (% SHL) e dureza transversal. O flúor absorvido pelo esmalte também foi avaliado. Os dados foram analisados por ANOVA de sentido único e teste de Tukey. O tratamento com 1.250 µg F / mL reduziu significativamente o% SHL comparado com 275 µg F / mL (p <0,05), independentemente do nível de desafio cariogênico (4 h / 1,250-F vs. 4 h / 275-F e 8 -h / 1.250-F vs comparações 8-h / 275-F, respectivamente). Estes dados foram suportados pela concentração de fluoreto encontrada no esmalte. Essas descobertas sugerem que maiores concentrações de flúor podem compensar parcialmente o maior risco de caries sob maior desafio cariogênico devido ao aumento da exposição ao açúcar.

Um estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da NaF na inibição de MMPs e CCs ligados a dentina. Os feixes de dentina foram completamente desmineralizados em

10% de ácido fosfórico. A atividade de MMP total de base e massas secas foram medidas. Os feixes foram atribuídos a grupos de teste com base em atividade de MMP e massa seca ($n = 10$ / grupo) e incubados em saliva artificial (controle) ou saliva artificial com NaF contendo 6-238 m de fluoreto por 1, 7 e 21 dias. A perda de massa seca e as atividades de MMP foram reavaliadas em cada ponto do tempo. A atividade proteolítica foi rastreada por zimografia de gelatina. O ICTP e o CTX liberados para o meio de incubação foram analisados como índices de atividade de MMP e catepsina K, respectivamente. Os feixes foram examinados sob microscopia eletrônica de varredura. Todas as doses de NaF reduziram a perda de massa seca após 21 dias ($p < 0,05$). A inibição de NaF da atividade MMP total variou entre 5 e 80%. Na zimografia de gelatina, as bandas de MMP-2 e MMP-9 tornaram-se menos proeminentes com o aumento dos níveis de NaF. NaF não diminuiu o ICTP liberado ($p > 0,05$). Menos CTX foi detectada com $F \geq 179$ m M ($p < 0,05$). Foram observados minerais semelhantes a CaF_2 nas vigas. Níveis elevados de NaF podem retardar a degradação da matriz da dentina devido à inibição da catepsina K. Através deste estudo, concluíram que o fluoreto não pareceu efetivo na inibição direta da proteólise por MMPs ligadas à matriz dentinária. (ALTINCI et al., 2016).

De acordo com Noronha et al. (2016) o flúor presente na pasta de dente a $1.100 \mu\text{g} / \text{g}$ é considerado efetivo no controle de cáries. No entanto, sob alto desafio cariogênico devido ao aumento da exposição ao açúcar, pode ser necessária uma maior concentração de flúor ($5.000 \mu\text{g} / \text{g}$) para compensar o desequilíbrio no processo de cárie. Isso foi testado em um regime de ciclagem de pH, que avaliou o efeito da concentração de flúor em relação à pasta de dente na redução da desmineralização do esmalte em condições de dois níveis de desafio cariogênico. As placas de esmalte ($n = 20$) foram submetidas a dois regimes de ciclagem de pH, simulando 8x e 16x / dia de exposição ao açúcar e foram tratadas com soluções contendo: 0 (sem flúor), 275 ou $1.250 \mu\text{g} \text{ F} / \text{mL}$, resultando em 6 grupos de tratamento: 4-h / 0-F; 8-h / 0-F; 4-h / 275-F; 8-h / 275-F; 4 h / 1,250-F e 8 h / 1,250-F. As concentrações de 275 e $1.250 \mu\text{g} \text{ F} / \text{mL}$ simularam a diluição salivar da boca quando foram utilizadas 1.100 e $5.000 \mu\text{g} / \text{g}$ de pastas dentífricas. A desmineralização do esmalte foi avaliada por superfície (% SHL) e dureza transversal. O flúor absorvido pelo esmalte também foi avaliado. Os dados

foram analisados por ANOVA de sentido único e teste de Tukey. O tratamento com 1.250 µg F / mL reduziu significativamente o% SHL comparado com 275 µg F / mL ($p < 0,05$), independentemente do nível de desafio cariogênico (4 h / 1,250-F vs. 4 h / 275-F e 8 -h / 1.250-F vs comparações 8-h / 275-F, respectivamente). Estes dados foram suportados pela concentração de fluoreto encontrada no esmalte, que sugeriram que maiores concentrações de flúor podem compensar parcialmente o maior risco de caries sob maior desafio cariogênico devido ao aumento da exposição ao açúcar.

Um outro estudo de Amaral et al., (2018) teve por objetivo avaliar o efeito do pH na ativação de metaloproteinases de matriz (MMPs) de dentina humana coronal (CD) e radicular (RD). CD e RD foram pulverizados em pó e as proteínas foram extraídas com ácido fosfórico a 1%. As proteínas extraídas e o pó desmineralizado foram separadamente incubados nas seguintes soluções: acetato de 4-aminofenilmercúrico (controle) ou uma solução tampão em diferentes pHs (2,5, 4,5, 5,0, 6,0 e 7,0). Após a incubação, as proteínas foram separadas por eletroforese para mensurar as atividades de MMP por zimografia. Para avaliar o colágeno da dentina solubilizado, o pó de dentina desmineralizado foi mantido em tampão de incubação, e a quantidade de hidroxiprolina (HYP) liberada foi medida. A zimografia revelou atividades gelatinolíticas de MMP-2 para CD e RD em todos os grupos experimentais. Para ambos os substratos, as menores concentrações de pH (2,5, 4,5 e 5,0) produziram maior atividade gelatinolítica do que as obtidas pelas soluções de pH mais altas (6,0 e 7,0). Para análise de HYP, não foram observados valores de absorvância detectáveis para pHs de 2,5 e 4,5. A quantidade de HYP foi maior para pH 7,0 do que para todos os outros grupos ($p < 0,05$), exceto para pH 6,0. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os pHs 6,0 e 5,0 e controle ($p > 0,05$). A enzima MMP-2 da CD e RD humanas é dinamicamente influenciada pelo pH: em pH baixo, a enzima extraída ativa essa forma latente, enquanto a degradação do colágeno pela enzima ligada à matriz é observada apenas quando os pHs estão próximos do neutro.

3 OBJETIVOS

Investigar a capacidade de modulação da expressão da MMP-2 e MMP-9 salivares pelo uso de fluoreto de sódio 2% em pacientes sadios.

4 METODOLOGIA

O presente estudo está de acordo com a Resolução CNS/CONEP 466/12, onde foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade IMED – CEP/IMED e foi aprovado sob o número 2.249.269 (anexo B).

Um Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (apêndice A) foram apresentados aos voluntários da pesquisa e solicitado sua devida assinatura, a fim de confirmar a compreensão e a liberação da participação no presente estudo.

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este estudo teve uma abordagem quantitativa e foi um ensaio clínico exploratório, onde foram avaliadas e comparadas as expressões das MMP-2 e MMP-9 derivadas da saliva total de pacientes saudáveis, antes e após o uso de fluoreto de sódio 2% (NaF).

O estudo incluiu 4 voluntários do sexo feminino, com idade entre 20 a 23 anos, que foram convidados a participar do estudo a partir de contato direto e através do Termo de Consentimento Livre Esclarecido, na clínica Odontológica da Faculdade IMED.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Voluntários saudáveis com idade entre 20 e 23 anos, estudantes do VIII nível de Odontologia da Faculdade IMED, que foram convidados a participar do estudo.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Voluntários que apresentavam algum sinal clínico de doença periodontal ou cárie dentária.

4.4 COLETA DAS AMOSTRAS DE SALIVA PARA ANÁLISE POR ZIMOGRÁFIA

Antes da aplicação do fluoreto de sódio 2% as pacientes receberam um papel parafinado para estimular o fluxo salivar por 5 minutos (T1), a primeira saliva estimulada foi descartada, sendo estimulada novamente e coletada em tubos de falcon estéreis com auxílio de um funil. Para a coleta de T2, os pacientes foram submetidos a aplicação do produto com moldeiras superior e inferior por 1 minuto, após a remoção do mesmo, foram orientados a descartar a primeira saliva, sendo assim feita uma nova coleta da saliva estimulada com papel parafinado após essa aplicação (T2). As coletas foram levadas em recipientes sob refrigeração para o início do processamento.

Cada amostra de saliva foi primeiramente agitada em vórtex por três minutos, mantida sempre sob refrigeração. Após isto, as alíquotas de saliva foram levadas a freezer -20°C (Freezer Indrel/ IULT 335D), e congeladas até o momento do seu processamento para os ensaios por zimografia (KATO et al., 2014).

Depois de descongeladas, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi separado e armazenado em novos tubos de microcentrífuga, descartando-se o precipitado. O sobrenadante foi então levado ao banho-maria (Biopar, Mod BM 03) a 37°C por 30 minutos. Depois de decorridos os primeiros 5 minutos, as amostras foram levemente agitadas. Após 30 minutos, as amostras foram novamente congeladas (-20°C) (até o momento da análise proteica quantitativa). Para a utilização da mesma massa proteica, foi realizada a quantificação de proteínas em todas as amostras estudadas pelo método de Bradford.

ZIMOGRAFIA

As devidas concentrações das amostras de saliva foram acrescidas aos volumes de tampão não redutor 4X concentrado, de tal forma que a mesma concentração proteica foi mantida para todas as amostras. As amostras foram misturadas ao tampão não redutor e incubadas por duas horas à temperatura de 26°C até o momento de sua inserção. Após o período de incubação, as amostras foram delicadamente injetadas nos poços, com o auxílio de uma micropipeta.

Neste ensaio as devidas concentrações das amostras de saliva total de cada voluntário, foram misturadas numa proporção 5:1 em volume, em tampão não redutor (2% Dodecil sulfato de sódio (SDS); 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% Glicerol, e 0.001% Azul de bromofenol), de tal forma que a mesma concentração proteica foi mantida para todas as amostras. A seguir, as alíquotas foram incubadas por duas horas à temperatura de 26°C até o momento de sua inserção nos poços, e feita a eletroforese, a 110V. Para a certificação de que as proteínas avaliadas são MMPs, um gel foi incubado em 0,5 mM de EDTA (ácidoetilenodiaminotetracético- Synth), um conhecido e poderoso inibidor de MMPs. Também foi usado um padrão de peso molecular de baixos intervalos SDS-PAGE (BenchMarkProteinLadderTM, Cat 10747-012). Adicionalmente, enzimas recombinantes, MMP-2 (ChemiconInternational, Temecula, EUA) e MMP-9 (InvitexGmbH, Berlim, Alemanha) foram carregadas no gel utilizando 2µL de cada MMP, como controles positivos. Após, os géis foram lavados duas vezes em 2% Triton X-100 por 60 min em temperatura ambiente. Cada gel foi incubado a 37°C por overnight (19 h) em tampão 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, contendo 5 mM CaCl₂ (Tris- CaCl₂). Por fim os géis foram corados com 0,2% Azul de comassie R-250 e descorados com solução aquosa de 10% Ácido acético e 10% Metanol. As atividades enzimáticas foram detectadas como bandas não coradas nos géis. Estas bandas foram escaneadas, digitalizadas e analisadas com o programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

5 RESULTADOS

A expressão e atividade das enzimas, representada por regiões claras no gel de poliacrilamida, foi quantificada a partir do uso do software ImageJ. Assim, os dados foram submetidos a Análise de Variância, e as mesmas foram realizadas com nível de significância de $p < 0,05$.

5.1 ANÁLISE DESCRITIVA DOS DADOS

Foram identificadas a presença das MMPs 9 e 2 nas bandas claras do gel, que correspondem a atividade (ativação e inibição) das enzimas em cada paciente. Na Figura 1, pode-se observar que em todas as pacientes, no T2 em comparação com o T1 houve certa inibição da atividade das enzimas quando observadas as regiões claras no gel.

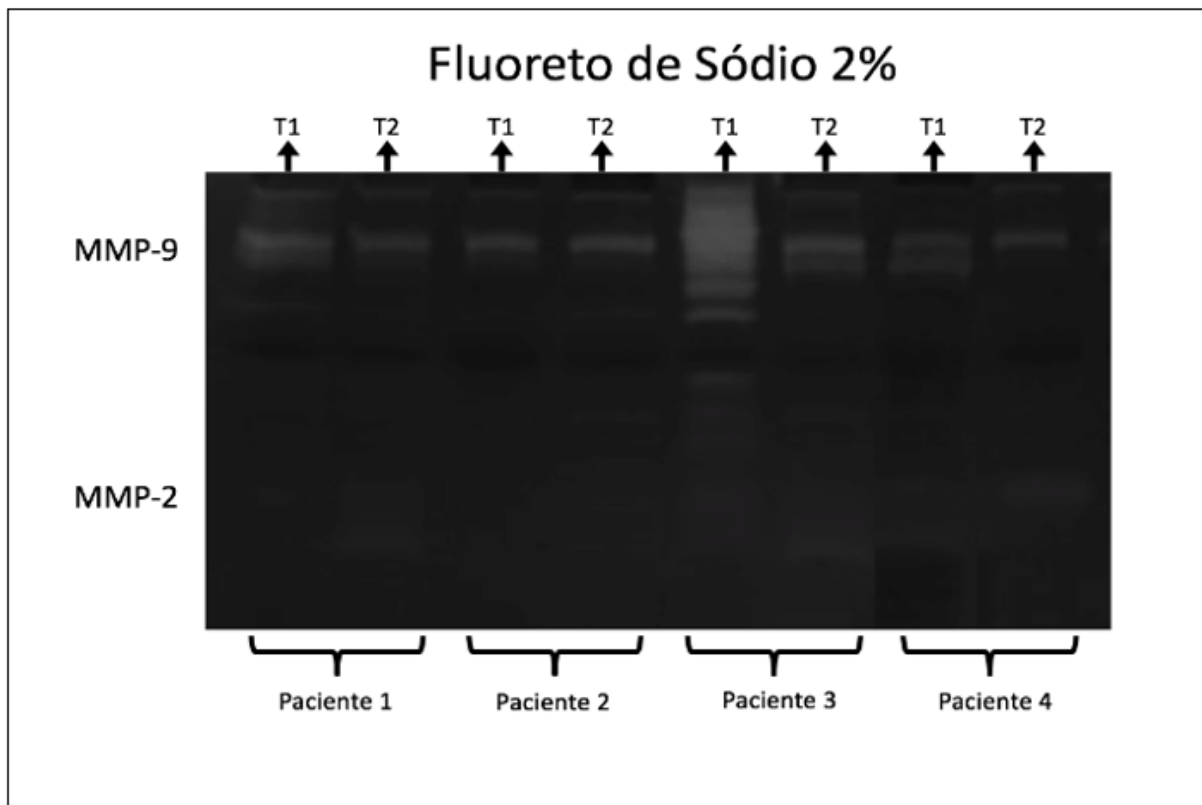


Figura 1 – O efeito do fluoreto de sódio 2% na atividade da MMP-2 e MMP-9.

5.2 ANÁLISE INFERENCIAL DOS DADOS

A MMP-9 foi a enzima mais expressa na saliva dos voluntários (Figura 1). Para a saliva obtida no T2 foi observada uma inibição estatisticamente significativa na expressão e atividade das gelatinases ($p=0,027$).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo inicialmente foi realizado para testar a hipótese nula de que o fluoreto de sódio 2% (NaF) não seria capaz de inibir as MMPs salivares. Porém, os resultados obtidos neste estudo exploratório demonstram que a aplicação do NaF gel com moldeira por 1 minuto, foi capaz de inibir a atividade enzimática das gelatinases salivares, tanto da MMP-2 como da MMP-9. De acordo com isso, os resultados sugerem que o fluoreto pode ser importante na prevenção da cárie dentária, não só por produzir um equilíbrio favorável na remodelação e remineralização dentária, mas também por inibir as MMPs salivares e hipoteticamente diminuir a degradação do colágeno dentinário (KATO et al., 2014). Tjaderhanel et al., (1998) relatou que as MMPs têm sido estudadas nesses processos, pois podem estar envolvidas na progressão das lesões de cárie em dentina, já que após a desmineralização da porção inorgânica a matriz orgânica dentinária formada por colágeno é degradada também pelas MMPs, devido à alguns ácidos bacterianos. As MMPs também demonstraram estar presentes em vários outros processos que ocorrem na dentina, tal como na maturação durante o envelhecimento, formação de calcificação da dentina intratubular e intertubular

A MMP-2 e MMP-9 salivares foram identificadas em lesões de dentina amolecida, sendo detectadas em ambas suas formas, latentes e ativas, sendo que em geral a MMP-9 parece ser a enzima gelatinolítica predominante nas lesões de cáries ativas em dentina, sendo ativada pelo baixo pH e seguida pela neutralização (TJADERHANE et al., 1998). Segundo Mazzoni et al., (2007) a MMP-2 é a mais abundante identificada na dentina humana, seguida pela MMP-9. Por outro lado, na saliva humana ocorre exatamente o contrário, com uma maior atividade da MMP-9, seguida pela MMP-2, assim como foi demonstrado em nosso estudo também. A grande elucidação sobre a participação das MMPs na progressão da cárie dentária foi estabelecida quando Tjaderhane et al., (1998) demonstraram que estas enzimas latentes funcionam quando ativadas em condições semelhantes à cárie dentária (pH 4,5 seguido de neutralização). Estes períodos alternados de desmineralização e remineralização resultaram na exposição das fibras colágenas da matriz orgânica

dentinária, que foram então degradadas por MMP, onde a zimografia revelou atividades gelatinolíticas de MMP-2, confirmando a hipótese de que pH pode ter relevância na ativação de MMPs, (AMARAL et al., 2018)

Mazzoni et al., (2007) utilizou zimografia de gelatina para analisar a hipótese nula de que a MMP-9 não é encontrada na matriz dentinária, no entanto identificou a presença das formas MMP-2 e -9 dentro da matriz dentinária humana, mostrando a rejeição da hipótese nula de que a matriz dentinária normal não contém MMP-9. Assim, tanto MMP-2 endógena e -9 estão presentes em formas latentes (como pró enzimas) em dentes sólidos maduros, e que sua ativação pôde contribuir para a degradação da matriz dentinária. Em um outro estudo Mazzoni et al., (2009) através da correlação de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEISEM) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM) confirmaram que MMP-2 e MMP-9 são constituintes intrínsecos da rede fibrilar da matriz orgânica da dentina humana, apoiando a hipótese de que essas enzimas podem desempenhar papéis importantes na degradação da matriz orgânica da dentina.

Kato et al., (2014) encontraram resultados semelhantes ao nosso estudo, pois o fluoreto de sódio foi capaz de inibir completamente as gelatinases salivares. No entanto, foi utilizada uma estratégia em que um *pool* salivar de 10 pacientes foi submetido a diferentes concentrações de fluoreto de sódio. Esta estratégia difere da proposta em nosso estudo, já que nossos pacientes utilizaram o flúor em moldeiras e depois a saliva era coletada. Isso foi realizado para aproximar a metodologia do estudo ao uso clínico do fluoreto avaliado. As gelatinases MMP-2 e 9 purificadas foram completamente inibidas por 200 ppm F, no entanto, este estudo verificou também relação às experiências de reversibilidade, a incubação adicional dos géis na ausência de F, onde demonstrou que a inibição de MMPs-2 e 9 por NaF é parcialmente reversível em concentrações de F entre 250 e 1500 ppm F, mas é irreversível a 5000 ppm F.

Já Slompo et al., (2012) avaliou a influência do fluoreto com diferentes concentrações sobre a viabilidade celular e a atividade das metaloproteinases da matriz MMP-2 e -9 agregadas por pré-osteoblastos, onde constatou que no tratamento de células com F em baixa dose aumentou ligeiramente as atividades de MMP-2 e -9 após 24 h, concluindo assim que o F pode regular o remodelamento da matriz extracelular.

Nascimento et al., (2011) encontraram atividade significativamente maior das MMPs salivares em pacientes com lesões ativas de cárie, quando comparados com pacientes com lesões inativas. Também, em pacientes com lesões de cárie profundas a atividade das MMPs salivares foi maior, corroborando com o estudo de que as MMPs podem participar da patogênese das lesões de cárie em dentina. Esta hipótese é devido aos resultados de alguns estudos anteriores que demonstraram a degradação do colágeno dentinário exposto por MMPs salivares e ainda, a diminuição na progressão da cárie em dentina por inibidores de MMPs, administrados localmente. Com isso a inibição das MMPs por inibidores sintéticos potentes e seletivos, torna-se uma meta viável para a prevenção da doença cárie.

Portanto, estes achados podem servir como base para futuras pesquisas no desenvolvimento de produtos que, em conjunto com outros inibidores de MMPs usados na cavidade bucal, possam influenciar na diminuição da expressão das MMPs salivares e assim influenciarem na degradação da matriz orgânica dentinária em casos de cárie e erosão.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que a MMP-9 foi a enzima presente em maior quantidade na saliva dos pacientes e que o fluoreto de sódio 2% (NaF) se mostrou eficaz na inibição da atividade gelatinolítica salivar *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ALTINCI, P. et al. NaF Inhibits Matrix-Bound Cathepsin-Mediated Dentin Matrix Degradation, **Rev Caries Res**, v.50, p.124–132, Mar./ 2016.
- AMARAL, S. F. et al. Dynamic Influence of pH on Metalloproteinase Activity in Human Coronal and Radicular Dentin, **Rev Caries Res**, v.52, p.113-118, Jan./2018.
- BEURDEN, S. V. P. A., HOFF, V. W. J. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors, **Rev BioTechniques**, v.38, n.1, p.73-83, Jan./2005.
- BUZALAF, M. A., KATO, M. T., HANNAS, A. R. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion, **Adv Dent Res**, v.24 n.2 p.72-76, 2012.
- HANNAS, A. R. et al. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment, **Rev Acta Odontol Scand**, v.65 n.1 p.01-13, 2007
- KATO, M. T. et al. Sodium Fluoride Inhibits MMP-2 and MMP-9, **J Dent Res**, v.93, n.1, p.74-77, Oct./2014.
- MAZZONI, A. et al. Zymographic Analysis and Characterization of MMP-2 and -9 Forms in Human Sound Dentin, **J Dent Res**, v.86, n.5, p.436-440, Dec./2007.
- MAZZONI, A. et al. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: Correlative FEI-SEM/TEM analysis, **J Biomed Mater Res**, v.88A, p.697–703, Mar./2009.
- NASCIMENTO, F. D. et al. Cysteine Cathepsins in Human Carious Dentin, **J Dent Res**, v.90, n.4, p.506-511, 2011.
- NAVARRO, P. V. et al. A participação das metaloproteinases da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal, **Rev de Odontologia da UNESP**, v.35, n.4, p.233-238, São Paulo, 2006.
- NORONHA, M. S. et al. Effect of Fluoride Concentration on Reduction of Enamel Demineralization According to the Cariogenic Challenge, **Brazilian Dental Journal**, v.27, n.4, p.393-398, 2016.
- SHIMADA, Y. et al. Localization of matrix metalloproteinases (MMPs-2, 8, 9 and 20) in normal and carious dentine, **Australian Dental Journal**, v.54, p.347–354, Mar./2009.
- SCARIOT, R. et al. Correlation Between Radiographic Area and Immunolocation of MMP - 2 and MMP - 9 in Unilocular Radiographic Lesions, **Brazilian Dental Journal**, v.25, n.6, p.466-471, 2014.

SULKALA, M. et al. The Effects of MMP Inhibitors on Human Salivary MMP Activity and Caries Progression in Rats, **J Dent Res**, v.80, n.6, p.1545-1549, Mar./2001.

SLOMPO, C. et al. Fluoride Modulates Preosteoblasts Viability and Matrix Metalloproteinases-2 and -9 Activities, **Braz Dent J**, v.23, n.6, p.629-634, 2012.

TJADERHANE, L. et al. The Activation and Function of Host Matrix Metalloproteinases in Dentin, **J Dent Res** v.77 n.8, p.1622-1629, Aug./1998.

TJADERHANE L. et al., Optimizing dentin bond durability: Control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins, **Dent Mater**, v.29, n.1, p.116-135, 2013.

TOLEDANO M. et al. Differential expression of matrix metalloproteinase-2 in human coronal and radicular sound and carious dentine, **J Of Dentistry**, v.38, p.635-640, 2010.

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezada Sr.(a)._____

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa que estamos desenvolvendo na Clínica Odontológica da Faculdade IMED. Nosso estudo visa avaliar a influência da doença cárie na saliva de voluntários com idade entre 20 e 23 anos. O título da nossa pesquisa é, **EFEITO DO FLUORETO DE SÓDIO 2% NA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA SALIVAR *IN VIVO***, e será realizado sob a responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Rodrigo Varella de Carvalho.

Serão realizadas duas coletas da sua saliva, antes e após a aplicação de fluoreto de sódio 0,2%. No momento da coleta de saliva pedimos para o você mastigar por um minuto um pedaço de parafina e cuspir em um recipiente para o armazenamento. Esse é um procedimento realizado rotineiramente, e não causa nenhum dano. Porém, se o você sentir algum desconforto na coleta de saliva, o será convidado a fazer o procedimento em um consultório separado localizado no terceiro andar da Faculdade IMED, onde é realizado o atendimento individual dos pacientes.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada. É importante esclarecer que não haverá nenhum custo pela participação no estudo e não será disponibilizada nenhuma compensação financeira adicional. No entanto, a sua participação irá contribuir muito para o desenvolvimento desta pesquisa e na construção deste conhecimento.

Este estudo apresenta como benefício direto para os pacientes com doença cárie a possibilidade de tratamento odontológico nas dependências da Faculdade IMED,

lembrando que se o Sr.(a) se recusar a participar da pesquisa, o(a) mesmo(a) será igualmente atendido(a), sem qualquer prejuízo para o plano de tratamento.

Os riscos para o paciente serão mínimos, já que os protocolos propostos no estudo são comumente utilizados na odontologia. No entanto, pacientes que sentirem desconforto relacionado ao uso do fluoreto de sódio serão instruídos a abandonar o estudo.

Pedimos a sua assinatura neste consentimento, para a participação de no estudo e para confirmar a sua compreensão em relação a este convite, e a sua disposição a contribuir na realização deste trabalho, em concordância com a Resolução CNS número 466/12 que regulamenta a realização de pesquisa envolvendo seres humanos.

Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você.

Estaremos sempre à disposição para esclarecimentos acerca dos assuntos relacionados ao estudo e para qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com: **Rodrigo de Carvalho Varella** ;Faculdadelmed – Rua Senador Pinheiro, 304 – Passo Fundo- RS; e-mail: cep@imed.edu.br ; Fone: 54 3045 90 18

Poderá também entrar com contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade Meridional de Passo Fundo: Rua Senador Pinheiro, 304 – Bairro Cruzeiro – Passo Fundo, RS, CEP: 99070-220; Fone: 54- 3045-6100; e-mail: cep@imed.edu.br.

Desde já agradecemos a sua atenção.

Rodrigo Varella de Carvalho

Eu, _____, após a leitura deste consentimento, declaro que compreendi o objetivo deste estudo e confirmo o meu interesse em participar desta pesquisa.

Assinatura do Participante

Passo Fundo, _____ de _____ de _____.

ANEXO A

FACULDADE MERIDIONAL -
IMED/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Rodrigo Varela de Carvalho

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 74493817.5.0000.5319

Instituição Proponente: Faculdade Meridional - IMED

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.249.269

Apresentação do Projeto:

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

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

Objetivo da Pesquisa:

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

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

Endereço: Senador Pinheiro, 304

Bairro: centro

CEP: 99.070-000

UF: RS

Município: PASSO FUNDO

Telefone: (54)3045-8100

Fax: (54)3045-8107

E-mail: cep@imed.edu.br

FACULDADE MERIDIONAL - IMED/RS



Continuação do Protocolo: 2.249.269

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

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

Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

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

Tamanho da Amostra no Brasil: 90;

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

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

Endereço: Senador Pinheiro, 304
 Bairro: centro CEP: 99.070-320
 UF: RS Município: PASSO FUNDO
 Telefone: (54)3045-8100 Fax: (54)3045-8107 E-mail: ccep@imed.edu.br

FACULDADE MERIDIONAL -
IMED/RS



Continuação do Parecer 2.249.289

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão devidamente anexados e assinados

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PE INFORMACOES BASICAS DO PROJETO_975584.pdf	24/08/2017 16:58:03		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOCEP.docx	24/08/2017 16:57:17	Rodrigo Varela de Carvalho	Aceito
TCE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ASSENTIMENTO.docx	24/08/2017 15:47:58	Rodrigo Varela de Carvalho	Aceito
TCE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCE.docx	24/08/2017 15:47:40	Rodrigo Varela de Carvalho	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CONFIDENCIALIDADE.pdf	24/08/2017 15:45:13	Rodrigo Varela de Carvalho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORIZACAOLocal.pdf	24/08/2017 15:44:10	Rodrigo Varela de Carvalho	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	10/08/2017 14:23:24	Rodrigo Varela de Carvalho	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Senador Pinheiro 304

Bairro: centro

CEP: 99.070-200

UF: RS

Município: PASSO FUNDO

Telefone: (54)3045-8100

Fax: (54)3045-8107

E-mail: cep@imed.edu.br

FACULDADE MERIDIONAL -
IMED/RS



Continuação do Parecer: 3.248.208

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PASSO FUNDO, 30 de Agosto de 2017

Assinado por:
DENIZ ANZILIERO
(Coordenador)

Endereço: Senador Pinheiro 304

Bairro: centro

CEP: 99.070-200

UF: RS

Município: PASSO FUNDO

Telefone: (54)3045-8100

Fax: (54)3045-8107

E-mail: cep@imed.edu.br