



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



THAIS ACCORSI MENDONÇA

**AVALIAÇÃO DE METALOPROTEINASES DE MATRIZ -2, -9 E
TIMP-2 EM POLPAS DENTAIAS HUMANAS SADIAS E
INFLAMADAS**

**Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
Título de Doutor em Clínica Odontológica,
Área de Endodontia.**

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia

Co-Orientador: Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

PIRACICABA

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8^a. / 6159

M523a Mendonça, Thaís Accorsi.
Avaliação de metaloproteinases de matriz -2, -9 e TIMP-2 em polpas dentais humanas sadias e inflamadas. / Thaís Accorsi Mendonça. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Alexandre Augusto Zaia, Sérgio Roberto Peres Line.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Polpa dentária. 2. Inflamação. 3. Gelatinases. 4. Peroxidase. I. Zaia, Alexandre Augusto. II. Line, Sérgio Roberto Peres. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

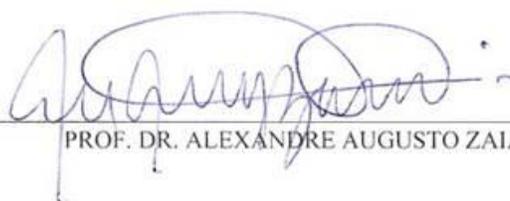
(mg/fop)



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 27 de Fevereiro de 2009, considerou a candidata THAIS ACCORSI MENDONÇA aprovada.



PROF. DR. ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA



PROF. DR. ANTONIO VARGAS DE OLIVEIRA FIGUEIRA



PROFa. DRa. ANA PAULA DE SOUZA PARDO



PROFa. DRa. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES



PROFa. DRa. JEANNE BLANCO DE MOLFETTA MACHADO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha irmã Daniela,
exemplo de pesquisadora, de ética e persistência na vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, que me guia e ilumina meus caminhos;

À minha mãe Edna e meu pai Valter pelo amor incondicional;

Aos meus avós, Cidinha e José (in memoriam), agradeço o carinho e a dedicação;

À Isabella, Bettina e Gustavo, por sempre me receber com muita alegria. Bebella que me faz entrar em seu mundo de conto de fadas através de seus olhos puros de amor;

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, pelo aprendizado e gestos de confiança durante todo esse trabalho, pela dedicação na minha formação profissional e pessoal;

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, cuja porta sempre encontrei aberta para dúvidas, conversas e risadas, exemplo para mim de profissionalismo e humildade;

Ao Prof. Dr. Saulo Geraldini, pela oportunidade de um estágio na Universidade de Iowa, EUA;

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do diretor Prof. Dr. Francisco Haiter Neto e do diretor associado Prof. Dr. Marcelo de Castro Meneghim.

Ao Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior, coordenador geral dos cursos de Pós-Graduação e à Prof. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia, coordenadora do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

Ao Prof. Dr. Francisco José de Souza-Filho, Prof^a. Dr^a. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz e Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida, professores da disciplina de Endodontia da FOP -UNICAMP, pelos conhecimentos transmitidos e convivência.

Ao Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz, Prof. Dr. Daniel Saito e Profa. Dra. Keila Roncato Duarte, componentes da banca examinadora do Exame de Qualificação, pela importante contribuição a este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo para o doutorado.

Aos funcionários da FOP, pela atenção e disponibilidade com que atendem a todos.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Cirurgia; Profs., funcionários e inúmeros alunos; na ajuda da coleta de amostras sadias;

À todos do Laboratório de Histologia da FOP, onde realizei a técnica zimográfica, pela ajuda e agradável recepção, onde sempre me senti à vontade;

Ã Profa. Dra. Ana Paula de Sousa Pardo, pela ajuda com a técnica zimográfica e inúmeras conversas. Exemplo de caráter e dedicação à pesquisa;

Ao Prof. Dr. Antônio Figueira e Profa. Dra. Jeanne Machado, pela parceria realizada com Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP, onde aprendi e realizei todo o experimento de PCR em tempo real. Agradeço à Jeanne, Renato e Bia Maia pela amizade;

À Profa. Dra. Keila Maria Roncato Duarte, com a qual aprendi e realizei o ELISA, no Instituto de Zootecnia em Nova Odessa. Tenho ótimas lembranças desse período;

À Profa. Dra. Rachel Gerlach, do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP e os alunos Andrea e Cesar, onde aprendi e realizei o ensaio de mieloperoxidase;

Às diversas gerações de alunos da pós-graduação em Endodontia, pela convivência ao longo destes anos, com os quais dividi alegrias e questionamentos. Desejo a todos muita sorte e caminhos recheados de oportunidades.

Às amigas Wanderly Lima de Almeida e Geovânia Caldas Almeida, por todos os momentos de atenção e carinho que recebi;

As inúmeras amigas como Luciana (Luli), Regina, Karina Ruiz, Denise, Débora, Cecília, Cristina Sicca, Fernanda Tosello pela convivência ao longo desses anos;

Aos meus amigos Fábio Balico e Fernanda Cosma Alves, irmãos sempre presentes em todos os momentos. São tantas histórias e risadas, formando uma vida cheia de alegria;

Aos amigos Giuliana e Felipe (Tatu), Tom e Vica, pela recepção em Iowa. Algumas pessoas realmente já se conhecem... nossa identificação foi imediata;

A Hérika Zaia pela amizade e alegria com que sempre me recebeu na sua casa;

Ao Prof Wellinton Dinelli, Prof. Fernando Crisci, Profa. Patrícia Aleixo e Claudio Tita pela agradável convivência na Uniara;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

Meus agradecimentos!

***“ Ousar é perder o equilíbrio por um instante, mas não
ousar é perder-se em si mesmo”***

(Kierkgaard Soren)

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas zinco dependentes secretadas por diversas células e que possuem uma importante função no remodelamento da matriz extracelular tanto em processos fisiológicos quanto patológicos. Essas enzimas são secretadas na forma inativa (zimógeno) e sua atividade pode ser modulada por inibidores teciduais endógenos (TIMPs). As MMPs são subdivididas de acordo com seu substrato, sendo as MMPs -2 e -9 conhecidas como gelatinases por degradar gelatina, ou seja, colágeno denaturado. Em uma inflamação pulpar intensa ocorre degradação tecidual similar à qualquer outro processo inflamatório. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar polpas dentais humanas sadias e inflamadas quanto à expressão gênica de MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 utilizando o PCR em tempo real; valores proteicos de TIMP-2 através do ELISA e atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 por meio da técnica zimográfica. A técnica de quantificação de mieloperoxidase (MPO) também foi realizada em todas as amostras para identificar e quantificar a presença de células neutrofílicas na polpa. Foram utilizadas polpas sadias (n=20) de terceiros molares inclusos e polpas inflamadas (n=20), caracterizadas clinicamente. Os resultados mostraram uma expressão gênica 9 vezes maior para MMP-9 em polpas inflamadas quando comparadas a polpas sadias. Para a quantificação proteica, os valores absolutos evidenciaram maiores valores de TIMP-2 em polpas inflamadas quando comparadas com polpas sadias ($p < 0,0039$). A atividade gelatinolítica para o grupo sadio evidenciou maior presença de bandas para pro-MMP-2, com ausência de MMP-9. Em polpas inflamadas, a proteína que apresentou maior atividade foi a MMP-9, com atividade significativamente maior ($p = 0,00081$) quando comparada com MMP-2 ativa. O resultado da quantificação da proteína MPO evidenciou para algumas amostras inflamadas, caracterizadas clinicamente, um padrão similar ao encontrado para polpas sadias. E em amostras inflamadas com alto índice de MPO, caracterizando assim presença de muitos

neutrófilos, houve presença de atividade gelatinolítica para MMP-9. Assim, pode-se concluir que a proteína MMP-2, em polpas inflamadas, tornou-se ativa mesmo com o aumento da produção de TIMP-2. Entretanto, o aumento em níveis proteicos para TIMP-2 na inflamação, não foi acompanhado do aumento do RNA_m para este gene. Em processos inflamatórios, MMP-2 e MMP-9 foram encontradas de forma ativa, o que não ocorreu em polpas sadias. Não houve correlação entre sintomatologia e presença da proteína mieloperoxidase ou atividade gelatinolítica em polpas inflamadas.

Palavras-chave: polpa dentária, inflamação, gelatinases, TIMPs, mieloperoxidase.

ABSTRACT

Matrix Metalloproteinases (MMPs) are members of a family of zinc-dependent endopeptidases which are involved in the degradation of extracellular matrix but also in a number of other biologic processes. Such as any other inflammatory process, the pulp inflammation is associated with tissue degradation which can be mediated by MMPs. MMP-2 and MMP-9, named gelatinases, are secreted in latent form (zymogen) and their activity can be modulated by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). The aim of this study was evaluated the role of MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 in inflammatory human dental pulp tissues. Twenty dental pulp clinically diagnosed as inflammatory tissues and twenty healthy pulp tissues from enclosed third molars were harvested and evaluated to: gene expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 by real-time PCR; protein quantification of TIMP-2 by ELISA; gelatinolytic activity (MMP-2 and MMP-9) assessed by zymography technique, and neutrophils quantification by mieloperoxidase protein (MPO) assay. Data analysis showed an increased mRNA levels of MMP-9. Protein level of TIMP-2 in inflammatory pulp tissues was higher than healthy tissues ($p < 0,0039$). The gelatinolytic activity for the healthy pulp tissues revealed a greater presence of bands for pro-MMP-2, with absence of MMP-9 bands. In inflammatory pulp tissues, MMP-9 demonstrated higher activity ($p = 0.00081$) compared to MMP-2. Finally, the inflammatory pulp tissues with increased MPO protein levels were associated to the MMP-9 gelatinolytic activity. Taken together, these data suggest that MMP-2 in inflammatory pulp tissues was activated even at the presence of high levels of TIMP-2. However, the increased protein levels of TIMP-2 in inflammatory pulps were not followed by an increase of corresponding mRNA levels. During inflammatory process, MMP-2 and MMP-9 were found active, which did not occur in healthy pulps. Besides, it was not observed correlation between pain and the presence of mieloperoxidase protein or gelatinolytic activity in inflammatory pulp tissues.

Keywords: dental pulp, inflammation, gelatinases, TIMPs, myeloperoxidase

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
3. PROPOSIÇÃO	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
5. RESULTADOS	23
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41
APÊNDICES	
Apêndice 1: Ficha Clínica para Anamnese e Termo de Consentimento do Paciente CEP/FOP	47
Apêndice 2: Valores de Ct	50
ANEXO	
Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética FOP	51

1. INTRODUÇÃO

A polpa dentária é constituída de tecido conjuntivo frouxo especializado na formação de dentina. O que a torna peculiar é o seu confinamento entre paredes rígidas, relacionando-se com o meio externo ao dente somente através de forames e foraminas apicais, ou canais laterais. Por esta razão, a inflamação pulpar possui características diferentes dos outros processos inflamatórios, principalmente quando se considera sua incapacidade de expansão em consequência da vasodilatação ou aumento de permeabilidade vascular (Estrela & Figueiredo, 1999).

Essas alterações patológicas pulpares são diagnosticadas pela presença da sintomatologia dolorosa. A dor passa a ser um referencial importante para o diagnóstico, uma vez que, não existe uma correlação nítida entre sintomatologia clínica com os achados histopatológicos (Leonardo, 2005).

O processo inflamatório, de um modo geral no organismo, é uma resposta de proteção com o objetivo de neutralizar ou eliminar o agente agressor (Trowbridge & Emling, 1996). Entretanto, como qualquer outro processo inflamatório, a pulpíte está associada à degradação tecidual. A degradação dos componentes da matriz extracelular pode ser feita através de enzimas, conhecidas como metaloproteinases de matriz (MMPs) (Birkedal-Hansen, 1993).

A matriz extracelular é constituída por um complexo, em proporções variáveis, de inúmeras proteínas fibrosas (colágeno e elastina) embebidas em um gel hidrofílico de polissacarídeos, que se organizam formando uma rede, em parte responsável pela grande diversidade morfológica, funcional e patológica dos diversos tecidos. A quantidade de matriz é variável com o tipo de tecido, sendo abundante principalmente nos tecidos conjuntivos. Além de servir como suporte para as células, a matriz extracelular exerce influência no desenvolvimento, migração, proliferação, forma e funções metabólicas das células (Junqueira & Carneiro, 2000).

As MMPs são formadas por uma família de endopeptidases zinco-dependentes que participam da remodelação da matriz extracelular através da degradação de macromoléculas, incluindo colágeno, laminina, fibronectina e core protéico das proteoglicanas. (Salo et al., 1994; Souza & Line, 2002). Existem, hoje, cerca de 24 enzimas classificadas como MMPs, das quais 23 são encontradas em humanos. Baseado na especificidade de seu substrato, as MMPs podem ser divididas em subgrupos: colagenases (MMP-1/ colagenase de fibroblastos, MMP-8/colagenase de neutrófilos, MMP-13 e MMP-18); estromelinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11); gelatinases (MMP-2/A e MMP-9/B); matrilisina (MMP-7 e MMP-26), metaloproteinases tipo membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25) e outros (MMP-20/ Enamelisina, MMP-12/ elastase de macrófagos, etc) (Souza & Line, 2002; Hannas et al., 2007; Birkedal-Hansen et al., 2008).

As gelatinases são metaloproteinases de matriz envolvidas na proteólise e rompimento de membranas basais, bem como na degradação de colágenos tipo IV, V, colágenos desnaturados (gelatinas), fibronectina e elastina (Thomas et al., 1999; Kahari & Saarialho-Kere, 1999), sendo classificadas como MMP-2 (72-kDa, gelatinase A) (Collier et al., 1988) e MMP-9 (92-kDa, gelatinase B) (Wilhelm et al., 1989).

Os níveis constitutivos de expressão gênica de MMPs são normalmente baixos, sendo sua atuação enzimática induzida sob várias circunstâncias fisiológicas como durante a embriogênese, crescimento, reparo tecidual e remodelação (Curran & Murray, 1999; Sternlicht & Werb, 2001, Accorsi-Mendonça et al., 2008). A atuação das MMPs pode ser via liberação de fatores de crescimento ou outras moléculas bioativas aprisionadas na matriz extracelular ou diretamente por proteólise (Sternlicht & Werb, 2001). Há evidências que as MMPs exercem um papel importante diretamente no desenvolvimento e remodelamento dos tecidos orais. Algumas MMPs são requeridas para remover as proteínas da matriz do esmalte durante a maturação do mesmo, resultando em um tecido altamente mineralizado (Hannas et al., 2007).

Em processos patológicos, a expressão de algumas MMPs é determinante. Em casos de reabsorção inflamatória de enxertos xenogênicos, há uma participação bem delineada de metaloproteinases (MMP-2) secretada por macrófagos (Accorsi-Mendonça et al., 2005). Em glândulas salivares, as metaloproteinases participam nos períodos iniciais de atrofia glandular, e com a evolução da atrofia, há uma diminuição na expressão enzimática (Zaia et al., 1996). São altamente expressas na invasão tumoral e metástase (Crawford & Matrisian, 1995). Em tecidos orais, as MMPs são os principais agentes da degradação do colágeno na doença periodontal (Souza & Line, 2002); MMP-2 e MMP-9 tem um papel decisivo na degradação do colágeno dentinário em lesões de cáries (Tjaderhane et al., 1998) ou envolvidas no processo de fluorose (Hannas et al, 2007).

Quanto a processos inflamatórios pulpares, Gusman et al. (2002), avaliaram os níveis de MMPs (-1, -2, -3, e -9) em polpas dentais humanas com condições de normalidade e inflamação, através de ELISA e zimografia. De acordo com os resultados, a alta quantificação absoluta de MMP-9 em polpa inflamadas e a correlação positiva com a atividade gelatinolítica sugerem que a MMP-9 tem um importância na degradação do tecido pulpar em processos inflamatórios. Já para MMP-2, houve um maior valor absoluto para polpas sadias.

Shin et al. (2002), avaliaram a valores de concentração proteica de MMP-1, MMP-2 e MMP-3, através de ELISA e imunohistoquímica em polpas inflamadas e em lesões periapicais, tendo como grupo controle polpas sadias. Estes autores observaram maiores valores proteicos para as enzimas no grupo inflamado. Para a Imunomarcção, a MMP-2 foi imunomarcada fracamente em células inflamatórias e fibroblastos em ambos grupos experimentais.

A regulação da atividade proteolítica das metaloproteinases ocorre em vários níveis, desde a regulação da transcrição até o controle da atividade das MMPs na matriz extracelular através da ação de uma proteína moduladora, a TIMP ("Tissue Inhibitor of Metalloproteinase"). Quatro membros da família TIMP já foram caracterizados (Herron et al., 1986; Baker et al., 2002). Estes inibidores estão

distribuídos pelos tecidos e fluidos e são secretados por diversos tipos celulares, incluindo fibroblastos, neutrófilos polimorfonucleares, células endoteliais, condrócitos e células neoplásicas (Howard et al., 1991).

O balanço entre a produção de MMPs e TIMPs representa um ponto crítico na manutenção da homeostasia da matriz extracelular. É conhecido que na degradação patológica da matriz extracelular há um excesso de atividade de MMPs no tecido. Por esta razão, há um grande interesse no estudo de TIMPs e desenvolvimento de inibidores sintéticos de MMPs (Kahari & Saarialho-Kere, 1999). O trabalho de Howard et al. (1991), demonstra que a TIMP-2 é mais efetiva com o grupo das gelatinases (MMP-2 e MMP-9).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar polpas dentais humanas saudáveis e inflamadas quanto à expressão gênica de MMP-2, MMP-9 e TIMP-2; valores proteicos de TIMP-2 e atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9. Para ambos os grupos, foi avaliada a quantificação de células neutrofílicas na polpa, visto que estas células são secretoras de MMP-9.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Metaloproteinases de matriz (MMPs) e Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs)

As metaloproteinases de matriz são uma família de endopeptidases zinco-dependentes envolvidas no processo de degradação da matriz extracelular. Em 1962, Gross e Lapière relataram pela primeira vez as metaloproteinases de matriz como enzimas que participavam no processo de metamorfose da rã, na reabsorção da cauda, atuando na tripla hélice de colágeno. (Sternlicht & Werb, 2001).

MMPs influenciam diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo aspectos do desenvolvimento embriogênico, morfogênese tecidual, processo de reparo e doenças inflamatórias. MMPs compreendem um grupo de contínuo crescimento de enzimas proteolíticas dependentes de zinco e cálcio divididas de acordo com a especificidade do substrato. Assim, subdividem-se em collagenases (MMP-1/ collagenase de fibroblastos, MMP-8/collagenase de neutrófilos, MMP-13 e MMP-18); estromelisinases (MMP-3, MMP-10 e MMP-11); gelatinases (MMP-2/A e MMP-9/B); matrilisina (MMP-7 e MMP-26), metaloproteinases tipo membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25) e outros (MMP-20/ Enamelisina, MMP-12/ elastase de macrófagos, etc) (Souza & Line, 2002; Hannas et al., 2007; Birkedal-Hansen et al., 2008).

As metaloproteinases são expressas por diversas células estromais em respostas a estímulos, como também, pela maioria das células inflamatórias que invadem o tecido durante eventos de remodelamento in vivo (Birkedal-Hansen, 1993).

O conhecimento de sua estrutura terciária é crucial para o completo entendimento de suas propriedades funcionais e associações com disfunções. Todas as MMPs possuem uma seqüência de sinalização N-terminal (ou pré-domínio), o qual é removido após direcionar a síntese da enzima para o retículo endoplasmático. O pré-domínio é seguido por um pró-domínio, o qual mantém a

latência da enzima até que este seja removido ou alterado (Nagase & Woessner, 1999).

Gelatinases A e B, MMP-2 e MMP-9 respectivamente, são distinguidas pela inserção de três repetições cabeça-cauda ricas em cisteína, em seus domínios catalíticos. A atividade da gelatinase A foi observada no tecido sinovial reumatóide por Harris e Krane, em 1972, que em retrospecto, era possivelmente a MMP-2. A atividade da gelatinase foi separada da colagenase-1 e da estromelina -1, em meio de cultura de osso de coelho por Sellers et al, em 1978. No ano seguinte, Liotta achou uma enzima similar em tumor de rato que digeriu a membrana basal do colágeno tipo IV. Isto permitiu uma denominação inicial de colagenase tipo IV. Contudo, atualmente a denominação mais encontrada é gelatinase A com 72 kDa. A seqüência da MMP-2 inclui um domínio com uma tripla repetição de fibronectina tipo II inserida no seu domínio catalítico, contribuindo para a ligação da enzima ao substrato da gelatina. Isto faz da MMP-2 uma das metaloproteinases com estrutura mais longa (Nagase & Woessner, 1999).

Outra gelatinase, em leucócitos polimorfonucleares, foi descrita por Sopata et al., em 1974. Uma enzima similar encontrada em macrófagos de coelhos era capaz de digerir o colágeno tipo V, permitindo uma designação inicial de colagenase tipo V. A atividade da colagenase e da gelatinase de neutrófilos foi separada, as enzimas purificadas e caracterizadas seguindo a seqüência de cDNA. Gelatinase B, ou MMP-9, estruturalmente, é a maior das gelatinases, incluindo três domínios de fibronectina e um domínio colagênico tipo V. O peso molecular de cerca de 92 kDa permitiu outra designação: gelatinase B 92 kDa (Nagase & Woessner, 1999).

As MMPs são sintetizadas como zimogênios inativos que requerem ativação (Harper et al., 1971). Posteriormente, mostrou-se a existência de inibidores endógenos de MMPs, chamados inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (Murphy & Docherty, 1992). Existem ainda MMPs com perfil próprio de expressão, localização na superfície celular, ativação, inibição e degradação, bem como espectro de substratos preferenciais (Howard et al., 2001). A multiplicidade

das MMPs com funções distintas e às vezes sobrepostas, provavelmente atua como uma proteção contra qualquer perda de controle regulatório (Sternlicht & Werb, 2001).

Quatro TIMPs (-1, -2, -3 e -4) têm sido clonadas, purificadas e caracterizadas, apresentando muitas similaridades. Todavia, exibem distintas características estruturais, propriedades bioquímicas e padrões de expressão. Isto sugere que cada TIMP possui um específico papel “*in vivo*” (Baker et al., 2002). As TIMPs são proteínas multifuncionais, possuem peso molecular em torno de 21kDa e são secretadas na matriz extracelular. São expressas por muitos tipos celulares incluindo fibroblastos, queratinócitos, macrófagos e células endoteliais (Murphy & Docherty, 1992; Birkedal-Hansen, 1993).

Um desequilíbrio no equilíbrio entre TIMPs e MMPs pode resultar em sérias doenças tais como artrite, crescimento e metástase tumoral, ou ainda doenças nas quais a perda de matriz extracelular é a maior característica. Por esta razão, as MMPs apresentam-se como o título alvo de uma possível terapia inibitória (Souza & Line, 2002).

2.2 MMPs e TIMPs no tecido pulpar

As MMPs são estimuladas durante o processo inflamatório pulpar intenso como em qualquer outro processo inflamatório. O’Boskey & Panagakos (1998), propuseram que citocinas inflamatórias, como Interleucina-1 e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) estimulam os níveis de gelatinases em células do tecido conjuntivo pulpar humano.

Correlacionando bactérias e MMPs, Nakata et al. (2000), utilizaram ELISA para determinar alterações proteicas de MMPs (MMP-1 e MMP-2) e TIMPs (TIMP-1 e TIMP-2), de cultura primária de células pulpares humanas quando estimuladas com extratos bacterianos anaeróbios. As bactérias Gram negativas escolhidas foram: *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas endodontalis* e *Porphyromonas gingivalis* por estarem associadas à inflamação da polpa dentária. O estudo demonstrou que as células pulpares foram estimuladas a

produzir MMP-1 e MMP-2 quando em contato com o extrato bacteriano. Já a produção de TIMP-1 foi insignificamente aumentada, enquanto que os níveis de TIMP-2 foram diminuídos quando em contato com o extrato, permitindo um aumento da produção de MMPs.

Ainda utilizando estímulos bacterianos, Chang et al. (2002), avaliaram em cultura de células do ligamento periodontal e polpa, a atividade de gelatinases em resposta à bacteróides produtores de pigmentos negros. As bactérias testadas, *Porphyromonas endodontalis* e *Porphyromonas gingivalis*, são especialmente associadas às infecções e abscessos de origem endodôntica. A zimografia demonstrou maior atividade de MMP-2 (72kDa) e menor expressão de MMP-9 (92kDa). Nos períodos avaliados de resposta ao estímulo bacteriano (1, 4 e 8 dias), houve um aumento da atividade de MMP-2, enquanto que a MMP-9 não alterou seu padrão de atividade em relação ao tempo experimental.

Entretanto, além de estímulos bacterianos, outros fatores podem alterar a produção e atividade de MMPs no tecido pulpar. Chang et al. (2001) procuraram verificar os efeitos de algumas citocinas, como interleucina -1, fator de crescimento transformante- β , inibidores da síntese de proteína -cicloheximide (CD) e inibidores da proteína C quinase na atividade gelatinolítica. A principal gelatinase secretada pela cultura de células pulpares foi a MMP-2 (72kDa) e em menor atividade a MMP-9 (92kDa). Foi observado ainda que citocinas inflamatórias e agentes farmacológicos estimulam os níveis de ativação de MMP-2, e esta pode desempenhar um papel importante na inflamação.

Shin et al. (2002), avaliaram a valores proteicos de MMP-1, MMP-2 e MMP-3, através de ELISA e imunohistoquímica em polpas dentais humanas inflamadas e em lesões periapicais, tendo como grupo controle polpas sadias. Neste estudo, os resultados da imunomarcção sugeriram que MMP-1 e MMP-3 são secretadas por leucócitos polimorfonucleares (PMNs), macrófagos, plasmócitos e linfócitos, e apareceram localizadas pericelularmente. A MMP-2 foi mais observada em processos agudos, e imunomarcada em células inflamatórias e fibroblastos.

Quanto a quantificação proteica, utilizando anticorpos monoclonais, os autores observaram maiores valores de MMPs no grupo experimental inflamado

Gusman et al. (2002), avaliaram os níveis de MMPs (-1, -2, -3, e -9) em polpas dentais humanas com condições de normalidade e inflamação, através de ELISA e zimografia. De acordo com os resultados, a alta quantificação absoluta de MMP-9 em polpa inflamadas e a correlação positiva com a atividade gelatinolítica sugerem que a MMP-9 tem uma importância na degradação do tecido pulpar em processos inflamatórios. Já para MMP-2, houve um maior valor absoluto para polpas saudáveis. Entretanto, este estudo utilizou um kit de ELISA onde somente a pro-MMP-2 ou ainda MMP-2 ligada a TIMP-2 era detectada. A enzima MMP-2 ativada não foi detectada nesse estudo.

Palossaari et al. (2003), estudaram o perfil de expressão gênica de 19 metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores teciduais específicos TIMPs (-1, -2 e -3) em cultura celular primária de odontoblastos humanos e em tecido pulpar e possíveis alterações de expressão após o estímulo com fator de crescimento tumoral beta (TGF- β) e da proteína morfogenética óssea -2 (BMP-2). A metodologia foi composta da análise do RNA_m através da técnica RT-PCR (reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa), análise proteica através do ensaio baseado em reação antígeno-anticorpo Western Blotting e finalizando com a avaliação da atividade proteica por zimografia. Os resultados demonstraram que na cultura celular de odontoblastos e o tecido pulpar expressam MMPs (-1, -2, -9, -10, -11, -13, -14, -15, -16, -17, -19, -20, -23), como também as TIMPs (-1, -2 e -3). A MMP-3 e a MMP-12 foram expressas somente em cultura. O TGF- β sozinho e junto com a BMP-2 regularam significativamente a atividade de MMP-9 em odontoblastos. Os autores concluíram que as MMPs desempenham um importante papel no processo fisiológico e patológico do complexo dentina-polpa.

2.3. Mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase é uma enzima mais abundante em neutrófilos, armazenada em seus grânulos e com peso molecular de 150 kDa. A enzima mieloperoxidase pode ser utilizada como um método de quantificação de infiltração neutrofílica nos tecidos (Mullane et al, 1985). O uso da atividade de MPO como calibrador para a quantificação de neutrófilos evita problemas e limitações da técnica histológica. A análise histológica requer a inspeção de múltiplos cortes seriados, visto que a distribuição de neutrófilos pelo tecido é heterogênea.

Para ensaios de MPO, o método empregando 3,3'-dimethoxybenzidine (DMB) como substrato foi utilizado. Entretanto, devido o DMB ser um conhecido carcinógeno, um substrato alternativo para MPO foi apresentado por Suzuki et al. (1983). O substrato mencionado é tetramethylbenzidine (TMB), revelando-se 34 vezes mais sensível que o método de DMB, sendo assim escolhido para ser utilizado nesse projeto.

3. PROPOSIÇÃO

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar polpas dentais humanas sadias e inflamadas quanto à expressão gênica e valores proteicos de MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 utilizando o PCR em tempo real e ELISA, respectivamente; e atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 por meio da técnica zimográfica. A técnica de quantificação de mieloperoxidase (MPO) também foi realizada em todas as amostras para identificar e quantificar a presença de células neutrofílicas na polpa.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

Para a realização deste estudo foram coletadas 40 polpas dentais advindas de dentes permanentes humanos com rizogênese completa, de pacientes de ambos os sexos com idade variando entre 15 e 53 anos. As amostras foram divididas em 20 sadias (grupo controle) e 20 inflamadas (grupo experimental). As polpas sadias foram obtidas de terceiros molares inclusos recém extraídos, enquanto que as polpas inflamadas foram obtidas de dentes que tinham a indicação prévia de biopulpectomia.

Foram excluídas polpas de dentes decíduos, necrose pulpar, presença de reabsorção radicular, dentes fraturados durante a exodontia ou polpas que apresentaram extrema dificuldade na sua remoção ou ainda pequena quantidade de tecido removido. Não foram incluídas na pesquisa polpas de pacientes portadores de doenças auto-imunes ou que estavam sob terapêutica medicamentosa prolongada, o que poderia interferir na resposta do processo inflamatório pulpar. Todos esse dados foram estabelecidos na anamnese (apêndice 01)

Um termo de consentimento livre e esclarecido, previamente aprovado pelo comitê de ética em humanos da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, foi apresentado aos pacientes que participaram da pesquisa para orientá-los quanto ao motivo da realização do projeto (apêndice 01). A aprovação do estudo junto ao Comitê de Ética da FOP encontra-se no anexo 01

A coleta do grupo controle, polpas sadias, foi feita imediatamente após a extração de terceiros molares inclusos. Para tal, foram confeccionados sulcos longitudinais com auxílio de uma fresa laminada (701, KG, EUA) em alta rotação, sob refrigeração, tomando-se o cuidado para que a fresa não alcançasse o tecido pulpar. Após a realização dos sulcos longitudinais, a ponta ativa de um cinzel reto foi posicionada no centro do sulco e com pressão o dente foi clivado ao meio. A

polpa foi então cuidadosamente removida com auxílio de curetas e sondas, procurando preservar ao máximo a integridade do tecido.

A condição inflamatória da polpa foi definida pelo diagnóstico clínico. Clinicamente todos os pacientes apresentaram dor espontânea, localizada e que não cessou com o uso de analgésicos. Para verificar a sensibilidade pulpar, foi efetuado o teste térmico utilizando-se de líquido congelante aplicado em bolinhas de algodão próxima a região cervical do dente, sob isolamento relativo, sendo somente viável uma resposta positiva com exacerbação da dor por tempo prolongado, evidenciando uma polpa ainda com sensibilidade e inflamada. Os exames radiográficos foram compatíveis com a normalidade periapical, ou seja ausência de espessamento ou lesão periapical.

Com a abertura coronária pode-se confirmar macroscopicamente a vitalidade do tecido pulpar, apresentando a coloração vermelha e maior sangramento quando comparada à uma polpa normal, devido à inflamação ser mediada por vasos sanguíneos. A extirpação de polpas inflamadas foi feita com o auxílio de uma lima tipo Kerr (Maillefer, Switzerland) de calibre compatível com o tamanho do canal radicular durante o tratamento endodôntico.

Para os ensaios de zimografia, ELISA e mieloperoxidase, as amostras foram imersas em um microtubo estéril contendo 500µL de Meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO, New York, EUA) acrescido de gamicina (40µg/mL) e mantidas em estufa (37 °C) por 24 horas. Após esse período, foi feita uma rápida centrifugação e o meio condicionado foi coletado e armazenado em nitrogênio líquido (-196 °C) para zimografia e ELISA (Souza & Line, 2001). O tecido pulpar remanescente no fundo do microtubo foi congelado a -20°C para a análise da proteína mieloperoxidase.

Já para o ensaio de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, as amostras pulpares foram coletadas e imersas imediatamente em 500µL de reagente estabilizador de RNA (RNA Holder, Bioagency, EUA). De acordo com as normas do fabricante, as amostras foram inicialmente armazenadas a 4 °C por 24

horas e depois transferidas para a temperatura de -20 °C para armazenamento até o momento do uso.

As amostras coletadas foram subdivididas de acordo com a técnica laboratorial utilizada (Figura 01).



Figura 01: Subdivisão das amostras de acordo com a técnica utilizada

4.2 Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real

4.2.1 Extração de RNA

A amostra congelada imersa no reagente estabilizador de RNA (RNA Holder, Bioagency, EUA) foi descongelada e o tecido pulpar transferido para outro microtubo contendo 1000 µL de trizol (Invitrogen Life Technologies, EUA). A extração do RNA total foi realizada com reagente trizol, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. O trizol mantém a integridade do RNA enquanto rompe as células e dissolve os componentes celulares. O tecido, imerso em trizol, foi macerado em microtubo de fundo chato utilizando-se um aparelho Politron (Nova Técnica Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP). Para cada 1 mL da suspensão foi adicionado 200 µL de clorofórmio (Sigma, EUA). As amostras foram homogeneizadas no vortex por 15 s e incubado à temperatura ambiente por

2-3 min, seguido da centrifugação a 12.000 g por 15 min a 4 °C. A adição do clorofórmio, seguido da centrifugação, separa a solução em fases aquosa e orgânica. Com precipitação de membranas e restos celulares no fundo do microtubo, o RNA permanece exclusivamente na fase aquosa ou sobrenadante (cerca de 60%). Assim, foi coletado cuidadosamente somente o sobrenadante e transferido para outro microtubo. Foi adicionado 500 µL de isopropanol gelado com agitação manual para a recuperação por precipitação do RNA total. Este novo microtubo foi incubado por 10 min a temperatura ambiente. Novamente os tubos foram centrifugados a 12.000g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido vertendo-se o microtubo e acrescentado 1000µL de etanol 75% (preparado com água livre de Rnase). O microtubo foi homogeneizado e centrifugado a 7.500g por 10 min a 4 °C. O etanol foi removido vertendo-se novamente o microtubo, restando o “pellet” de RNA total, ao fundo. Após 5-10 minutos, o tubo estava seco, com o cuidado de observar que não havia mais gotas de álcool. O RNA total foi dissolvido em 20 µL de água Rnase-free tratada com DEPC (USB, EUA) e incubado por 10 min a 55/60 °C (banho seco). Após essa etapa, as amostras foram etiquetadas e armazenadas em freezer -80 °C. Uma alíquota de 2 µL foi utilizada para determinar a concentração de RNA ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) nas amostras, através de espectrofotometria.

4.2.2. Tratamento com DNase

O tratamento com DNase do RNA total extraído tem o objetivo de eliminar impurezas, como DNAs remanescentes, antes da confecção do cDNA. De acordo com a amostra com menor quantificação e para utilizar 1µg de RNA, foram feitos os cálculos do volume de RNA utilizado para cada amostra. O RNA foi dissolvido com 1µL da enzima DNase (Fermentas, EUA), 2µL do tampão, 0,5µL de inibidor de Rnase (RNase out, Invitrogen, EUA) e água tratada com Dietil Pirocarbonato (DEPC) para completar o volume final de 20µL. O DEPC modifica e inativa os resíduos de histidina e tirosina constituindo assim, um método eficiente no controle da contaminação por proteínas, como RNases. Após 30 minutos de incubação a

37 °C foi adicionado 1µL de EDTA 0,3M para o inativar a enzima DNase. Com o EDTA, o microtubo foi incubado por 15 minutos a 70 °C.

4.2.3. Confecção do cDNA

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado através de uma reação de transcrição reversa, com a utilização de uma transcriptase reversa ImProm- II Reverse Transcription System. (Promega, Wisconsin, EUA). Foram pipetados 18µL de RNA tratado com DNase e 1 µL de iniciadores aleatórios (“random primers”) em um microtubo, seguido da incubação por 5 minutos a 25 °C, de acordo com as indicações do fabricante da enzima. A escolha do uso de iniciadores aleatórios se deve à escolha do controle endógeno deste estudo, a subunidade 18S do RNA_r, o qual não apresenta a cauda poli A, não sendo possível desta forma utilizar iniciadores tipo “oligo dTs”.

Em seguida, foi acrescentado 1,2 µL de MgCl₂ (50 mM); 7,3 µL do tampão da enzima 5x; 0,5 µL do Rnase out; 1µL DNTPs mix e 1µL enzima transcriptase reversa. O volume final da reação foi de 30µL. O aparelho termociclador foi programado para 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 45 minutos, 70 °C por 15 minutos com término de uma temperatura de 4 °C.

4.2.4. Reações de PCR em tempo real

A expressão quantitativa dos genes de MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 foi analisada através das reações de PCR em tempo real, utilizando-se o sistema TaqMan (Applied Biosystems, EUA) em um aparelho Rotor Gene 3000 (Corbett Life Science, Qiagen, EUA). O sistema TaqMan apresenta iniciadores acoplados a uma sonda interna específica para o produto gênico alvo, sendo um reagente mais sensível e específico. O cDNA foi dissolvido em água MilliQ na proporção 1:1. Para a reação foram utilizados 10 µL do TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), 3 µL do cDNA, 1 µL do primer/sonda (20x) e 6 µL de água MilliQ, totalizando uma reação de 20µL. A reação de amplificação, de acordo

com o fabricante, compreendeu basicamente 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C e 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C.

Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (“cycle threshold” – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Para este estudo, o “threshold” delineado para todos os genes foi de 0,1.

Todas as amostras também foram submetidas a reação para a detecção de RNA_m para a subunidade 18S do RNA_r, um gene de expressão constitutiva, utilizado como controle positivo da reação de amplificação. Desta forma, os níveis de expressão da subunidade 18S do RNA_r foram utilizados para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo. A expressão do RNA_m da enzima, pertencente ao ciclo de Krebs, Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (GAPDH) é comumente utilizada como controle endógeno em reações de PCR em tempo real. Entretanto, Bas et al. (2004), observaram que a subunidade 18S do RNA_r, quando comparada com outros genes constitutivos como o GAPDH, foi mais estável e com uma normalização superior.

Uma amostra negativa (água substituindo o cDNA) foi submetida a reação com cada par das seqüências dos primers utilizados. Para cada reação foram feitas 3 repetições (Czechowski et al., 2004). Para a análise dos dados, foi utilizado o método C_t comparativo (Método $\Delta\Delta C_t$). A quantidade de alvo, normalizado para referência endógena e em relação ao calibrador, é dada pela fórmula: $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Esta forma de análise, descrita por Livak & Schmittgen (2001), é também chamada de método Ct comparativo ou Método $\Delta\Delta C_t$.

4.3 Mieloperoxidase (MPO)

O tecido pulpar coletado foi macerado em tampão inicial de NaCl 0,1M (5,84g.L⁻¹) e NaEDTA 0,015M (5,58 g.L⁻¹) pH 4,7 de NaPO₄ 0,02M. Para cada 1 grama de amostra, foi inserido 2mL deste tampão. O tecido foi macerado em

microtubo de fundo chato utilizando-se um aparelho Politron (Nova Técnica Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil). Após este passo, ocorreu a centrifugação por 5 minutos com 10.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi removido com cuidado e transferido para outro microtubo, onde foi adicionado o tampão 2 na proporção 1:1. O tampão 2 é composto de 1g HTAB¹ (0,5%) em 200ml NaPO₄ 0,05M, pH 5,4. O microtubo foi agitado em um vortex e congelado/descongelado em nitrogênio líquido por 2 vezes. O próximo passo foi a centrifugação por 15 minutos com 10.000 rpm a uma temperatura de 4°C. Novamente, o sobrenadante foi coletado. Em uma placa de 96 poços (96 well EIA/RIA plate, Corning Incorporated, EUA) foi colocada 5 uL de cada amostra. Em seguida, foram realizados os seguintes passos seqüenciais: a) 45µL NaPO₄ 0,08M, b) 25µL TMB² 37° C, c) 100µL H₂O₂ a 37 °C por 5 minutos (H₂O₂ 3% + NaPO₄ 0,08M) e d) 75µL H₂SO₄ 4M. A placa foi inserida em um leitor de microplaca (Bio-Rad, EUA) e a absorbância lida em um comprimento de onda de 450nm.

4.3.1 Curva Padrão

A curva padrão do ensaio para mieloperoxidase foi feita com neutrófilos já previamente separados. Para a separação de neutrófilos, o sangue humano de um voluntário foi coletado com EDTA/heparina e centrifugado em temperatura ambiente a 2.000 g por 10 minutos. O precipitado ou “buffy coat” foi coletado e transferido para um tubo de 15 mL. O volume foi completado com tampão de lise de hemácias (EDTA dissódico, NH₄Cl, bicarbonato de sódio e água miliQ agitando-se por 10 min, seguido de uma centrifugação a 1.000g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, houve a formação de um “pellet”. O sobrenadante foi removido e inicialmente foi inserido 3mL de PBS tamponado pH 7,3, misturando-o ao pellet. Em seguida, todo o tubo de 15 mL (tipo Falcon, EUA) foi completado com PBS e centrifugado em 1.000g por 10 min a 4°C. Nesse momento, o aspecto

¹ HTAB = hexadecyltrimethylammonium bromide

² TMB = tetramethyl benzidine

final do “pellet” é claro, limpo. Após a remoção do sobrenadante, ressuspendemos com 3 mL de PBS. Em um outro tubo de 15mL, colocamos 3 mL de Histopaque 1119 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e lentamente mais 3 mL de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), pela parede do tubo. O Histopaque é um reagente desenvolvido para a separação de células, constituindo-se em uma solução de polissacarose e diatrizoato de sódio. Para o Histopaque 1077 a densidade é ajustada em $1,077 \text{ g.mL}^{-1}$, recuperando células mononucleares viáveis a partir de pequenos volumes de sangue. O Histopaque 1119 a densidade é ajustada em $1,119 \text{ g.mL}^{-1}$, sendo específico para polimorfonucleares.

A seguir, nesse novo tubo, foi inserido lentamente os 3mL com o “pellet” limpo diluído em PBS e centrifugado a 700g por 30 minutos em temperatura ambiente. O resultado foi a formação de duas camadas, sendo a superior formada por células mononucleares e a inferior formada por células polimorfonucleares. As camadas, contendo células diferentes, foram cuidadosamente removidas e colocadas em tubos separados e identificados. Para o tubo de polimorfonucleares, foi acrescentado 1 mL de PBS para o procedimento de contagem de células em câmara de Neubauer. Após a contagem, as células foram ajustadas para a obtenção de uma curva padrão com um número de células conhecidas.

4.4 Zimografia (atividade gelatinolítica MMP-2 e MMP-9)

O volume de cada amostra para a corrida eletroforética foi baseado na quantificação protéica total lida em um leitor de microplaca (Versa Max Tunable Microplate Reader, Molecular Device, EUA) segundo a técnica de Bradford (Bradford, 1976). Para tal análise foi feita uma curva padrão de BSA (“Bovine Serum Albumin”, USB, EUA) e as amostras foram correlacionadas com a curva padrão. A partir da absorbância lida, a 595 nm, foi calculada a quantidade total de proteína em cada amostra. Com a quantidade de proteína estabelecida, foram feitos cálculos de volume para que cada poço do gel eletroforético contivesse a mesma quantidade total de proteína.

Em seguida, a atividade proteolítica das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) foi analisada em gel de SDS - poliacrilamida com concentração final de 10% de poliacrilamida impregnada com 500 μ L de gelatina (Sigma, EUA), além do uso de um marcador de peso molecular de proteínas “Page Ruler Prestained Protein Ladder” (Fermentas, EUA). A escolha deste marcador de peso molecular se deu devido a uma banda de 72kDa, equivalente ao peso molecular da MMP-2 ativa.

As amostras de meio condicionado de tecido pulpar foram misturadas com tampão de amostra sem β -mercaptoetanol e a corrida eletroforética foi realizada com corrente contínua de 15 mA em temperatura de 4 °C. Após o término da corrida, o gel foi colocado em recipiente com 250mL de solução renaturante contendo 2% de Triton X-100 (USB, EUA) e mantido sob agitação por 30 minutos em temperatura ambiente, para remoção do SDS. Essa lavagem foi realizada duas vezes. O gel foi então incubado à 37°C por 18 h sob agitação em 250 mL de tampão de revelação contendo 1mL de CaCl₂ 1M, 2mL de TrisHCl 1M e 197 mL de água destilada, pH 7,4 para ativação da gelatinase. Em seguida, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R250 (USB, EUA) e as gelatinases foram visualizadas pela capacidade de digerir o substrato formando bandas claras que contrastam com o restante do gel, onde o substrato está intacto e fortemente corado de azul. A atividade gelatinolítica no zimograma foi detectada como bandas não coradas e a identificação das gelatinases foi feita de acordo com o peso molecular (Souza, 2000).

Os géis de zimogramas foram analisados através da densidade da banda com o auxílio do *software Kodak Digital Science* (Kodak, EUA). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para detecção de diferenças entre os grupos, o teste de Tukey foi usado com um nível de significância de 5%.

4.4.1 Ensaio de inativação das metaloproteinasas

Uma forma de confirmar que as proteínas encontradas no gel da técnica zimográfica são metaloproteinasas foi elaborado um ensaio com inibidores específicos de MMPs, colocados no tampão de revelação. Para tal, selecionamos

EDTA (Sal dissódico, Nuclear, Brasil) e fenantrolina (Sigma, EUA) como inibidores; um controle positivo, com amostras do grupo sadio e inflamado incubadas em tampão de revelação convencional e uma substância não inibitória de MMPs: fenilmetil-sulfonil fluoride (PMSF, Sigma, EUA). O PMSF é um inibidor de serina-proteases, as quais representam uma família de proteínas diferentes das metaloproteinases.

Assim, amostras de polpa normal e inflamada foram submetida à zimografia. Em seguida, foram incubadas por 18 horas à 37 °C em tampão Tris-HCl/ CaCl₂ convencional ou contendo um dos seguintes inibidores: 0,5 mM 1,10-fenantrolina, 0,5 mM EDTA e 0,5 mM PMSF. Posteriormente, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R 0250 (Zaia et al, 1996; Souza, 2000).

4.5 Quantificação das gelatinases e de TIMP-2 por ELISA (“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”)

A amostra utilizada teve a quantidade inicial proteica verificada por meio da técnica de Bradford (Bradford, 1976). De acordo com a amostra de menor concentração proteica, o volume de todas as outras amostras foi calculado para a uniformidade de quantidade proteica total e o volume final de 100 µL por poço foi complementado com PBS. Para a curva-padrão foi realizado um ensaio com diluições seriadas da proteína purificada comprada comercialmente (MMP-2 humana, MMP-9 humana isolada de células advindas do sangue, TIMP-2 humana purificada de fibroblastos humanos estimulados, Chemicon, EUA). Todos os antígenos foram testados para todos os anticorpos para verificação de reações cruzadas. Em todos os ensaios, 2 poços foram separados para o controle negativo (branco), onde não havia a sensibilização inicial com antígenos, sendo os poços cobertos com fita adesiva neste momento.

Para o experimento, as placas de polivinil de 96 orifícios (MPL /TPP, EUA) foram sensibilizadas com 100 µL por poço e incubadas em estufa por 1 hora a 37°C com toda a placa envolta em parafilme para evitar a evaporação. Após a

sensibilização, 200 µL de PBS-BSA 0,2% foram adicionados em todos os poços e novamente incubados por uma hora a 37 °C. Este passo faz-se necessário para o bloqueio, com uma proteína inerte (BSA), dos locais do poço onde não há antígeno. Após esse período, o líquido foi removido completamente. Em seguida, a alíquota do anticorpo primário (anti-TIMP-2, anti-MMP-9, anti-MMP-2 Policlonal IgG (Rabbit), Affinity BioReagents, EUA) foi adicionado à placa em diluições pré-estabelecidas (obtidas após padronização das amostras), em duplicatas e incubado por uma hora à 37°C.

Os poços foram lavados com 200 µL de PBS-T-G (PBS + Tween 20+ Gelatina: 200 mL de PBS 5x; 500 µL de Tween 20; 2,5g de gelatina e completado com água destilada para 1 L) por 3 vezes, com a posterior remoção do excesso de líquido. A seguir, fez-se a incubação por uma hora a 37 °C com conjugado anti-imunoglobulina IgG de coelho, feito em cabra, marcado com peroxidase (anticorpo secundário: Peroxidase-Labeled Affinity Anti-Rabbit/ Goat, KPL, EUA). Após mais 3 lavagens com PBS-T-G, a reação foi revelada, utilizando a peroxidase como enzima. A reação foi lavada com tampão citrato fosfato no escuro de 2 a 3 min e após o bloqueio com solução de H₂SO₄ 6 N, procedeu-se a leitura em leitor de microplaca com absorvância em 492 nm (Duarte, 2000).

As leituras de densidade ótica do ELISA foram realizadas em leitor de microplacas (Bio-Rad, Modelo 680 series Microplate Readers, EUA). Para validação do ensaio foram utilizadas 2 repetições de cada amostra e o desvio padrão analisado para verificação de possíveis discrepâncias entre as reações. Os valores de densidade ótica das amostras foram transferidos para a curva-padrão determinada com a utilização do padrão humano e, dessa forma, obtivemos a quantificação da proteína estudada. Os resultados para a quantificação proteica em polpas sadias e inflamadas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para detecção de diferenças entres os grupos foi usado o teste de Tukey com um nível de significância de 5%.

5.RESULTADOS

5.1 Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real

5.1.1. Quantificação do RNA extraído

Uma alíquota de 2µL foi utilizada para determinar a concentração de RNA extraído das amostras, através de espectrofotometria (Tabela 01).

Tabela 01: Quantificação do RNA (ug.mL⁻¹).

<i>Amostras</i>	<i>RNA/ sadia</i>	<i>RNA/inflamada</i>
1	519	126
2	331	249
3	166	186
4	471	68*
5	525	104
6	196	169
7	131	141
8	211	74
9	170	115
10	139	197

* Amostra com menor quantificação

5.1.2. Corridas

Após quantificado do RNA, as amostras foram tratadas com enzima DNase, com volume proporcional a cada amostra e em seguida, foi realizada em um único momento experimental, a transcrição reversa.

As corridas para PCR em tempo real, realizadas no aparelho Rotor Gene 3000 (Corbett Life Science, Qiagen, EUA), apresenta gráficos (Figura 02) evidenciando

a amplificação do gene estudado. A Figura mostra também a linha do Threshold, que significa o ponto de detecção. O ponto de detecção deve estar na curva ascendente e não no platô, onde pode haver estagnação da reação pela ausência de reagentes. Ainda na Figura 02, observa-se o controle negativo (seta preta), com a substituição do cDNA por água estéril. Essa amostra é chamada de NTC (“No template Control”), ou seja, uma amostra que não contém o alvo, utilizada para verificar a qualidade da amplificação.

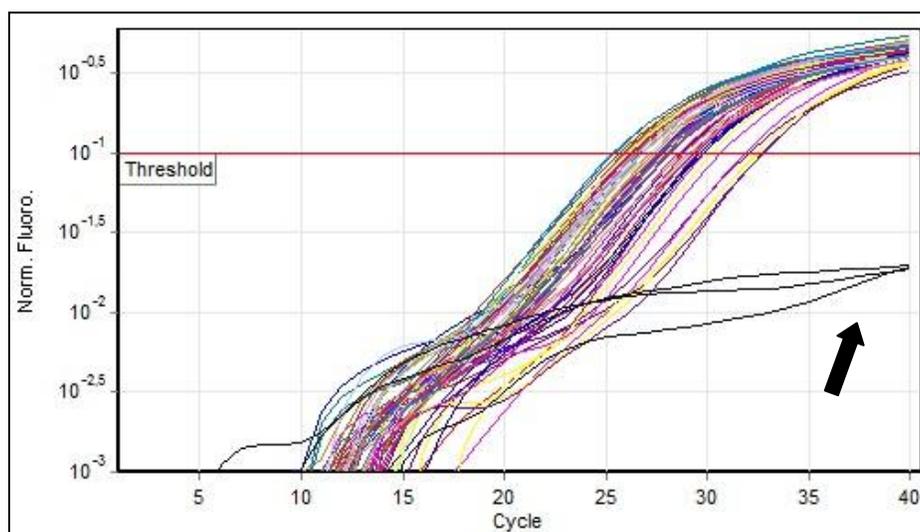


Figura 02: Dados da quantificação de TIMP-2 (FAM). Seta preta: controle negativo (água).

Com a definição do ponto de detecção, ou “threshold”, obteve-se o C_t , ou Ciclo threshold. O ciclo threshold é o número do ciclo na qual a fluorescência passa o ponto de detecção.

Com os valores de C_t (Apêndice 02) foi feita a análise descrita por Livak & Schmittgen (2001), também chamada de método C_t comparativo ou Método $\Delta\Delta C_t$.

O ΔC_t foi calculado a partir da fórmula abaixo, sendo os genes alvos da pesquisa: MMP-2, MMP-9 e TIMP-2; e o gene endógeno, a subunidade 18S do RNA_r.

$$\Delta C_t = C_t (\text{gene alvo}) - C_t (\text{gene endógeno})$$

Os valores de ΔC_t foram obtidos somente para os genes alvos, que estão representadas na Tabela 02:

Tabela 02: Valores de ΔC_t

	MMP-2	MMP-9	TIMP-2
Sadia	11,156	16,595	11,292
Inflamada	12,071	12,068	11,435

Com o valor do ΔC_t , foi realizado o cálculo do $\Delta \Delta C_t$ a partir da fórmula abaixo e e para finalizar a análise, a formula $2^{-\Delta \Delta C_t}$ foi utilizada. Os dados finais estão respresentados na Tabela 03.

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_t (\text{inflamada}) - \Delta C_t (\text{sadia})$$

Tabela 03: Valores finais dos dados

	MMP-2	MMP-9	TIMP-2
$\Delta \Delta C_t$	0,914	- 4,526	0,143
$2^{-\Delta \Delta C_t}$	-1,829	9,053	- 0,286

Dessa forma, foram obtidos os seguintes resultados:

1. MMP-2 está 1,83 vezes menos expesso na amostra inflamada em relação à sadia;
2. MMP-9 está 9,05 vezes mais expesso na amostra inflamada em relação à sadia;
3. TIMP-2 está 0,28 vezes menos expesso na amostra inflamada em relação à sadia.

5.2 Mieloperoxidase

Após o descongelamento do tecido pulpar, cada amostra foi pesada em uma microbalança (Tabela 04).

Tabela 04: Peso em gramas de cada amostra

<i>Amostras</i>	<i>Peso/Sadia</i>	<i>Peso/ Inflammada</i>
1	0,0036	0,0166
2	0,0070	0,0138
3	0,0093	0,0024
4	0,0210	0,0070
5	0,0055	0,0022
6	0,0056	0,0122
7	0,0184	0,0056
8	0,0085	0,0042
9	0,0093	0,0013
10	0,0191	0,0033

A curva padrão para o ensaio MPO, utilizando-se somente neutrófilos humanos já previamente separados, está representada no Figura 03 e as especificações dos pontos utilizados na curva estão na Tabela 05, com o número de células utilizadas, a densidade ótica (Abs-450nm) e a concentração (cel/ μ L) encontrada.

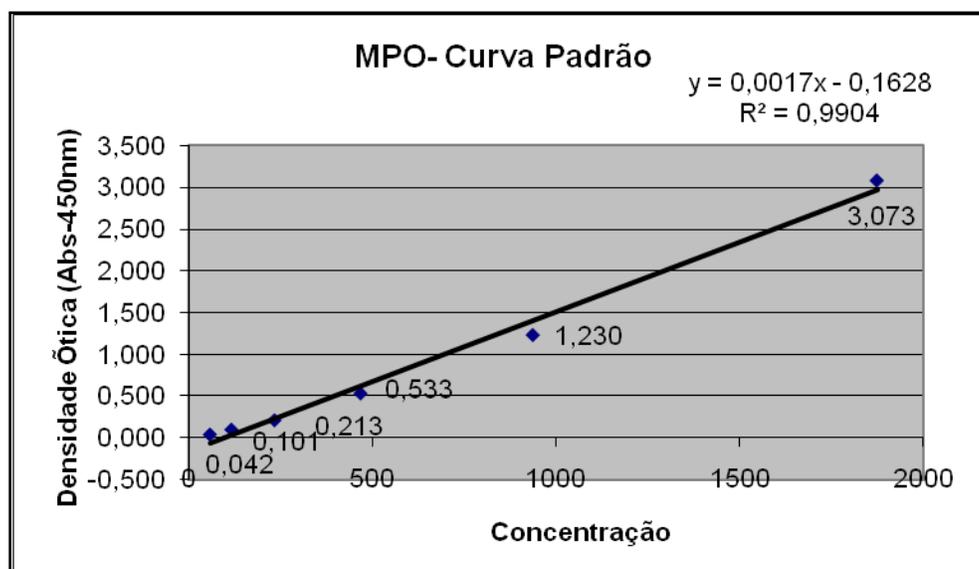


Figura 03: Curva padrão para MPO

Tabela 05: Especificações dos pontos da curva padrão para MPO

Número de células/poço	Densidade Ótica (DO) (Abs- 450nm)	Concentração (cel/μL)
1875*	3,07	1903*
938	1,23	819
469	0,53	409
235	0,21	221
117*	0,10	155*
59*	0,04	120*

Os resultados da análise de MPO para as amostras de tecido pulpar estão especificados na Tabela 06. O resultado da quantificação da proteína MPO evidenciou para algumas amostras inflamadas, caracterizadas clinicamente, um padrão similar ao encontrado para polpas saudáveis. Entretanto, outras amostras

inflamadas apresentaram alto índice de MPO, caracterizando assim maior presença de neutrófilos. Salienta-se que todas as amostras inflamadas apresentaram os mesmos sintomas clínicos.

Tabela 06: Densidade Ótica (DO/Abs-450nm) e Concentração (cels/ul) correspondente à mieloperoxidase das amostras sadias e inflamadas.

Amostras	Sadias		Inflamadas	
	DO	Conc (cel/ μ L)	DO	Conc (cel/ μ L)
1	-0,01	90	0,19	208
2	-0,002	95	-0,009	90
3	-0,009	91	0,0017	105
4	-0,009	90	-0,007	92
5	-0,002	95	-0,007	92
6	-0,009	90	0,230	231
7	-0,005	93	-0,001	95
8	-0,009	91	0,673	492
9	-0,009	91	0,002	97
10	-0,009	90	0,018	106

5.3 Zimograma

O volume de cada amostra para a corrida eletroforética foi baseado na quantificação protéica total lida em um leitor de ELISA (Versa Max Tunable Microplate Reader, Molecular Device, EUA) segundo a técnica de Bradford (Bradford, 1976). Para tal análise foi feita uma curva padrão de BSA e as amostras foram correlacionadas com a curva padrão. A Figura 04 demonstra um exemplo

de curva padrão de BSA. A partir da absorbância lida, com 595nm, é calculado a quantidade total de proteína em cada amostra. Com a quantidade de proteína estabelecida, foram feitos cálculos de volume para que cada poço do gel eletroforético contenha a mesma quantidade total de proteína.

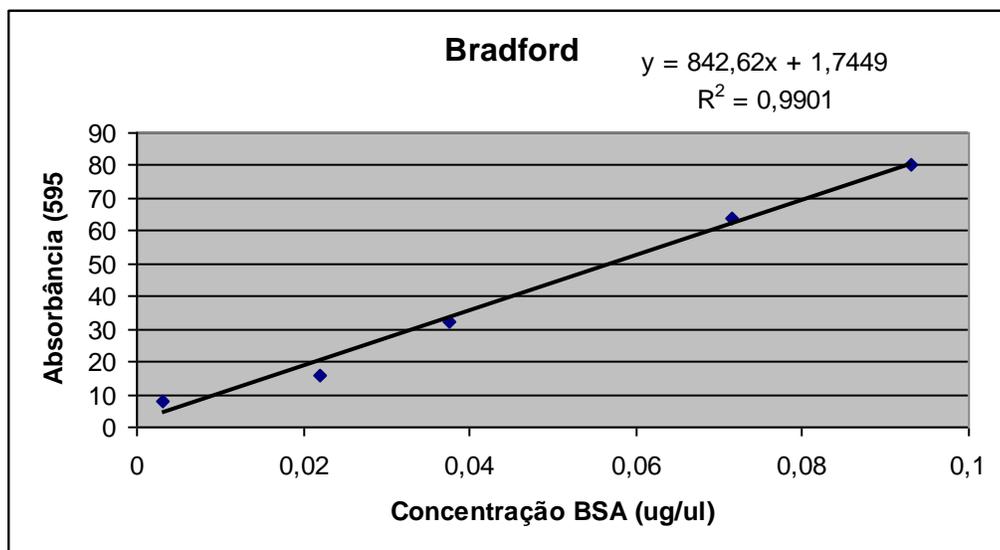


Figura 04: Curva Padrão de BSA

Já a Figura 05 demonstra o padrão zimográfico encontrado para amostras de tecido pulpar humano sadio e inflamado. Foi possível observar uma diversidade da expressão protéica em polpas inflamadas (Fig 05, 7-11), o contrário do que ocorre para amostras sadias (Fig 05, 2-5), onde há uma uniformidade no padrão zimográfico, com a presença de bandas de pró-MMP-2 (72kDa, de acordo com o padrão de peso molecular- Fig 05-1)

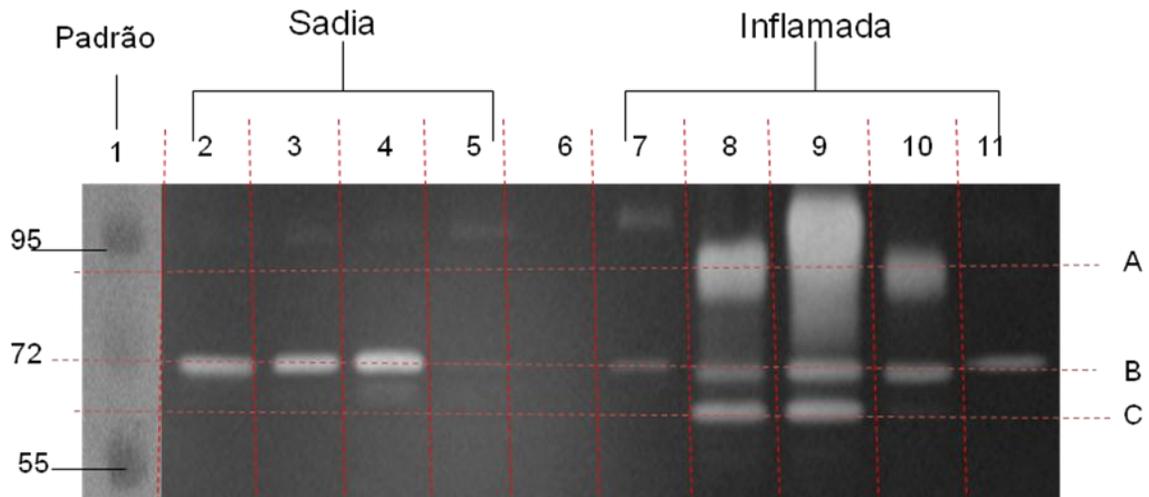


Figura 05: Zimografia em gel de poliacrilamida 10% para amostras de tecido pulpar humano sadio e inflamado. 1) marcador de peso molecular; 2-5) amostras sadias, onde podemos observar a uniformidade do padrão de bandas de pró-MMP-2, com um peso molecular de 72kDa (B); 7-11) amostras inflamadas, com um padrão de expressão de metaloproteinases diversificado. Observamos bandas de MMP-9 (peso molecular de 92kDa:A), pró MMP-2 (peso molecular de 72kDa:B) e MMP-2 ativa (peso molecular de 66kDa:C).

A análise da densidade das bandas foi feita através do software “Kodak Digital Science” (Kodak, EUA). Os valores foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Observamos que: a) para o grupo de polpas sadias, a proteína com maior atividade gelatinolítica foi a pró-MMP-2, enquanto que polpas inflamadas, a MMP-9 ativa apresentou a maior atividade; b) no grupo de polpas inflamadas, a atividade da MMP-9 ativa foi significativamente maior ($p=0,00081$) quando comparada com MMP-2 ativa e, c) ausência de MMP-9 no grupo sadio.

Também foi possível observar através desta técnica, uma diversidade da expressão protéica em polpas inflamadas, o que reflete diferentes condições inflamatórias do tecido pulpar no momento da coleta, apesar da concordância de sintomas clínicos apresentados pelos pacientes.

5.3.1 Correlação entre os dados de MPO e atividade gelatinolítica da MMP-9

Individualizando-se as amostras, foi possível observar uma concordância entre os valores positivos de densidade ótica para MPO e bandas de MMP-9 na zimografia do mesmo paciente. Os dados da MPO e MMP-9 foram correlacionados através do Teste de Pearson com um nível de significância de 5%. Entretanto, não houve uma correlação estatisticamente significativa entre os dados de MPO e MMP-9.

5.3.2 Ensaio de Inativação das MMPs

A Figura 06 demonstra os resultados encontrados para o ensaio de inibição das MMPs, onde podemos observar na coluna 1, o padrão de peso molecular de proteínas Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas, EUA), mostrando bandas de 92kDa e 72 kDa. As colunas 2 e 3, da Figura 06, representam o grupo controle com amostras inflamada e sadia, respectivamente. Nestes controles podemos observar para a amostra inflamada (coluna 02), a presença de MMP-9 (92 kDa - banda A) e de bandas de pró-MMP-2 na forma zimógeno (72kDa - banda B) e ativa (66kDa - banda C) e na coluna 03, o padrão de expressão de polpas sadias, onde observamos bandas de pró-MMP-2 (72kDa). Para o primeiro inibidor de metaloproteinases, EDTA, situado nas colunas 4 e 5, polpas inflamada e sadia respectivamente, observamos uma inibição da expressão destas metaloproteinases. O mesmo ocorreu para o inibidor fenaltrolina, coluna 6 para polpa inflamada e coluna 7 para sadia. Estes resultados de inibição específica confirmam que as proteínas encontradas na técnica zimográfica são realmente MMPs.

Para o inibidor de serinaproteases, o PMSF, situado na coluna 8 para polpa inflamada e coluna 9 para polpa sadia, não houve a inibição da banda expressada, sendo comparada ao grupo controle.

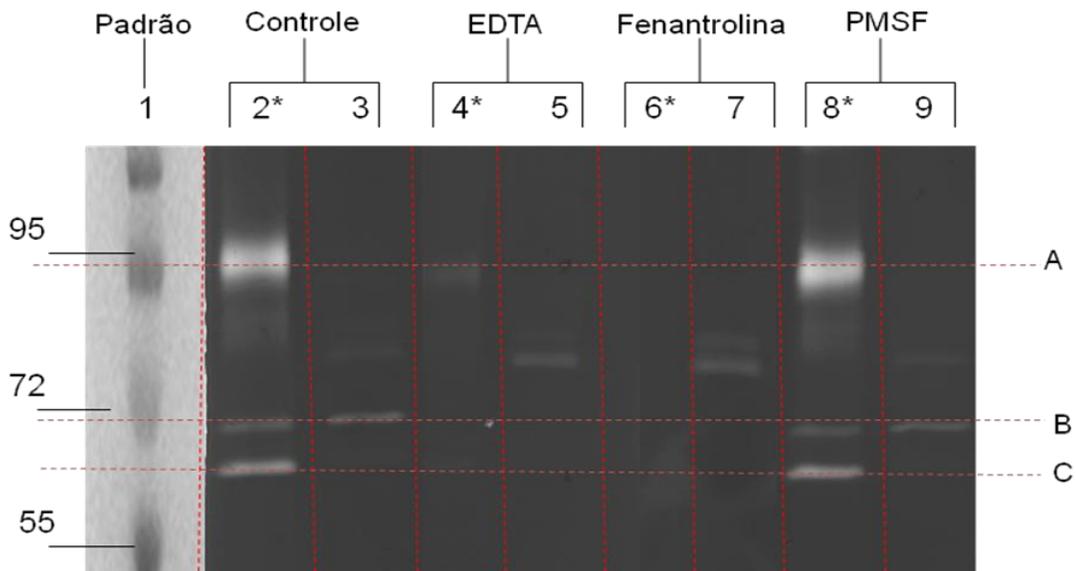


Figura 06: Zimografia em gel de poliacrilamida 10% para amostras de tecido pulpar humano sadio e inflamado. 1) marcador de peso molecular de proteínas; 2) e 3) amostras controle para polpa inflamada* e sadia; 4) e 5) EDTA para polpa inflamada* e sadia; 6) e 7) Fenantrolina para polpa inflamada* e sadia e 8) e 9) PMSF para polpa inflamada* e sadia. Observamos bandas de MMP-9 (peso molecular de 92kDa:A), pró-MMP-2 (peso molecular de 72kDa:B) e MMP-2 ativa (peso molecular de 66kDa:C)

5.4 Quantificação das gelatinases e de TIMP-2 por ELISA

5.4.1. Reações cruzadas entre anticorpos/ antígenos

Todos os antígenos foram testados para todos os anticorpos para verificar reações cruzadas, de acordo com Duarte (2006). Os valores de densidade ótica e a porcentagem correspondente estão descritos na Tabela 07. Verificamos uma alta reação cruzada entre o antígeno MMP-9 contra o anticorpo MMP-2. Devido a este fator, os dados de MMP-2 e MMP-9 foram inviabilizados e não considerados nos resultados, visto à impossibilidade de diferenciar as gelatinases.

Tabela 07: Porcentagem de reação cruzada e densidade ótica*

	Ac MMP-2	Ac MMP-9	Ac TIMP-2
Ag MMP-2	100% (0,041*)	0,06% (0,044*)	0,30% (0,005*)
Ag MMP-9	84% (0,056*)	100% (0,068*)	13% (0,009*)
Ag TIMP-2	17% (0,051*)	16% (0,047*)	100% (0,577*)

5.4.2 Curva Padrão Inicial de TIMP-2

Os valores de Densidade Ótica (D.O.), lidos em absorvância de 492nm e concentração do antígeno estão descritos na Tabela 08 e representadas na Figura 07.

Tabela 08: Especificações de concentração do antígeno e DO para a curva padrão do ELISA.

Concentração do Ag (pg/μL)	TIMP-2 (DO)
160	0,105
80	0,051
40	0,033
20	0,02
10	0,011

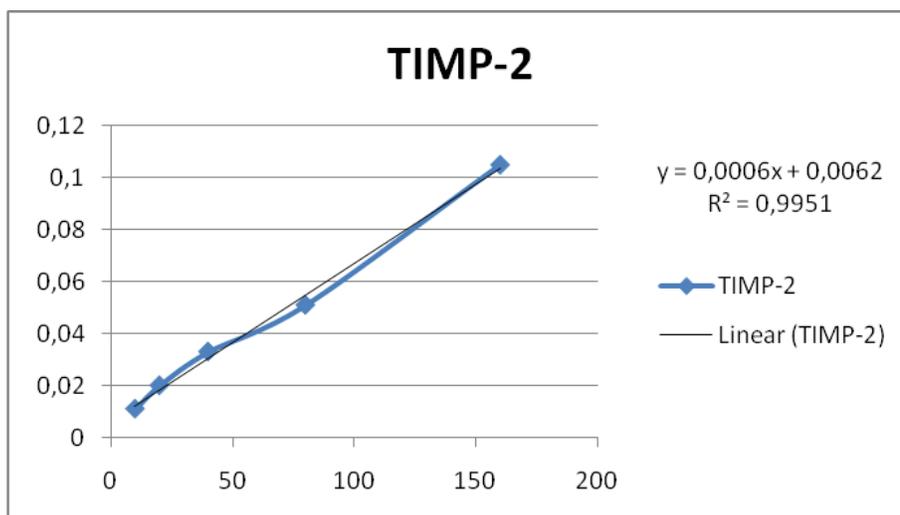


Figura 07 : Curva padrão para a proteína TIMP-2

O resultado para a quantificação da proteína TIMP-2 para o grupo sadio e inflamado, representado na Tabela 09, foi submetido à análise de variância (ANOVA) e para a detecção de diferenças entre os grupos, o teste de Tukey foi usado com um nível de significância de 5%. Os valores absolutos evidenciaram TIMP-2 em polpas inflamadas quando comparadas com polpas sadias. E entre os grupos sadio e inflamado, houve diferença estatisticamente significativa para TIMP-2 ($p < 0,0039$) com maiores valores para polpas inflamadas.

Tabela 09: Valor médio da Densidade Ótica (D.O.) e Desvio Padrão correspondentes às proteínas MMP-2/MMP-9 e TIMP-2.

TIMP-2	
Sadias	0,028 (+/- 0,015*)b
Inflamadas	0,157 (+/- 0,121*)a

*Em uma mesma coluna, valores seguidos de letras minúsculas desiguais indicam diferença estatisticamente significativa.

6. DISCUSSÃO

A resposta inflamatória, de um modo geral, envolve alterações na permeabilidade vascular, no fluxo sanguíneo, saída de proteínas plasmáticas para espaços extravasculares, marginação, migração e acúmulo de leucócitos na região agredida, além de uma degradação da matriz extracelular (D'Angelo, 1982).

A cárie dental constitui o principal fator desencadeante de uma resposta inflamatória pulpar. A permeabilidade dentinária é determinante para uma resposta inflamatória na polpa, pois permite que microrganismos e substâncias biologicamente ativas, presentes numa lesão de cárie, alcancem o órgão pulpar (Yu & Abbott, 2007). Portanto, quando o processo de cárie atinge a dentina, inicia-se no tecido pulpar uma resposta inflamatória.

A sequência inicial de eventos em uma pulpite envolve uma vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular da microcirculação, com consequente exsudação de líquidos para o tecido. A perda do plasma torna o sangue viscoso provocando a diminuição da velocidade do fluxo (estase) e aparecimento de marginação, diapedese e migração de neutrófilos para o local da inflamação. Seguindo o processo inflamatório, delineado por mediadores químicos, células como macrófagos, linfócitos, plasmócitos, mastócitos são recrutados para o tecido inflamado. O processo inflamatório se estabelece no tecido de uma forma gradual, de acordo com a continuidade do estímulo devido à presença do agente agressor e consequente produção de mediadores químicos.

Há diversos trabalhos demonstrando que mediadores inflamatórios têm importante papel no estímulo da produção de MMPs por diferentes células como fibroblastos, neutrófilos, macrófagos, entre outras (Sternlicht & Werb, 2001; Accorsi-Mendonça et al., 2005). Tjaderhane et al. (2001), em um trabalho de revisão, mostraram que TNF- β -1 atua como um potente regulador da expressão de MMPs em cultura primária de odontoblastos. Esses autores descreveram uma diminuição acentuada na expressão de MMP-8, pequena diminuição na MMP-20 e

aumento expressivo da MMP-9. Nenhuma alteração, entretanto, foi observada na expressão de MMP-2.

Produtos bacterianos também podem estimular a produção de MMPs. Tanabe & Grenier (2008), evidenciaram que o lipolissacarideo (LPS) de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* pode induzir macrófagos, alterando a secreção de MMP-9, fator de necrose tumoral- α e interleucina 1- β . Chang et al. (2002), determinaram o efeito de *Porphyromonas endodontalis* e *Porphyromonas gingivalis*, chamadas de bactéria pigmentadas pretas, na produção e secreção de MMPs através da cultura celular de macrófagos. Os resultados indicaram a presença de MMP-2 e um aumento de expressão desta gelatinase sendo tempo e dose dependente. Para MMP-9, entretanto, não houve alteração na sua expressão com a presença desses fluidos bacterianos. Deste modo, a produção e ativação de MMPs, induzidas por substâncias de origem microbiológicas, pode ser uma das diferentes vias de degradação na patogênese de lesões pulpares e periapicais.

A resposta celular de produção de uma MMP frente a um estímulo inicia-se pela transcrição. Para tal, a análise da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real nos permite verificar variações no RNA mensageiro. Neste estudo, observou-se uma relação 9 x maior de expressão de RNA_m para MMP-9 em polpas inflamadas quando comparadas às polpas sadias. Tsai et al. (2005), observaram resultados similares para MMP-9 utilizando o PCR semi-quantitativo.

Em tecidos inflamados, ocorre um aumento da atividade de MMP-2 (Han et al, 2001). Nos resultados encontrados nesse trabalho, observa-se a presença de pró-MMP-2 em polpas sadias e uma ativação da MMP-2 em polpas inflamadas. Contudo, o aumento da atividade gelatinolítica não foi acompanhada pelo aumento da expressão gênica de MMP-2 para o grupo de polpas inflamadas.

O ELISA é uma técnica baseada na reação antígeno/anticorpo. Em nossos resultados, os valores proteicos de TIMP-2 são estatisticamente maiores em polpas inflamadas quando comparadas às sadias. Para gelatinases, a alta reação cruzada entre os anticorpos impossibilitou o uso dos resultados. O trabalho de Shin et al. (2002), avaliaram a expressão proteica de MMP-1, MMP-2 e MMP-3,

através de ELISA, com anticorpos monoclonais, em polpas inflamadas e em lesões periapicais, tendo como grupo controle polpas sadias. Os autores evidenciaram valores maiores de MMP-1, MMP-2 e MMP-3 durante a inflamação pulpar.

Gusman et al. (2002), evidenciaram maiores valores proteicos de MMP-2 em polpas sadias quando comparadas à inflamadas. Entretanto, esse estudo utilizou um kit de ELISA onde somente a pro-MMP-2 ou ainda MMP-2 ligada a TIMP-2 era detectada. A enzima MMP-2 ativada não foi detectada nesse estudo. Dessa forma, a MMP-2 ativada em polpa inflamadas não pode ser detectada no ELISA. Ainda de acordo com Gusman et al., houve a alta quantificação absoluta de MMP-9 em polpa inflamadas e a correlação positiva com a atividade gelatinolítica sugere que a MMP-9 tem um importância na degradação do tecido pulpar em processos inflamatórios.

Em nível transcricional, não observamos aumento da expressão de RNAm para MMP-2 e TIMP-2 para polpas inflamadas. Entretanto, há maiores valores proteicos de TIMP-2 para polpas inflamadas quando comparadas a sadias, visualizado em ELISA. Essa diferença de resultados entre transcrição e tradução pode ser explicada no fato de que a proteína pode ser produzida e armazenada em vacúolos intracelulares (Sternlicht & Werb, 2001). Dessa forma, mediadores da inflamação atuam estimulando a liberação dessas proteínas armazenadas em “lisossomas”.

Já a zimografia evidencia a atividade proteica das MMPs. Nesta técnica, diferencia-se bandas de MMPs ativas e inativas (presença do domínio pro/zimógeno). Os resultados encontrados neste trabalho pela zimografia estão de acordo com Gustman et al. (2002), ou seja, uma elevada atividade de MMP-9 ativa em polpas inflamadas. Sabe-se a MMP-9 ou gelatinase B está diretamente envolvida no processo inflamatório pulpar, bem como na inflamação em outros tecidos conjuntivos (Birkedal-Hansen, 1993). Nesse estudo, observa-se ainda bandas de MMP-2 ativa, o que coincide com os dados na literatura de que a inflamação provoca a ativação da proteína MMP-2 (Han et al., 2001).

Em nosso estudo, quando foi analisado em zimografia as bandas formadas pela MMP-9 em amostras inflamadas de forma individualizada, evidenciaram uma diversidade na sua expressão, sugerindo que haja uma diferença na quantidade ou intensidade do estímulo que gera a produção dessa proteína, apesar dos sintomas clínicos apresentados pelos pacientes serem similares no momento da coleta.

A seleção das amostras inflamadas se baseou exclusivamente em critérios clínicos, isto é, presença de dor espontânea sem alteração radiográfica na região periapical. Sabe-se, entretanto, que não é possível estabelecer uma relação direta entre os sintomas clínicos e o quadro inflamatório observado em microscopia de luz (Araujo, 1981; D'Angelo, 1982, Leonardo, 2005). Para que fosse possível confirmar a presença de um quadro inflamatório na polpa, foi realizado uma análise da proteína mieloperoxidase (MPO), que é exclusiva de neutrófilos. Resultados positivos para essa proteína caracterizam, portanto, um quadro inflamatório com presença de neutrófilos. Houve uma correlação visual direta entre a presença de bandas da MMP-9 ativa e a presença de MPO na mesma amostra. Interessante observar nos resultados apresentados, é que em algumas amostras coletadas de paciente com dor e classificadas como inflamadas, a análise de MPO mostrava-se negativa, mesmo havendo um quadro clínico sintomático. Esse resultado confirma a ausência de correlação entre os sintomas clínicos e a presença de células inflamatórias na polpa. Provavelmente, a dor esteja associada à pressão intrapulpal que ocorre nas fases iniciais da inflamação devido ao aumento da permeabilidade capilar, sem que tenha ocorrido ainda a migração de células para o conjuntivo. Outra possibilidade é a estimulação direta de terminações nervosas por secreção mais intensa de mediadores químicos específicos de dor ou pela presença de determinadas toxinas bacterianas.

Quando a inflamação está presente no tecido pulpar, há ativação da MMP-2 conforme demonstrado na zimografia. A ativação da pro-MMP-2 pode ocorrer com a formação de um complexo único envolvendo a MMP-14 e a TIMP-2. Este complexo é formado pela ligação da TIMP-2 ao sítio catalítico da MMP-14. A pro-

MMP-2 secretada então se liga ao domínio C-terminal da TIMP-2 e é ativada por clivagem por uma segunda molécula de MMP-14 (Zucker et al., 1994). Entretanto, um excesso de TIMP-2 previne o processo de ativação de MMP-2 pela inibição da segunda molécula de MMP-14 (Nagase et al., 2006). A proteína TIMP pode, portanto, atuar como um modulador, ativando ou inibindo MMPs. Essa ação moduladora da TIMP-2 sobre a MMP-2 parece ser mais adequada em relação aos resultados desse estudo, pois observa nas amostras inflamadas um aumento na expressão tanto da MMP-2 como da TIMP-2 e mesmo assim constata a presença de MMP-2 ativa em diversas amostras.

Estudos futuros envolvendo outras MMPs participantes no processo de degradação tecidual, através de diferentes estímulos, podem contribuir para esclarecer o processo inflamatório pulpar

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e frente às metodologias empregadas, é possível concluir que:

- ✓ A proteína MMP-2, em polpas inflamadas, tornou-se ativa mesmo com o aumento da produção de TIMP-2.
- ✓ O aumento em níveis proteicos para TIMP-2 na inflamação, não foi acompanhado do aumento do RNA_m para este genes;
- ✓ Em processos inflamatórios, as MMP-2 e MMP-9 foram encontradas de forma ativa, o que nao ocorre em polpas sadias;
- ✓ Não houve correlação entre sintomatologia e presença da proteína mieloperoxidase ou atividade gelatinolítica em polpas inflamadas.

REFERÊNCIAS*

- 1 Accorsi-Mendonça T, Paiva KB, Zambuzzi WF, Cestari TM, Lara VS, Sogayar MC *et al.* Expression of matrix metalloproteinase -2 and -9 and RECK during alveolar bone regeneration in rat. *J Mol Histol.* 2008 Apr; 39(2):201-8.
- 2 Accorsi-Mendonça T, Zambuzzi WF, da Silva Paiva KB, Pereira Lauris JR, Cestari TM, Taga R *et al.* Expression of metalloproteinase 2 in the cell response to porous demineralized bovine bone matrix. *J Mol Histol.* 2005 May;36(4):311-6.
- 3 Araújo VC, Araújo NS, Marcucci G, Magalhães J. Aspectos clínicos e histopatológicos de 103 polpas dentais humanas. *Rev. Paul. Endod.* 1981; 2(3).
- 4 Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 2002 Oct 1;115(Pt 19):3719-27. Review
- 5 Bas A, Forsberg G, Hammarström S, Hammarström ML. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, β -actin and Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 2004 Jun;59(6):566-73.
- 6 Birkedal-Hansen H, Yamada S, Windsor J, Pollard AH, Lyons G, Stetler-Stevenson W *et al.* Matrix Metalloproteinases. *Curr Protoc Cell Biol.* 2008 Sep;Chapter 10:Unit 10.8.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do Internacional Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- 7 Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol.* 1993 May;64(5 Suppl):474-84. Review.
- 8 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic Biochem* 1976; 72:248-54.
- 9 Chang Y, Lai C, Yang S, Chan Y, Hsieh Y. Stimulation of matrix metalloproteinases by black-pigmented *Bacteroides* in human pulp and periodontal ligament cell cultures. *J Endod.* 2002 Feb;28(2):90-3.
- 10 Chang YC, Yang SF, Hsieh YS. Regulation of matrix metalloproteinase-2 production by cytokines and pharmacological agents in human pulp cell cultures. *J Endod.* 2001 Nov;27(11):679-82
- 11 Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL *et al.* H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem.* 1988 May 15;263(14):6579-87
- 12 Crawford HC, Matrisian LM. Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *Invasion Metastasis.* 1994-1995;14(1-6):234-45
- 13 Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol.* 1999 Nov;189(3):300-8. Review.
- 14 Czechowski T, Bari RP, Stitt M, Scheible WR, Udvardi MK. Real-Time RT-PCR profiling of over Arabidopsis transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *Plant J.* 2004 Apr;38(2):366-79
- 15 D' Angelo MGB. Ocorrência de fenômenos imunológicos na polpa dental humana e sua correlação com os aspectos clínicos e histológicos (Dissertação). Piracicaba: UNICAMP/FOP; 1982.
- 16 Duarte KMR. A fast immunoassay for screening of alfa-trenbolone in bovine urine. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 2006; 43:74-79.

- 17 Duarte KMR. Anticorpos monoclonais e policlonais para identificação do tobamovírus do mosaico do tomateiro (ToMV) em plantas de tomate (Tese). Piracicaba: USP/ESALQ; 2000.
- 18 Estrela C, Figueredo JAP. Endodontia: princípios biológicos e mecânicos. São Paulo: Artes Médicas; 1999.
- 19 Gusman H, Santana RB, Zehnder M. Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. *Eur J Oral Sci.* 2002 Oct;110(5):353-7.
- 20 Han YP, Tuan TL, Wu H, Hughes M, Garner WL. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci.* 2001 Jan;114(Pt 1):131-139.
- 21 Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand.* 2007 Feb;65(1):1-13.
- 22 Harper E, Block KJ, Gross J. The zymogen of tadplode collagenase. *Biochemistry.* 1971 Aug 3;10(16):3035-41.
- 23 Herron GS, Banda MJ, Clark EJ, Gavrilovic J, Werb Z. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. *J Biol Chem.* 1986 Feb 25;261(6):2814-8.
- 24 Howard EW, Bullen EC, Banda MJ. Preferential inhibition of 72 and 92 kDa gelatinase by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J Biol Chem.* 1991 Jul 15;266(20):13070-5
- 25 Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia Celular e Molecular.* Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 2000.
- 26 Kähäri VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor growth and invasion. *Ann Med.* 1999 Feb;31(1):34-45. Review.
- 27 Leonardo MR. Endodontia- Tratamento de Canais Radiculares. Princípios Técnicos e Biológicos. São Paulo: Artes Médicas; 2005.

- 28 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8
- 29 Mullane KM, Kraemer R, Smith B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods*. 1985 Nov;14(3):157-67.
- 30 Murphy G, Docherty AJ. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992 Aug;7(2):120-5. Review.
- 31 Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. 2006 Feb 15;69(3):562-73. Epub 2006 Jan 5. Review
- 32 Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999 Jul 30;274(31):21491-4
- 33 Nakata K, Yamasaki M, Iwata T, Suzuki K, Nakane A, Nakamura H. Anaerobic bacterial extracts influence production of matrix metalloproteinases and their inhibitors by human dental pulp cells. *J Endod*. 2000 Jul;26(7):410-3.
- 34 O'Boskey FJ Jr, Panagakos FS. Cytokines stimulate matrix metalloproteinase production by human pulp cells during long-term culture. *J Endod*. 1998 Jan;24(1):7-10.
- 35 Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci*. 2003 Apr;111(2):117-27.
- 36 Salo T, Mäkelä M, Kylmäniemi M, Autio-Harmainen H, Larjava H.. Expression of matrix metalloproteinases-2 e -9 during early human wound healing. *Lab Invest*. 1994 Feb;70(2):176-82.
- 37 Shin SJ, Lee JI, Baek SH, Lim SS. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *J Endod*. 2002

- Apr;28(4):313-5
- 38 Souza AP, Line SRP. The biology of matrix metalloproteinases. Rev. FOB 2002 Jan/Mar; 10(1):1-6.
- 39 Souza AP. Efeito de íons metálicos divalentes sobre a atividade de metaloproteinases de matriz secretadas por células do tecido gengival. (Dissertação). Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2000.
- 40 Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol. 2001;17:463-516. Review.
- 41 Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. Anal Biochem. 1983 Jul 15;132(2):345-52.
- 42 Tanabe SI, Grenier D. Macrophage tolerance response to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide induces differential regulation of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and matrix metalloproteinase 9 secretion. J Periodontal Res. 2008 Jun;43(3):372-7. Epub 2008 Jan 17.
- 43 Thomas GT, Lewis MP, Speight PM. Matrix metalloproteinases and oral cancer. Oral Oncol. 1999 May;35(3):227-33.
- 44 Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. J Dent Res. 1998 Aug;77(8):1622-9.
- 45 Tjäderhane L, Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Salo T. Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). Adv Dent Res. 2001 Aug;15:55-8. Review.
- 46 Trowbridge HO, Emling RC. Inflamação – Uma revisão do processo. São Paulo: Quintessence Books; 1996.
- 47 Tsai CH, Chen YJ, Huang FM, Su YF, Chang YC. The upregulation of matrix metalloproteinase-9 in inflamed human dental pulps. J Endod. 2005 Dec;31(12):860-2
- 48 Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI.

- SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem*. 1989 Oct 15;264(29):17213-21. Erratum in: *J Biol Chem* 1990 Dec 25;265(36):22570.
- 49 Yu C, Abbott PV. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Aust Dent J*. 2007 Mar;52(1 Suppl):S4-16.
- 50 Zaia AA, Della Coletta R, Almeida OP, Line SR. Expression of collagen and elastic fibers in duct-ligated submandibular glands in mice. *Eur J Oral Sci*. 1996 Oct-Dec;104(5-6):627-9.
- 51 Zucker S, Hymowitz M, Conner C, DeClerck Y, Cao J. TIMP-2 is released as an intact molecule following binding to MT1-MMP on the cell surface. *Exp Cell Res*. 2004 Feb 1;293(1):164-74.

APÊNDICES

Apêndice 1: Ficha Clínica para Anamnese e Termo de consentimento do paciente
CEP/FOP

Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP
Programa de Pós-graduação em Clínica Odontológica

Identificação: n.º dente _____ n.º amostra _____

Nome: _____

Sexo _____ Idade _____ Estado Civil _____ Cor _____

Data de nascimento ____/____/____ Local _____

Endereço _____

_____ CEP _____ Telefone _____

Cidade _____ UF _____

Profissão _____

Queixa Principal: _____

Aspectos clínicos

1. Inspeção:

coroa íntegra () presença de restaurações ()

presença de lesões cariosas () polpa exposta ()

2. Dor

provocada () espontânea ()

localizada () difusa ()

ausente ()

3. Testes térmicos

dor ao frio normal ()

dor ao frio acentuada ()

dor ao frio muito acentuada) ()

4. Diagnóstico Clínico

Polpa normal () Pulpite reversível () Pulpite irreversível ()

Observações: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO ESPECÍFICO PARA A PESQUISA

Projeto de Pesquisa: **“Avaliação de metaloproteinases de matriz -2, MMP-9 e TIMP-2 em polpas dentais humanas sadias e inflamadas”**.

O objetivo da pesquisa é estudar alterações que ocorrem na polpa dental quando se encontra inflamada, através do estudo de mecanismos moleculares de remodelamento fisiológico e patológico nos tecidos pulpares. Isto poderá ajudar a entendermos o processo inflamatório pulpar, já que existem poucos dados que possam esclarecer essas alterações de forma eficiente.

A coleta de amostra é feita através da extração dental que será realizada independentemente da pesquisa, não existindo outro método alternativo para tal. Após a extração, os dentes serão levados para o laboratório de Endodontia dessa faculdade, para que suas polpas possam ser removidas através da divisão dos dentes ao meio. As polpas serão retiradas e passarão por processos de análise específicos. Os fragmentos remanescentes dos dentes serão desprezados em local adequado, pois não possuirão mais função para qualquer outra finalidade.

Você tem toda a liberdade de pedir esclarecimentos sobre a metodologia antes e durante a pesquisa, podendo ou não concordar em participar da mesma.

Se você se recusar a participar ou se você quiser desistir, em qualquer fase da pesquisa, não será penalizado e não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual continuará normalmente.

Apesar dos resultados da pesquisa serem divulgados publicamente para fins acadêmicos e científicos, será preservada a sua privacidade (seu nome não será revelado) quanto aos dados confidenciais que possam ser envolvidos na pesquisa.

Os danos, riscos ou desconfortos que vocês (os pacientes) podem sofrer são apenas aqueles decorrentes das extrações dentais que serão submetidos independentemente da realização ou não da pesquisa. A pesquisa não lhe acarretará nenhum gasto, e o acompanhamento e assistência aos pacientes serão de responsabilidade do operador da extração dental.

A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, escreva para o comitê de Ética em Pesquisa da FOP – UNICAMP. Endereço Av Limeira, 901 CEP/FOP 13414-900 – Piracicaba – SP.

TERMO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Declaro para os devidos fins que eu, _____, RGn: _____, me disponho a participar da pesquisa intitulada “**Avaliação de metaloproteinases de matriz -2, MMP-9 e TIMP-2 em polpas dentais humanas sadias e inflamadas**” e permito a divulgação dos resultados desta pesquisa. Estou ciente dos objetivos desta pesquisa e de todos os procedimentos e concordo com a metodologia para coleta de amostras pulpares do(s) dente(s) submetido(s) à extração, na Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP. Estou também ciente de minha liberdade de recusar a participar ou retirar o meu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem ser penalizado e sem prejuízo ao meu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.

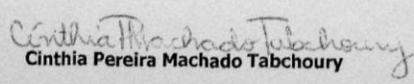
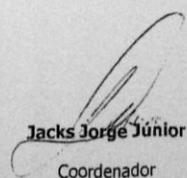
Assinatura: _____

Local e data: _____ / ____ / _____

Apêndice 2: Valores de Ct

Amostras	Sadias				Inflamadas			
	18S	MMP2	MMP9	TIMP2	18S	MMP2	MMP9	TIMP2
1	14,31	26,22	28,80	26,32	17,25	28,97	27,51	29,24
2	14,31	25,05	29,08	26,04	19,44	33,79	33,02	32,49
3	15,95	27,57	32,41	28,16	23,06	28,78	26,87	27,48
4	14,31	25,80	33,01	25,71	18,53	33,52	31,91	30,80
5	13,59	25,34	33,93	26,12	19,25	31,90	34,32	31,69
6	14,02	25,36	33,49	26,59	15,15	28,37	26,98	28,18
7	15,50	26,96	31,51	26,28	30,37	25,39	24,16	27,13
8	17,74	27,71	31,67	27,04	14,99	26,35	30,54	26,62
9	22,21	28,95	36,04	29,08	25,80	29,85	30,74	29,74
10	18,74	28,87	33,93	27,84	15,59	28,15	28,67	28,24
Média	15,39	26,54	31,98	26,68	17,91	29,98	29,98	29,34
DP	1,79	1,31	1,94	0,84	2,75	2,73	2,89	2,10

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética FOP

	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	
CERTIFICADO		
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Análise da expressão de metaloproteinases 2 e 9 em polpas humanas sadias e inflamadas", protocolo nº 040/2005, dos pesquisadores ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA e THAIS ACCORSI MENDONÇA, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 29/06/2005.</p>		
<p>The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "Analysis of metalloproteinases -2 and -9 expression in inflamed and healthy pulp", register number 040/2005, of ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA and THAIS ACCORSI MENDONÇA, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 29/06/2005.</p>		
 Cinthia Pereira Machado Tabchoury Secretária CEP/FOP/UNICAMP	 Jacks Jorge Júnior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP	
<p>O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. e: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.</p>		