

# **REVISÃO SISTEMÁTICA DOS MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DENTINÁRIA PELA AÇÃO DAS METALOPROTEINASES (MMPs)**

**Palavras-Chave: METALOPROTEINASES, MÉTODOS DE AVALIAÇÃO, DEGRADAÇÃO  
DENTINÁRIA**

**Autores/as:**

**Ana Letícia Garcia Baptista (UNICAMP)**

**MSc. Simone Gomes de Oliveira (UNICAMP)**

**Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar (UNICAMP)**

---

## **INTRODUÇÃO:**

Mesmo com a evolução dos sistemas adesivos das últimas décadas, com a finalidade de tornar a ligação do material restaurador ao tecido dentário mais estável e durável, a adesão em dentina ainda é um desafio a ser superado, diferentemente da adesão em esmalte. Isso ocorre principalmente por fatores inerentes ao próprio tecido dentinário, que possui mais matéria orgânica e água em sua composição em relação ao esmalte.

A camada híbrida é uma camada fina de dentina reforçada com resina, que deve ser capaz de manter o material restaurador, selando a interface dentina-resina e conferindo resistência às condições ácidas do meio bucal (NAKABAYACHI et al, 1991). Ao longo do tempo, as ligações resina-dentina, que formam a camada híbrida, sofrem degradação tanto na porção resinosa como na dentinária por sorção de água, hidrólise e lixiviação da resina (HASHIMOTO et al, 2003). Por sua vez, o colágeno dentinário sofre a ação de proteases do hospedeiro, como as metaloproteinasas (MMPs) e cisteína catepsinas (PASHLEY, 2004; SABATINI& PASHLEY, 2014;), e por produtos metabólicos de agentes externos, como bactérias.

As metaloproteinasas (MMPs) são enzimas proteolíticas dependentes de zinco e cálcio capazes de remodelar e degradar os tecidos da matriz extracelular, como o colágeno, elastinas, glicoproteínas da matriz e proteoglicanos. (KAPOOR et al, 2016). Essas enzimas estão associadas à quebra do colágeno e essa degradação pode ocorrer também em processos como a cárie e a erosão da dentina. Ao degradar o colágeno, essas proteases interferem de maneira negativa na interface adesiva criada entre o material restaurador e o tecido dentário. (CARRILHO et al, 2020).

Com o objetivo de criar microporosidades e favorecer à adesão em procedimentos restauradores adesivos, são utilizadas substâncias ácidas que condicionam o tecido, como o ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) a 37% (PERDIGÃO et al, 2020). A desmineralização superficial da dentina, promovida pelo condicionamento ácido expõe as fibrilas de colágeno e os túbulos dentinários, para que posteriormente sejam infiltrados pelos adesivos e formando a camada híbrida. (NAKABAYASHI et al, 1982). No entanto, os monômeros da resina não são capazes de infiltrar totalmente a camada de dentina desmineralizada, fazendo com que fibrilas de colágeno permaneçam expostas, desprotegidas e sujeitas à ação das proteases (MARAVIC et al, 2021). Assim, a exposição das fibrilas colágenas, associada à diminuição do

pH e à dissolução dos cristais de fosfato de cálcio criam condições para a ativação das MMPs e cisteíno-catepsinas (TJÄDERHANE et al, 1998; SULKALAL et al, 2001; CHAUSSAIN et al, 2013). As MMPs modificam as estruturas do colágeno desprotegido da matriz mineralizada, alteram as estruturas quaternária e terciária por desnaturação e a estrutura primária por clivagem (MAZZONI et al, 2014). Desta forma, a incompleta cobertura das fibras colágenas pelos polímeros resinosos, a degradação dos polímeros resinosos da camada híbrida e a desmineralização dentinária, decorrente de processos erosivos ou cariosos criam condições que levam à exposição de fibras colágenas, deixando-as susceptíveis à ação das enzimas proteolíticas (TJÄDERHANE et al, 2015; MAZZONI et al, 2017; CHAUSSAIN-MILLER et al, 2006).

As MMPs geralmente se encontram na forma inativa no tecido mineralizado. Elas se tornam ativas em pH ácido, como quando são utilizados agentes condicionantes como o ácido fosfórico a 37% ou nas condições que favorecem ao desenvolvimento das lesões cariosas (ALTINCI et al, 2018). Quando ativadas, as MMPs degradam as fibrilas de colágeno expostas levando à redução da resistência da união entre o material restaurador e o tecido dental (MARAVIC et al, 2019).

No intuito de melhorar a estabilidade das restaurações, pesquisadores têm estudado métodos que possam diminuir essa degradação através de métodos qualitativos que permitem identificar essas proteínas no substrato dentinário sob diferentes desafios experimentais (PRIYADARSHINI et al, 2016; ALTINCI et al, 2018; MARAVIC et al, 2021). Esses estudos utilizam em geral métodos qualitativos como a zimografia, microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão e confocal, associando-os entre si ou utilizando ainda métodos quantitativos. O objetivo deste estudo é realizar uma revisão sistemática dos estudos que utilizam os métodos qualitativos para avaliar a ação das MMPs em substratos dentinários acometidos por lesões cariosas e hígidos.

## **METODOLOGIA:**

O protocolo desta revisão sistemática foi registrado no International prospective register of systematic reviews (PROSPERO) sob número CRD42022300288, com o título “Methods of identification and quantification of hybrid layer degradation caused by the action of MMPs: a systematic review of in vitro studies”.

A busca das publicações foram realizadas nas bases de dados Pubmed, Scopus, Web of Science e OpenGray e utilizou a combinação dos termos collagen, dentin, degradation, metalloproteinases e cysteine-cathepsin e suas variações. As buscas foram construídas de acordo com a base de dados eletrônica consultada, não havendo restrição de tempo e de idioma. As buscas em todas as bases de dados eletrônicas, segundo a descrição no protocolo cadastrado no PROSPERO, foi realizada no dia 20.01.22.

A seleção dos estudos seguiu as orientações do Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA)<sup>3</sup> e foi realizada por dois autores. A seleção dos estudos foi feita inicialmente a partir da leitura do título e do resumo. Em casos de dúvida o texto completo do estudo foi lido na íntegra e caso a dúvida persistisse um terceiro avaliador auxiliou na seleção do estudo. Para a seleção foram utilizados como critérios de inclusão: estudo in vitro, avaliar a degradação da camada híbrida causada por metalloproteinases e/ou cisteína-catepsina; a avaliação da ação das enzimas ser realizada por método qualitativo em tecido dentinário cariado e ter um grupo controle (sem tratamento). Estudos que avaliavam agentes inibidores da ação enzimática ou com produtos ou substâncias experimentais não foram incluídos. Além disso, também foi realizada busca de forma manual das referências dos estudos selecionados. A extração de dados foi realizada para dados que caracterizassem as condições de obtenção e preparo dos substratos dentinários, características das enzimas proteolíticas e metodologias utilizadas. A etapa de avaliação da qualidade dos estudos seguirá o modelo proposto por Montagner e colaboradores (2014).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foram selecionados 43 artigos após a aplicação dos critérios de exclusão a partir dos 2347 estudos inicialmente capturados. A Tabela 1 apresenta a lista dos estudos segundo os métodos qualitativos mais frequentes nos estudos (zimografia (ZYM) e suas variações, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal (MC)).

Tabela 1: Estudos selecionados e métodos qualitativos utilizados.

| PRIMEIRO AUTOR         | REFERÊNCIA   | ZYM | MEV | MC |
|------------------------|--|-----|-----|----|
| Amaral SF              | Caries Res. 2018;52(1-2):113-118.                        | X   |     |    |
| Yu F                   | J Dent Res. 2020 Jul;99(7):813-819                       | X   |     |    |
| Pedrosa VO             | J Adhes Dent. 2020;22(3):285-296                         | X   |     |    |
| Carrilho MR            | Arch Oral Biol. 2020 Sep;117:104830.                     | X   |     |    |
| Altinci P              | Eur J Oral Sci. 2019 Feb;127(1):1-9.                     | X   | X   |    |
| Gu LS                  | J Dent Res. 2019 Feb;98(2):186-193.                      | X   |     | X  |
| Gu L                   | J Dent Res. 2018 Apr;97(4):409-415                       | X   |     | X  |
| Retana-Lobo C          | Materials (Basel). 2020 Feb 27;13(5):1053.               | X   | X   |    |
| Seseogullari-Dirihan R | Dent Mater. 2016 Mar;32(3):423-32.                       | X   |     | X  |
| DeVito-Moraes, A       | J Dent. 2016 Oct;53:30-7.                                | X   |     | X  |
| Cvikl B                | J Dent. 2018 Nov;78:51-58.                               | X   |     |    |
| Altinc P               | Caries Res. 2016;50(2):124-32.                           | X   | X   |    |
| Altinc                 | Arch Oral Biol. 2018 Dec;96:162-168.                     | X   | X   |    |
| Mazzon A               | J Dent Res. 2017 Jul;96(8):902-908.                      | X   |     | X  |
| Seseogullari-Dirihan R | Dent Mater J. 2018 Jun 8;37(3):445-452.                  | X   |     |    |
| Gobbi P                | Clin Oral Investig. 2021 Aug;25(8):5067-5075.            | X   | X   |    |
| Maravic T              | J Dent Res. 2021 Sep;100(10):1090-1098.                  | X   |     |    |
| Apolonio FM            | Eur J Oral Sci. 2017 Apr;125(2):168-172.                 | X   |     |    |
| Baena E                | Mar Drugs. 2020 May 18;18(5):263.                        | X   | X   |    |
| Liu Z                  | Arch Oral Biol. 2017 Nov;83:111-117.                     | X   |     | X  |
| Maravic T              | J Dent. 2018 Jan;68:85-90.                               | X   |     | X  |
| Maravic T              | Int J Mol Sci. 2021 Aug 17;22(16):8852.                  | X   |     |    |
| Wang Y                 | Materials (Basel). 2021 Jun 29;14(13):3637.              | X   | X   | X  |
| Chen W                 | Dent Mater. 2021 Oct;37(10):1498-1510.                   | X   |     | X  |
| Freitas PH             | J Dent. 2021 Jan;104:103550.                             | X   |     |    |
| Hass V                 | Dent Mater. 2016 Mar;32(3):468-75.                       | X   | X   | X  |
| Almahdy A              | Dent Mater. 2015 May;31(5):594-602.                      | X   |     | X  |
| Sun S                  | Int Endod J. 2018 Feb;51 Suppl 2:e157-e166.              | X   |     |    |
| Xu Q                   | Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2015 Mar;50(3):186-9.  |     | X   |    |
| Gezaw M                | J Mech Behav Biomed Mater. 2018 Feb;78:206-213.          |     | X   |    |
| Kim H                  | Nanomaterials (Basel). 2020 Nov 4;10(11):2203.           |     | X   |    |
| Alania Y               | J Biomech. 2020 Mar 5;101:109633.                        |     | X   |    |
| Barcellos DC           | Dent Mater. 2016 Jul;32(7):940-50.                       |     | X   |    |
| Sun Q                  | Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2016 Mar;51(3):148-53. |     | X   |    |
| Marashdeh M            | Int Endod J. 2019 Apr;52(4):416-423.                     |     | X   |    |
| Fawzy AS               | J Dent Res. 2017 Jul;96(7):780-789.                      |     | X   |    |
| Xie Y                  | J Prosthet Dent. 2019 Nov;122(5):492.e1-492.e6.          |     | X   |    |
| Kishen A               | Dent Mater. 2016 Aug;32(8):968-77.                       |     | X   |    |
| Tezvergil-Mutluay A    | J Dent Res. 2017 Aug;96(9):999-1005.                     |     | X   |    |

|                  |  |  |   |   |
|------------------|--|--|---|---|
| Priyadarshini BM | J Dent Res. 2016 Aug;95(9):1065-72.      |  | X |   |
| Bourgi R         | Polymers (Basel). 2021 Feb 26;13(5):704. |  | X |   |
| Daood U          | Dent Mater. 2021 Oct;37(10):1511-1528.   |  | X | X |
| Wang J           | J Dent Res. 2017 May;96(5):578-585.      |  | X | X |

Cerca de 83% dos estudos buscavam identificar as gelatinases (MMP-2 e MMP-9). A identificação das enzimas ocorreu tanto para a porção coronária como para a radicular. A abordagem qualitativa a partir de métodos quantitativos estava presente em cerca 56% dos estudos, utilizando para isso principalmente a zimografia, em cerca de 75% dos casos. A microscopia também foi utilizada para avaliação quantitativa. A escolha pela zimografia pode ser explicada pela capacidade do método em detectar a presença e a atividade das MMPs a partir da degradação dentinária, através de sua copolimerização ao gel. Outros métodos como a Microscopia de Força Atômica e análise de Micro-Raman também tem sido utilizados em conjunto com os métodos qualitativos mais frequentes.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos pelo emprego de metodologias qualitativas têm permitido avançar para o melhor conhecimento do comportamento dentinário frente às condições fisiológicas e da doença cárie. O tecido dentinário apresenta condições inerentes ao hospedeiro que favorecem à ação das enzimas proteolíticas como as MMPs e as cisteíno-catepsinas. As técnicas qualitativas mais utilizadas para identificar a presença das MMPs no substrato dentinários zimografias, que se baseiam na estrutura destas enzimas e nas interações entre as enzimas e a superfície do substrato. As MMPs mais frequentemente identificadas são as MMP-2 e MMP-9, que são gelatinases. Mas também já foram identificadas outras MMPs. A distribuição das MMPs pode variar de acordo com a localização no dente. Algumas das metodologias qualitativas são utilizadas para avaliações de cunho quantitativo como a zimografia. As metodologias qualitativas apresentam limitações inerentes a sua própria aplicação e seus resultados devem ser interpretados considerando estes aspectos seja pela possibilidade de baixa sensibilidade ou reação cruzada, por exemplo. A fim de minimizar essas limitações sugere-se que as condições experimentais e o detalhamento metodológico sejam criteriosos.

## BIBLIOGRAFIA

- Altinci P, Mutluay M, Tjäderhane L, Tezvergil-Mutluay A. Inhibition of dentin matrix-bound cysteine cathepsins by potassium fluoride. *Eur J Oral Sci.* 2019 Feb;127(1):1-9. doi: 10.1111/eos.12581. Epub 2018 Nov 10. PMID: 30414282.
- Carrilho MR, Scaffa P, Oliveira V, Tjäderhane L, Tersariol IL, Pashley DH, Tay F, Nascimento FD. Insights into cathepsin-B activity in mature dentin matrix. *Arch Oral Biol.* 2020 Sep;117:104830. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104830. Epub 2020 Jul 9. PMID: 32673819.
- Chaussain C, Boukpepsi T, Khaddam M, Tjaderhane L, George A, Menashi S. Dentin matrix degradation by host matrix metalloproteinases: Inhibition and clinical perspectives toward regeneration. *Front Physiol.* 2013;4 NOV(November):1–8.
- Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. CRITICAL REVIEWS IN ORAL BIOLOGY & MEDICINE The Role of Matrix Metalloproteinases ( MMPs ) in Human Caries. *J Dent Res.* 2006;85(1):22–32.
- Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. Degradation Patterns of Different Adhesives and Bonding Procedures. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater.* 2003;66(1):324–30.

Kapoor C, Vaidya S, Wadhwan V; Hitesh, Kaur G, Pathak A. Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). *J Cancer Res Ther.* 2016 Jan-Mar;12(1):28-35. doi: 10.4103/0973-1482.157337. PMID: 27072206.

Maravić T, Baena E, Mazzitelli C, Josić U, Mancuso E, Checchi V, Generali L, Ceballos L, Breschi L, Mazzoni A. Endogenous Enzymatic Activity in Dentin Treated with a Chitosan Primer. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 17;22(16):8852. doi: 10.3390/ijms22168852. PMID: 34445554; PMCID: PMC8396363.

Mazzoni A, Angeloni V, Comba A, Maravic T, Cadenaro M, Tezvergil-Mutluay A, et al. Cross-linking effect on dentin bond strength and MMPs activity. *Dent Mater [Internet].* 2018;34(2):288–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2017.11.009>

Mazzoni A, Tjaderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, et al. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res.* 2014/12/24. 2015;94(2):241–51.

Montagner AF, Sarkis-Onofre R, Pereira-Cenci T, Cenci MS. MMP Inhibitors on Dentin Stability: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Dent Res.* 2014;93(8):733-43. doi: 10.1177/0022034514538046. Epub 2014 Jun 16. PMID: 24935066; PMCID: PMC4293757.

Nakabayashi N, Nakamura Mi, Yasuda N. Hybrid Layer as a Dentin-Bonding Mechanism. *J Esthet Dent [Internet].* 1991;3(4):133–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1817582/#:~:text=This resin-impregnation creates a,high degree of acid resistance.>

Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res.* 1982 May;16(3):265-73. doi: 10.1002/jbm.820160307. PMID: 7085687.

Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res.* 2004;83(3):216–21.

Perdigão J, Araujo E, Ramos RQ, Gomes G, Pizzolotto L. Adhesive dentistry: Current concepts and clinical considerations. *J Esthet Restor Dent.* 2021 Jan;33(1):51-68. doi: 10.1111/jerd.12692. Epub 2020 Dec 2. PMID: 33264490.

Priyadarshini BM, Selvan ST, Lu TB, Xie H, Neo J, Fawzy AS. Chlorhexidine Nanocapsule Drug Delivery Approach to the Resin-Dentin Interface. *J Dent Res.* 2016 Aug;95(9):1065-72. doi: 10.1177/0022034516656135. Epub 2016 Jun 28. PMID: 27422859.

Sabatini C, Pashley DH. Mechanisms regulating the degradation of dentin matrices by endogenous dentin proteases and their role in dental adhesion. A review. *Am J Dent.* 2014;27(4):203–14.

Sulkalal M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, et al. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *J Dent Res.* 2001;80(6):1545–9.

Tjaderhane L, Buzalaf MA, Carrilho M, Chaussain C. Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: the era of “dentin degradomics.” *Caries Res.* 2015/02/11. 2015;49(3):193–208.

Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto V, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res.* 1998;77(8):1622–1629.