



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



CLÁUDIA HUCK

**ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO TRIPLO CEGO DO
EFEITO DA CARBODIIMIDA (EDC) NO DESEMPENHO DE
RESTAURAÇÕES EM RESINA COMPOSTA**

Araraquara

-2016-



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



CLÁUDIA HUCK

**ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO TRIPLO CEGO DO
EFEITO DA CARBODIIMIDA (EDC) NO DESEMPENHO DE
RESTAURAÇÕES EM RESINA COMPOSTA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração em Dentística, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Josimeri Hebling

Co-orientadora: Dra. Débora Lopes Salles Scheffel

Araraquara

-2016-

Huck, Cláudia

Estudo clínico randomizado triplo cego do efeito da carbodiimida (EDC) no desempenho de restaurações em resina composta / Cláudia Huck.-- Araraquara: [s.n.], 2016.

102 f.; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Josimeri Hebling

Co-Orientadora: Dra Débora Lopes Salles Scheffel

1. Estudo clínico 2. Metaloproteinases da matriz 3. Reagentes para ligações cruzadas 4. Etildimetilaminopropil Carbodi-Imida I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ana Cristina Jorge, CRB-8/5036

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

CLÁUDIA HUCK

**ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO TRIPLO CEGO DO
EFEITO DA CARBODIIMIDA (EDC) NO DESEMPENHO DE
RESTAURAÇÕES EM RESINA COMPOSTA**

Tese para obtenção de título de Doutor

Comissão Julgadora

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Josimeri Hebling

1º Examinador: Prof. Dra. Hérica Adad Ricci

2º Examinador: Prof. Dr. Gilberto Antônio Borges

3º Examinador: Profa. Dra. Andréa Abi Rached Dantas

4º Examinador: Profa. Dra. Lívia Nordi Dovigo

Araraquara, 12 de dezembro de 2016

Dados Curriculares

CLÁUDIA HUCK

NASCIMENTO	20 de Julho de 1966 – Artur Nogueira – SP
FILIAÇÃO	João Milton Huck Benedita Arinda Botechia Huck
1987 a 1990	Curso de Graduação em Odontologia Universidade de Taubaté – SP
2000 a 2001	Curso de Especialização em Dentística Restauradora, ACDC – Associação dos Cirurgiões Dentistas de Campinas – Campinas - SP
2003 a 2005	Curso de Pós Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração em Dentística Restauradora, nível mestrado, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara – SP
2013 a 2016	Curso de Pós Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração em Dentística Restauradora, nível doutorado, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara – SP

“Esta obra foi consagrada à Nosso Senhor Jesus Cristo
e à Maria Santíssima”

Dedicatória

“Buscai em primeiro lugar o Reino de Deus e a sua justiça, e todas essas coisas vos serão dadas por acréscimo.”

(Mateus 6:33)

À Deus e à querida mãe de Deus.

Aos meus pais, João Milton Huck e Benedita Arinda Botechia Huck. Que sempre confiaram e acreditaram em mim. Foram meu alicerce, suporte, exemplo, fonte de amor e aconchego.

Ao meu noivo Adriano Afonso Silva. Enviado por Deus para ser meu companheiro, amigo e eterno amor.

Agradecimentos Especiais

"Para atingir a excelência tudo precisa estar centrado no amor." (Santo Padre Pio de Pietrelcina)

À Deus Pai, Filho e Espírito Santo, razão da minha vida, meu provedor e grande amor.

Agradeço aos meus pais, irmãos e toda a minha família pela compreensão, apoio e suporte apesar das minhas limitações. Não teria conseguido sem vocês.

Ao meu noivo e futuro marido, pela compreensão, dedicação, companheirismo, ajuda e suporte nos momentos de tribulação e necessidade.

À Profa. Dra. Josimeri Hebling por ter me dado a oportunidade de realizar esta conquista e a honra de ser sua orientada. Agradeço a confiança em mim depositada, a sua gentileza e suavidade.

À Dra. Débora Lopes Salles Scheffel pela confiança, auxílio, orientação e imensa generosidade. Você é um exemplo de dedicação e humildade de coração.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa por todo auxílio e apoio durante a minha trajetória e execução deste trabalho.

À minha querida amiga Elaine Pereira da Silva Tagliaferro, pelo companheirismo, solicitude e auxílio durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Hernane Barud, pelo auxílio e suporte químico dispensado a este trabalho.

Ao Sr. Olympio Teixeira Neto pela colaboração na realização das análises estatísticas deste trabalho.

Ao prof. Dr. Weber Adad Ricci pela colaboração na execução do projeto e acessoria fotográfica.

Às amigas Dra. Fernanda Basso, Dra. Diana Gabriela de Souza Soares, Taísa Pansani, Carla Duque, Juliana Alonso, Maria Luísa Leite, Suelen Barros, Ester F. A. Bordini e todos os demais integrantes do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais.

Às minhas amigas Carolina Chavez, Liege Montoro, Leopoldina Almeida, Ana Paula Turrioni, Ariele Patrícia Rabello, Marina Gonçalves e Cristiane Mayumi Inagati, pela oportunidade de ter caminhado com vocês e dividido muitos momentos desta jornada. Vocês foram muito importantes para mim.

Ao querido amigo Prof. Dr. Lucas da Fonseca Roberti Garcia, pela confiança, ajuda, orientação e ensinamentos que me proporcionou durante minha jornada.

Agradecimentos

À Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho”, em nome do magnífico Reitor Prof. Dr. Julio Cezar Durigan e do Vice-Reitor Prof. Dr. Eduardo Kokubun.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara - Universidade Estadual Paulista, representados pela digníssima Diretora Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Sgavioli Massucato e pelo Vice Diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos.

Ao Laboratório de Pesquisa do Departamento de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Josimeri Hebling.

Ao Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais do Departamento de Patologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa.

Ao Departamento de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, todos os Professores, funcionários e colaboradores.

Ao Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, representado pelo Chefe de Departamento Prof. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli e Vice-chefe Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru.

Aos professores da Disciplina de Dentística da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior, Profa. Dra. Andrea Abi Rached Dantas, Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli, Prof. Dr. Edson Alves Campos, Prof. Dr. José Roberto Cury Saad, Prof. Dr. Marcelo Ferrarezi Andrade.

À professora da Disciplina de Bioestatística e Metodologia Científica, Profa. Dra. Lívia Nordi Dovigo, pela ajuda e considerações para a realização deste trabalho.

À querida Profa. Dra. Andréa Abi Rached Dantas, pelo carinho e colaboração durante todo o meu período de doutorado e principalmente na realização deste trabalho.

Aos professores que integraram a comissão julgadora do Exame de Pré-qualificação e Exame Geral de Qualificação: Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior, Profa. Dra. Andréa Abi Rached Dantas e Profa. Dra. Lívia Nordi Dovigo.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, representada pelos professores Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior e Prof^a. Dr^a. Lídia Parsekian Martins.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, José Alexandre e Cristiano, pelos serviços prestados e atenção a mim dedicada.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora, Creusa, Marinho, Priscila, Marquinhos, D. Isabel, D. Cida e Alessandra Ap. Rabalho (em memória), pela ajuda e disponibilidade durante este período.

Aos colegas Anna Thereza Ramos e Vinícius Rego pela colaboração na fase clínica deste trabalho.

Ao Departamento de Odontologia Social, representado pela Chefe do Departamento, Profa. Dra. Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia e pelo Vice-Chefe, Prof. Dr. Maurício Meirelles

Nagle, pela autorização da utilização das dependências da Clínica durante a execução deste Trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais, alunos de pós-graduação e graduação, por toda ajuda e convívio diário durante esta etapa da minha vida.

Aos colegas da Pós-graduação do Departamento de Odontologia Restauradora pelo convívio durante estes anos.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP pela ajuda durante a formatação do presente trabalho.

Ao laboratório de Ortodontia pela colaboração na confecção das réplicas em resina epóxica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Instituto de Química da UNESP, Araraquara, e aos responsáveis pelo Laboratório de Análises Químicas, Naira Canevarolo Pesquero e Alberto Camilo pelo apoio Técnico Químico e ao responsável pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura, Sr. Sebastião pelo apoio técnico.

À Secretaria Municipal de Saúde, Gerências de Saúde Bucal e de Educação Permanente de Araraquara, especialmente à Maria do Rosário Quinello Carnesecca, Gerente da Secretaria de Educação Permanente, pela colaboração na divulgação deste Projeto nas unidades básicas de saúde (CMS e USF) durante o período de recrutamento de pacientes.

Aos Cirurgiões Dentistas e demais profissionais da Rede Municipal de Saúde Bucal de Araraquara pela atenção, colaboração e encaminhamento de pacientes para esta pesquisa clínica.

Aos pacientes desta pesquisa: Maria Rosa, Renato, Luis Antonio, Carlos Alberto, Adriano, Catarina, Aurelúcia, Rosani, Diva, Fabiano, Marcos, Paulo, Maria Aparecida, Ana Paula, Juliane, Reinaldo, Salete, Maria do Carmo, Mirna, Erica, João Francisco e demais colaboradores e participantes deste estudo clínico, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

A todos que direta e indiretamente colaboraram e me apoiaram nesta jornada.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS...

Huck C. Estudo clínico randomizado triplo cego do efeito da carbodiimida (EDC) no desempenho de restaurações em resina composta [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o desempenho clínico de restaurações de resina composta em lesões cervicais não cariosas (LCNC) realizadas com ou sem a aplicação de um agente de ligação cruzada (carbodiimida, EDC) durante o período de 12 meses. **Métodos:** 21 pacientes com no mínimo duas LCNC participaram deste estudo. Um total de 142 LCNC foram distribuídas randomicamente em dois grupos (n=71 cada): controle e experimental. Todas as LCNC foram restauradas pelo mesmo operador e com os mesmos materiais (sistema adesivo Adper Single Bond 2 e resina composta Z350), sendo que, no grupo experimental a dentina recebeu a aplicação de EDC 0,5 mol/L por 60 segundos após o condicionamento ácido e no grupo controle apenas PBS. As restaurações foram avaliadas imediatamente após sua confecção (baseline) e após uma semana, 6 e 12 meses pelo critério USPHS/Ryge por apenas um avaliador calibrado. Os escores obtidos a partir da avaliação clínica, considerando-se os fatores de confundimento, foram analisados pelos testes de Woolf e Cochran-Mantel-Haenzel ($p < 0,05$). **Resultados:** As taxas de falhas acumuladas na retenção das restaurações nos períodos 7 dias, 6 e 12 meses, foram de 0%; 3,0% e 4,5%, respectivamente, para o grupo controle e de 0%; 3,0% e 7,4% para o grupo experimental (EDC). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos para todos os critérios e períodos avaliados. A taxa de retorno dos pacientes nos períodos de 7 dias, 6 e 12 meses foi de 100%,

90,5% e 85,7%, respectivamente. **Conclusão:** Os resultados deste estudo mostraram que o tratamento prévio da dentina com EDC não interferiu na performance de restaurações de resina composta em LCNC no período de 12 meses de avaliação.

Palavras-chave: Estudo clínico. Metaloproteinases da matriz. Reagentes para ligações cruzadas. Etildimetilaminopropil carbodi-Imida.

Huck C. A triple blinded randomized controlled trial of the effect of carbodiimide (EDC) on the performance of composite resin restorations [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the clinical performance of composite restorations placed in non-carious cervical lesions (NCCL) performed with or without the application of a cross-linking agent, over a period of 12 months. **Methods:** 21 patients with at least two NCCL, participated in this study. A total of 142 NCCL were randomly allocated into two groups (n=71): control and experimental. All NCCL were restored by the same operator and with the same materials (Single Bond 2 and Z350). In the experimental group the etched dentin was exposed to 0.5 mol/L EDC for 60 seconds while in the control group the etched dentin was exposed to Phosphate buffer solution (PBS). The restorations were evaluated at baseline, 7 days, 6 and 12 months using the USPHS/Ryge criteria, by one blinded calibrated examiner. The scores from the clinical evaluation were submitted to Woolf and Cochran-Mantel-Haenzel tests, considering the confounding factors ($p < 0.05$). **Results:** The rates of accumulated failures in the retention of restorations in the periods 7 days, 6 and 12 months were 0%; 3,0% and 4.5%, respectively, for the control group, and 0%; 3,0% and 7.4% for the experimental group. There was no statistically significant difference between the two groups for all criteria and periods. The return rate of patients in the 7-day, 6- and 12-month periods was 100%, 90.5% and 85.7%, respectively. **Conclusion:** The treatment of the etched

dentin with with EDC prior to the application of the dentin bonding agent did not
performance of composite resin restorations in NCCL in the 12-month-evaluation period.

Keywords: Clinical trial. Matrix metalloproteinases. Crosslinking reagentes.
Ethyl dimethylaminopropyl Carbodiimide.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
3 PROPOSIÇÃO	40
4 MATERIAL E MÉTODO	41
5 RESULTADO	57
6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS	83
APÊNDICE	94
ANEXO	99

1 INTRODUÇÃO

O sucesso clínico das restaurações de resina composta está diretamente relacionado à qualidade e longevidade da interface adesiva estabelecida entre o material restaurador e a superfície dental (Hashimoto et al.³⁶, 2003; Abdalla, Feilzer¹, 2008). Entretanto, tem sido demonstrado que ao longo do tempo, ocorre uma redução nos valores de resistência de união a dentina das restaurações resinosas (Hashimoto et al.³⁶ 2003; Carrilho et al.²¹, 2007; Breschi et al.¹⁶, 2008; Van Landuyt et al.¹⁰³, 2010; Marchesi et al.⁴⁸, 2013), traduzida pela taxa anual de falhas que varia entre 1,9 a aproximadamente 10%, dependendo da estratégia adesiva utilizada (Van Meerbeek et al.¹⁰⁴, 2010). Clinicamente, estas falhas manifestam-se como desadaptação e pigmentação marginal, recorrência de cárie e perda da retenção (Van Meerbeek et al.¹⁰⁴, 2010).

Falhas adesivas observadas ao longo da vida útil da restauração adesiva são, geralmente, atribuídas ao processo de degradação que ocorre na camada híbrida, o qual afeta tanto seu componente resinoso quanto orgânico (Carrilho et al.²⁰, 2007; Breschi et al.¹⁶, 2008). Os maiores desafios para a adesão à dentina em comparação ao esmalte são creditados à grande complexidade deste tecido intrinsecamente úmido relacionada à sua composição e microestrutura, somados às variáveis referentes à técnica e propriedades físico-químicas dos sistemas adesivos (Pashley et al.⁶¹, 2011).

A matriz orgânica da dentina corresponde a 20% do seu peso (30% do seu volume) e é constituída principalmente por fibrilas de colágeno tipo I. Também compõem a matriz orgânica da dentina proteínas não colagenosas e proteoglicanos, formando uma rede tridimensional reforçada por cristais de hidroxiapatita (Tjäderhane et al.⁹⁷, 2012; Bertassoni

et al.¹⁰, 2012). Adicionalmente, algumas biomoléculas e enzimas proteolíticas endógenas, como as metaloproteinases da matriz (MMPs) e as cisteínas catepsinas, estão vinculadas às fibrilas de colágeno e aprisionadas na dentina mineralizada (Tjäderhane et al.⁹⁷, 2012). Essas endopeptidases tem a capacidade de degradar componentes da matriz extracelular, incluindo o colágeno na sua forma nativa (Brinckerhoff, Matrisian¹⁷, 2002). Na dentina já foram identificadas as MMPs -2, -8, -9 e -20 (Mazzoni et al.⁵² 2009; Sulkala et al.⁸⁴ 2002; Sulkala et al.⁸⁵ 2007) e, dentre as catepsinas, principalmente a catepsina K (Kafienah et al.⁴¹, 1998).

Durante o condicionamento ácido, o conteúdo mineral da superfície dentinária é removido com a finalidade de produzir espaços interfibrilares para a subsequente infiltração do sistema adesivo (Nakabayashi et al.⁵⁴, 1982). Concomitantemente, enzimas proteolíticas também são liberadas e ativadas (Mazzoni et al.⁵¹, 2006). Contudo, os monômeros não são capazes de infiltrar totalmente os espaços interfibrilares, deixando fibrilas de colágeno parcial ou totalmente expostas no interior da camada híbrida. Essas fibrilas expostas são susceptíveis à degradação enzimática via MMPs (Pashley et al.⁶², 2004; Van Landuyt et al.¹⁰³, 2010; Mazzoni et al.⁵¹ 2006), comprometendo a durabilidade da interface adesiva estabelecida com a dentina (Pashley et al.⁶², 2004; Breschi et al.¹⁶, 2008; Tjäderhane et al.⁹⁹, 2013).

Estratégias e materiais vem sendo investigados com a finalidade de dificultar a degradação dos componentes da camada híbrida, como a incorporação de componentes bioativos aos sistemas adesivos (Tjäderhane et al.⁹⁹, 2013; Reis et al.⁷⁰, 2013), a utilização de inibidores enzimáticos (Breschi et al.¹⁵, 2010; Hebling et al.³⁹, 2005; Carrilho et al.²¹, 2007;

Tezvergil-Mutluay et al.⁹³ 2011; Tezvergil-Mutluay et al.⁹⁴ 2012; Thompson et al.⁹⁶, 2012; Liu et al.⁴⁵, 2013; Scheffel et al.⁷⁸ 2014), a remineralização biomimética (Tay, Pashley⁸⁹, 2008; Niu et al.⁵⁶, 2014; Osorio et al.⁶⁰, 2012), e a biomodificação do colágeno por agentes promotores de ligações cruzadas (Mazzoni et al.⁵⁰, 2013; Breschi et al.¹⁴, 2010; Tezvergil-Mutluay et al.⁹⁴, 2012; Scheffel et al.⁷⁶, 2014).

Agentes promotores de ligações cruzadas entre cadeias peptídicas, conhecidos como cross-linkers (Mazzoni et al.⁵⁰, 2013; Bedran-Russo et al.⁸ 2014; Scheffel et al.⁷⁷, 2015), são capazes de melhorar as propriedades mecânicas do colágeno (Bedran-Russo et al.⁷, 2008) e ao mesmo tempo inibir MMPs (Tezvergil-Mutluay et al.⁹⁴, 2012; Scheffel et al.⁷⁸, 2014).

O 1-etil-3-(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) é um agente promotor de ligações cruzadas capaz de aumentar a rigidez da dentina desmineralizada (Bedran-Russo et al.⁷, 2008), inibir a degradação enzimática (Tezvergil-Mutluay et al.⁹⁴, 2012; Scheffel et al.⁷⁸, 2014) e consequentemente preservar a união resina-dentina em longo prazo (Bedran-Russo et al.⁹, 2010; Mazzoni et al.⁵⁰, 2013; Scheffel et al.⁷⁶, 2014; Scheffel et al.⁷⁷, 2015). A aplicação de EDC 0,5 mol/L (9,6%) por 60 segundos sobre a dentina desmineralizada com ácido fosfórico foi capaz de inativar em 92% a atividade de MMPs (Scheffel et al.⁷⁸, 2014). Além disso, também foi demonstrado que nessa concentração o EDC não produziu efeito citotóxico transdentinário em células odontoblastóides (Scheffel et al.⁷⁵, 2015), encorajando a realização de pesquisas clínicas. Em estudo recente, a aplicação do EDC por 60 segundos foi eficiente na manutenção da estabilidade mecânica da união resina-dentina em espécimes envelhecidos em saliva artificial por 12 meses (Scheffel et al.⁷⁷, 2015).

A maioria do conhecimento gerado sobre o desempenho das interfaces adesivas é originária de estudos laboratoriais que tentam prever o desempenho clínico dos biomateriais (Carvalho et al.²³, 2012). No entanto, a relação dos resultados laboratoriais com a performance clínica deve ser cautelosa, uma vez que as condições laboratoriais não conseguem simular todas as condições in vivo (Pashley⁶³, 1991), gerando muitos questionamentos (Van Meerbeek et al.¹⁰⁴, 2010; Carvalho et al.²³, 2012).

A despeito da relevância dos estudos laboratoriais, os ensaios clínicos continuam a ser a melhor forma de coletar evidências científicas sobre a eficácia de um material ou técnica restauradora (Van Meerbeek et al.¹⁰⁴, 2010), devido ao fato de que, in vivo, todos os possíveis fatores de envelhecimento são reproduzidos ao mesmo tempo, respaldando os resultados para a sua utilização na prática clínica de rotina (Perdigão et al.⁶⁶, 2013). Além disso, de acordo com a ANSI (American National Standards Institute), ADA (American Dental Association), ISO (International Organization for Standardization) e FDI (World Dental Federation), um material dentário após ter passado por testes laboratoriais iniciais, deve ser submetido a avaliações clínicas. Até o momento, os autores desconhecem a existência de estudos clínicos que investigaram o efeito do EDC sobre o desempenho clínico de restaurações de resina composta realizadas em lesões cervicais não cariosas (LCNC).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo estão apresentadas, resumidamente, informações necessárias para a compreensão dos eventos envolvidos no processo de degradação da camada híbrida e dos mecanismos atualmente propostos para desacelerar essa degradação.

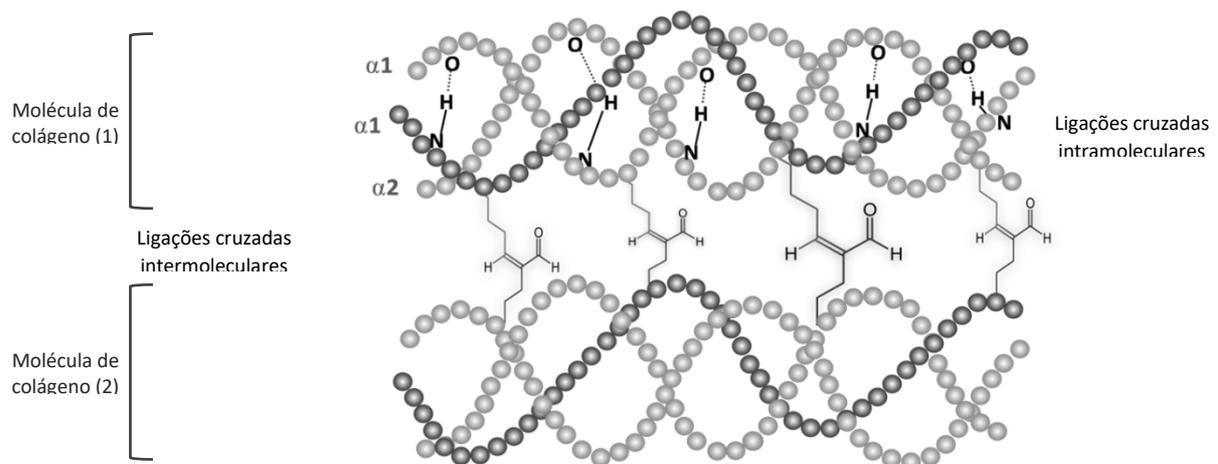
2.1 Composição proteica da dentina

A matriz dentinária é sintetizada e secretada por células diferenciadas e especializadas, os odontoblastos, e é composta por minerais, matéria orgânica e água, compreendendo, respectivamente, 70%, 20% e 10% em peso ou 45%, 33% e 22% em volume (Marshall⁴⁹, 1993). A parte inorgânica é constituída por cristais de apatita, fosfato de cálcio, carbonatos, sulfato, flúor, zinco e ferro, enquanto que a porção orgânica é constituída por 90% de colágeno, sendo o colágeno tipo I o mais abundante, com pequenas quantidades de colágeno tipo III e V (Orsini et al.⁵⁸, 2007). Além do colágeno, a matriz dentinária é composta por proteínas não colagenosas, como fatores de crescimento, proteínas específicas da dentina, proteínas séricas e proteases (Orsini et al.⁵⁸, 2007), correspondendo, conjuntamente, a 10% da matriz (Tjäderhane et al.⁹⁷, 2012).

O colágeno é o principal componente estrutural dos tecidos conjuntivos e, nos mamíferos, chega a representar de 25 a 35% de todas as proteínas do corpo (Di Lullo et al.³¹, 2002). O colágeno presente na dentina é sintetizado intracelularmente pelos odontoblastos e secretado para a matriz extracelular. Cada molécula de colágeno tipo I é constituída por três cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$ (Figura

1), que apresentam respectivamente, 1053 e 1035 resíduos de aminoácidos (Chapman et al.²⁶, 1990). Essas três cadeias se entrelaçam para formar uma estrutura em tripla hélice (molécula de colágeno), estabilizada por ligações que conectam as três cadeias, denominadas de ligações cruzadas intramoleculares (Figura 1). Após serem secretadas para o meio extracelular as moléculas de colágeno se acomodam organizadamente em número de cinco em uma disposição escalonada e alternada por meio de ligações intermoleculares (Figura 1), formando assim a microfibrila de colágeno. As microfibrilas então se agregam lateralmente e longitudinalmente formando as fibrilas, as quais são mantidas e estabilizadas por ligações cruzadas intra e inter-fibrilares (Marshall⁴⁹, 1993).

Figura 1- Esquema representativo de duas moléculas de colágeno, cada qual formada por três cadeias peptídicas, duas $\alpha 1$ e uma $\alpha 2$. O entrelaçamento das cadeias peptídicas é estabilizado por ligações cruzadas formadas entre as cadeias (ligações cruzadas intramoleculares). Da mesma forma, ligações cruzadas são estabelecidas entre moléculas de colágeno (ligações cruzadas intermoleculares) e entre fibrilas de colágeno (ligações cruzadas interfibrilares).



A estrutura enovelada e mecanicamente condensada do colágeno, associada ao alto grau de ligações cruzadas, respondem pelas propriedades viscoelásticas, de resistência mecânica e de resistência à degradação térmica e proteolítica dessa proteína (Armstrong et al.⁴, 2006). Essas propriedades são extremamente importantes, principalmente nos tecidos conjuntivos mineralizados, osso e dentina, devido à sobrecarga imposta a esses tecidos. A resistência mecânica da matriz desses tecidos pode ser avaliada por meio da determinação de seu módulo de elasticidade (Sabbagh et al.⁷², 2002). O módulo de elasticidade da matriz dentinária sadia varia entre 18 e 19 GPa para dentina mineralizada (Sabbagh et al.⁷², 2002; Xu et al.¹⁰⁷, 1998) e 4,8 a 6,2 MPa para dentina desmineralizada (Bedran-Russo et al.⁷, 2008) e a partir desses valores de referência, é possível determinar o efeito de diferentes tratamentos sobre a resistência mecânica do colágeno.

Além da sua importância na dentinogênese, a matriz da dentina tem um papel primordial nos procedimentos restauradores adesivos realizados sobre esse substrato. A remoção do conteúdo mineral pela aplicação de um agente ácido expõe a matriz dentinária, cujos espaços interfibrilares são infiltrados pelo sistema adesivo, dando origem à camada híbrida (Nakabayashi et al.⁵⁴, 1982), principal estrutura responsável pelo selamento da dentina e retenção micromecânica da restauração. Entretanto, esse biocomposto também tem sido considerado como sendo a camada mais frágil da união resina-dentina (Spencer et al.⁸², 2010).

Além de formar o arcabouço estrutural da dentina, também é atribuída à rede de colágeno a função primária de suporte para as proteínas não colagenosas desse tecido. Muitas proteínas não colagenosas são essenciais para a organização, maturação e

mineralização da pré-dentina. Essas proteínas previnem a deposição prematura de minerais e induzem a mineralização quando a matriz está pronta (Takano et al.⁸⁷, 2000). Cristais de apatita são depositados intrafibrilarmente (entre as moléculas de colágeno) e extrafibrilarmente (na superfície das fibrilas), ligando-se diretamente ao colágeno ou por meio de uma ligação facilitada por proteínas não colagenosas (Landis et al.⁴⁴, 1996).

Entre as proteínas não colagenosas estão numerosas glicoproteínas (osteonectina, osteocalcina, sialoproteínas ósseas, proteína 1 da matriz, sialofosfoproteínas, fosfoglicoproteínas e pequenas integrinas ligantes e glicoproteínas N-ligantes) (Marshall⁴⁹, 1993). As proteínas não colagenosas são consideradas fundamentais nos processos que envolvem a dentinogênese, responsáveis pelo controle da maturação, deposição mineral e crescimento dos cristais no interior da matriz (Orsini et al.⁵⁸, 2007).

Proteínas derivadas do soro como albumina, imunoglobulina G (IgG), transferrina e fetuína A, e fatores de crescimento, como por exemplo o fator de crescimento tipo insulina (IGF-I), o fator de crescimento transformante (TGF- β 1), o fator de crescimento de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento vascular-endotelial (VEGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2), o fator de crescimento epidermal (EGF), entre outros, são todas proteínas não colagenosas que também compõem a porção orgânica da dentina (Tjaderjane et al.⁹⁷, 2012). Contudo, a regulação e envolvimento das proteínas séricas e fatores de crescimento na dentina ainda não estão completamente elucidados (Orsini et al.⁵⁸, 2007) e não existem, até o momento, evidências que associem essas proteínas aos processos de degradação da camada híbrida.

A atividade proteolítica ou enzimática da dentina humana foi descrita pela primeira

vez por Dayan et al.³⁰ (1983) no início dos anos 80. Até o presente momento, sabe-se que as enzimas que compõem a matriz dentinária são derivadas de duas categorias: as metaloproteinases da matriz (MMPs) e as cisteínas catépsinas, as quais acreditava-se inicialmente ter função apenas intracelular (Kafienah et al.⁴¹, 1998).

Metaloproteinases da matriz são enzimas proteolíticas conhecidas como endopeptidases cálcio e zinco dependentes (Tezvergil-Mutluay et al.⁹⁵, 2010), capazes de degradar proteínas da matriz extracelular e outras moléculas (Brinckerhoff, Matrisian¹⁷, 2002). As MMPs juntamente com seus inibidores teciduais específicos (TIMPs) participam da organo e morfogênese, na remodelação do tecido e em processos patológicos. No entanto, o seu envolvimento e regulação também não estão completamente elucidados (Nagase et al.⁵³, 2006; Orsini et al.⁵⁸, 2012). As MMPs compõem uma família de 23 membros que podem ser divididas em 6 grupos de acordo com a especificidade do substrato e homologia: 1) colagenases; 2) gelatinases; 3) estromelinas; 4) MMP tipo membrana, 5) matrilisinas e 6) outras MMPs (Orsini et al.⁵⁸, 2012).

As MMPs dentinárias são sintetizadas pelos odontoblastos como proenzimas na forma inativa e podem ser ativadas por determinadas condições ou agentes químicos, como espécies reativas de oxigênio (Nagase et al.⁵³, 2006) e baixo pH (Nishitani et al.⁵⁵ 2006). Em contrapartida, as MMPs têm sua atividade desativada ou inibida por inibidores endógenos teciduais (TIMPs) que agem em equilíbrio aos ativadores na regulação de sua atividade em episódios de reparo da matriz extracelular (Nagase et al.⁵³, 2006). As MMPs dentinárias secretadas pelos odontoblastos contribuem para a organização e mineralização da matriz dentinária, no processo de lesões de cárie e na degradação do colágeno, como acontece na camada híbrida após restaurações adesivas (Tjaderhane et al.⁹⁸, 1998).

Na dentina humana foram identificadas MMPs na forma inativa, MMP-8 (colagenase) (Sulkala et al.⁸⁵, 2007), MMP-2 (gelatinase A) e MMP-9 (gelatinases B) (Mazzoni et al.⁵² 2009) e MMP-20 (enamelesina) (Sulkala et al.⁸⁴ 2002). Além dessas, também foram encontradas as proteinases lisossomais cisteínas catepsinas (Catepsinas K) (Kafienah et al.⁴¹ 1998).

Cisteínas catepsinas são enzimas proteolíticas expressas como pré-proenzimase sintetizadas no retículo endoplasmático e são na sua maioria enzimas lisossomais e que podem ser ativadas por baixo pH (Kafienah et al.⁴¹ 1998). Contudo, as Catepsinas K atuam extracelularmente e estão presentes na matriz óssea e dentinária (Tersariol et al.⁹² 2010), sendo capazes de degradar proteínas (colágeno, laminina, fibronectina e proteoglicanos) (Mazzoni et al.⁵¹, 2006). Na molécula do colágeno, as cisteínas catepsinas clivam a tripla hélice da molécula e hidrolisam completamente as fibrilas em pequenos peptídeos. Além disso, estão envolvidas em várias condições patológicas, especialmente em doenças que envolvem a remodelação tecidual (Orsini et al.⁵⁸. 2007). Por clivarem ligações peptídicas via introdução de uma molécula de água, essas enzimas são classificadas como hidrolases (Kafienah et al.⁴¹ 1998).

As MMPS e cisteínas catepsinas em estado inativo na matriz dentinária podem ser expostas e ativadas pelos agentes ácidos durante os procedimentos adesivos e iniciar a degradação das fibrilas de colágeno que não foram totalmente envolvidas pelo monômero adesivo e que permaneceram expostas na camada híbrida (Pashley et al.⁶², 2004; Mazzoni et al.⁵¹, 2006; Carrilho et al.²², 2009; Tersariol et al.⁹², 2010). Pashley et al.⁶², em 2004, foram os primeiros pesquisadores a associar a atividade proteolítica da dentina com a

possibilidade de degradação das fibrilas de colágeno que permaneceram desnudas durante o processo de infiltração da matriz dentinária por monômeros adesivos.

2.2 Adesão a dentina

A adesão é um processo de união física e/ou química entre duas superfícies ou materiais, muitas vezes intermediada por uma substância aderente denominada agente de união ou adesivo resinoso. A adesão física ou mecânica ocorre quando o adesivo infiltra nos poros dos substratos originando pontos de ancoragem e retenção. Já na adesão química ocorre uma interação entre as moléculas das superfícies e materiais envolvidos (Baldan⁶, 2004). Os procedimentos restauradores adesivos utilizam estes processos para estabelecer a adesão em dentina. O condicionamento ácido promove a desmineralização superficial desse tecido, formando microporosidades (espaços interfibrilares) que são subsequentemente infiltradas pelo sistema adesivo, o qual, após polimerização in situ, retém-se micromecanicamente. Como mencionado anteriormente, o novo biocomposto formado pela mescla do colágeno da dentina e do polímero resinoso é denominado de camada híbrida (Nakabayashi et al.⁵⁴, 1982).

A adesão obtida em esmalte é mais estável e previsível do que a adesão obtida em dentina (Hashimoto et al.³⁶ 2003; Perdigão et al.⁶⁵, 2014). O desafio da adesão a dentina é devido a somatória de fatores indesejáveis inerentes a esse substrato como, umidade intrínseca, heterogeneidade morfológica, composição complexa e atividade proteolítica. Ainda, podem ser considerados fatores desafiadores, variáveis relacionadas à técnica e propriedades fisicoquímicas dos sistemas adesivos (Pashley et al.⁶¹, 2011).

A produção de uma camada híbrida sem imperfeições, na qual toda e qualquer proteína dentinária exposta pelo condicionamento ácido é envolta e protegida pelo polímero resinoso, não é viável clinicamente. Camadas híbridas perfeitas apenas são produzidas laboratorialmente, com o controle da temperatura, pressão e tempo, fatores esses impraticáveis na clínica (Spencer et al.⁸², 2010).

Independentemente do tipo de sistema adesivo utilizado, convencional ou autocondicionante, a infiltração da dentina desmineralizada é incompleta, resultando na manutenção de colágeno e outras proteínas dentinárias expostas na camada híbrida (Wang, Spencer¹⁰⁵, 2002; Hashimoto et al.³⁷, 2002; Hashimoto et al.³⁶, 2003; Breschi et al.¹⁶, 2008; Perdigão et al.⁶⁶, 2013). A infiltração parcial da dentina mineralizada ocorre devido a vários fatores atuando em sinergismo, como a manutenção residual de água e/ou solventes na dentina desmineralizada (Paul et al.⁶⁴, 1999), o tamanho molecular e o grau de hidrofília dos monômeros resinosos (Salz et al.⁷³, 2005), a redução gradual dos espaços interfibrilares no sentido da dentina mineralizada (Pashley et al.⁶¹, 2011; Bertassoni et al.¹⁰, 2012), o grau de conversão monomérica dos sistemas adesivos (Cadenaro et al.¹⁸, 2005; Chee et al.²⁷, 2012; Hass et al.³⁸, 2013), e a elevada sensibilidade da técnica de adesão a dentina (Chee et al.²⁷, 2012; Tjäderjane¹⁰⁰, 2015).

O fato é que, clinicamente, as camadas híbridas são imperfeitas, apresentando porosidades em seu interior, áreas de separação de fases entre componentes hidrófilos e hidrófobos, e áreas de exposição de colágeno (Spencer, Wang⁸², 2002). Como resultado, essa camada é considerada a zona mais crítica e instável da união resina-dentina (Spencer et

al.⁸³, 2010), e a durabilidade da adesão está diretamente relacionada à capacidade dessa camada de resistir aos desafios a ela impostos (Tjäderjane¹⁰⁰, 2015).

2.3 Durabilidade da adesão

As maiores razões de insucesso das restaurações adesivas são a perda de retenção e adaptação marginal (Perdigão et al.⁶⁶, 2013). Via de regra, os sistemas adesivos apresentam uma excelente efetividade imediata ou a curto prazo (Peumans et al.⁶⁸ 2005; Carvalho et al.²³, 2012). Contudo, quando testes clínicos e laboratoriais a longo prazo são realizados, essa efetividade é gradualmente reduzida, evidenciando a instabilidade adesiva ao longo do tempo (Van Meerbeek et al.¹⁰⁴, 2010; Marchesi et al.⁴⁸, 2013).

A durabilidade da adesão resina-dentina está diretamente relacionada com a qualidade da camada híbrida, e a resistência a degradação dessa estrutura depende da resistência individual de cada um dos seus componentes (Tjäderhane et al.⁹⁹, 2013). Entretanto, ambos os componentes, colágeno e resina, são susceptíveis aos processos de degradação que acometem a camada híbrida. Como consequência, a quase completa desintegração da camada híbrida ocorreu após 44 meses de armazenamento de espécimes em saliva artificial (Armstrong et al.⁵, 2004) e após 6 meses da produção dessa camada em dentes decíduos mantidos em função na cavidade bucal (Hebling et al.³⁹, 2005).

A degradação da camada híbrida reflete diretamente nos valores de resistência de união do material adesivo a dentina. Após 12 meses de função na cavidade bucal, a resistência de união resina-dentina foi reduzida em aproximadamente 50% e após 36 meses esse valor foi de apenas um terço dos valores obtidos após 24 horas (resistência de união

imediate) (Hashimoto et al.³⁵, 2000). O mesmo fenômeno pode ser observado in vitro, ou seja, redução significativa na resistência de união de espécimes restaurados com resina composta após 1 ano de exposição à água ($13,3 \pm 5,6$ MPa) em relação ao grupo controle ($40,3 \pm 15,1$ MPa) (Hashimoto et al.³⁶, 2003). Adicionalmente, após 12 meses de envelhecimento em água, alterações micromorfológicas são observadas nas fibrilas de colágeno.

A degradação da porção resinosa da camada híbrida ocorre por um processo químico de rompimento das ligações covalentes entre os polímeros por adição de água às ligações ésteres (Tay, Pashley⁹⁰, 2003). O conteúdo orgânico presente na camada híbrida, representado pelo colágeno dentinário também sofre degradação hidrolítica, por ação direta da água. Entretanto, o colágeno também é susceptível à degradação enzimática, mediada pelas proteases dentinárias (MMPs e cisteínas catepsinas) (Pashley et al.⁶², 2004; Tersariol et al.⁹², 2010).

Pashley et al.⁶² (2004) demonstraram a degradação da matriz dentinária por enzimas proteolíticas endógenas (MMPs) na ausência de bactérias. Os autores utilizaram pó de dentina humana desmineralizada com ácido fosfórico e armazenaram em saliva artificial com e sem inibidores enzimáticos. Os resultados mostraram que a matriz dentinária armazenada apenas em saliva artificial sofreu degradação quase completa e as matrizes dentinárias armazenadas em saliva artificial associada a inibidores enzimáticos foram completamente preservadas da degradação. Nesse mesmo estudo foi demonstrado pela primeira vez na odontologia que a clorexidina é um inibidor de MMPs dentinárias, capaz de reduzir significativamente a atividade proteolítica da dentina.

2.4 Métodos propostos para reduzir a degradação da camada híbrida

Diversas abordagens têm sido propostas para reduzir a degradação da camada híbrida. Entre elas, o uso de sistemas adesivos com resinas hidrófobas (Perdigão et al.⁶⁵, 2014; Sezinando et al.⁸⁰, 2015), a substituição da água presente na dentina desmineralizada por solventes que permitam a infiltração de monômeros hidrófobos (Tay et al.⁸⁸, 2007), inibidores enzimáticos (Breschi et al.¹³, 2009; Breschi et al.¹⁴, 2010; Hebling et al.³⁹, 2005; Carrilho et al.²⁰, 2007; Tezvergil-Mutluay et al.⁹³ 2011; Tezvergil-Mutluay et al.⁹⁴ 2012; Liu et al.⁴⁵, 2013; Scheffel et al.⁷⁸ 2014), remineralizadores dentinários (Tay, Pashley⁸⁹, 2008; Niu et al.⁵⁶, 2014; Osorio et al.⁶⁰, 2012) e o uso de agentes que melhorem as propriedades mecânicas e aumentem a resistência do colágeno à degradação (Bedran-Russo et al.⁷, 2008; Bedran-Russo et al.⁸, 2014; Breschi et al.¹⁴, 2010; Tezvergil-Mutluay et al.⁹⁴, 2012; Scheffel et al.⁷⁶, 2014; Mazzoni et al.⁵⁰, 2013). Somente alguns desses métodos serão revisados, com destaque àqueles com ação na atividade proteolítica da dentina.

A clorexidina é um eficiente inibidor de MMPs e de catepsinas (Pashley et al.⁶², 2004) e alguns estudos já mostraram que a clorexidina preserva a integridade da camada híbrida, desacelerando a degradação (Hebling et al.³⁹, 2005; Carrilho et al.²¹, 2007; Brackett et al.¹², 2007; Loguercio et al.⁴⁶, 2009; Breschi et al.¹³, 2009; Breschi et al.¹⁵, 2010). A redução da resistência de união de restaurações realizadas com sistemas adesivos convencionais de dois passos foi de 50% ao longo de 1 a 2 anos, enquanto que para dentes tratados previamente com clorexidina essa redução foi de apenas 20-25% (Breschi et al.¹³, 2009; Breschi et al.¹⁵, 2010).

Entretanto, a clorexidina apresenta a desvantagem de agir exclusivamente como inibidor inespecífico das proteases dentinárias, não exercendo nenhum efeito direto sobre as fibrilas de colágeno. Adicionalmente, tem sido sugerido que esse agente é facilmente lixiviado da interface adesiva por não reagir quimicamente com componentes da camada híbrida (Ricci et al.⁷¹, 2010; Kim et al.⁴³, 2010). Após 18 meses de função na cavidade bucal, a resistência de união de interfaces produzidas em dentina de dentes decíduos foi estatisticamente comparável entre os grupos com e sem a aplicação de clorexidina (Ricci et al.⁷¹, 2010).

O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) é um composto orgânico que age como agente quelante, formando complexos estáveis com diversos íons metálicos (Thompson et al.⁹⁶, 2012). Alguns estudos (Osório et al.⁵⁹, 2005; Thompson et al.⁹⁶, 2012) mostraram que a capacidade queladora de cálcio e zinco pelo EDTA inativa as MMPS dentinárias e preserva as propriedades mecânicas da dentina. Isso porque essas endopeptidases são cálcio e zinco dependentes (Tezvergil-Mutluay et al.⁹⁵, 2010). Contudo, a sua remoção após a desmineralização reduz significativamente sua eficácia (Osorio et al.⁵⁹, 2005).

Após 4 anos de armazenamento em água de espécimes de dentina completamente desmineralizados em EDTA, foi observada a preservação das fibrilas de colágeno (Carvalho et al.²⁴, 2000). Os autores creditaram a manutenção da integridade do colágeno a sua resistência à degradação hidrolítica. Entretanto, anos após a publicação desse trabalho, os autores retificaram suas conclusões baseados em novas evidências demonstrando o potencial de inibição de MMPs exercido pelo EDTA (Thompson et al.⁹⁶, 2012).

Outra estratégia que tem sido estudada é a desidratação química da matriz de

colágeno pelo etanol (Hosaka et al.⁴⁰, 2009). A fundamentação inicial dessa estratégia foi baseada na possibilidade de maior infiltração da camada híbrida por monômeros hidrófobos, uma vez que a característica hifrófila da dentina preenchida com água seria temporariamente alterada para uma característica mais hidrófoba (Hosaka et al.⁴⁰, 2009, Tay et al.⁸⁸, 2007). Adicionalmente, essa abordagem também interfere com a atividade das proteases dentinárias. MMPs permanecem inativas na ausência de água, uma vez que a água é indispensável para que essas hidrolases desempenhem seu papel de degradação de ligações peptídicas (Tezvergil-Mutluay et al.⁹⁵, 2010). Desta forma, a substituição de água por um solvente orgânico, tal como etanol, na matriz desmineralizada de colágeno, pode melhorar a longevidade das restaurações adesivas (Hosaka et al.⁴⁰, 2009). Contudo, o etanol causa contração da matriz dentinária (Kim et al.⁴², 2010) por não atuar nas propriedades mecânicas dessa proteína. As propriedades mecânicas do colágeno podem ser significativamente melhoradas com o aumento do número de ligações cruzadas promovidas por agentes externos.

2.5 Indução de ligações cruzadas no colágeno

Como revisado no item 2.1 na página 27, a tripla hélice de colágeno é estabilizada por ligações cruzadas, as quais também são formadas entre moléculas de colágeno e entre fibrilas de colágeno (Marshall⁴⁹, 1993), conferindo ao tecido uma elevada resistência mecânica (Armstrong et al.⁴, 2006). Todas essas ligações são consideradas endógenas por serem estabelecidas durante a dentinogênese. Entretanto, é possível induzir a formação de novas ligações cruzadas pela aplicação de agentes externos. Essas ligações exógenas

melhoram a estabilidade estrutural, a rigidez, a resistência mecânica, a resistência à degradação térmica e resistência à solubilidade do colágeno (Cova et al.²⁸, 2011; Bedran-Russo et al.⁷, 2008; Bedran-Russo et al.⁸, 2014; Cadenaro et al.¹⁹, 2016).

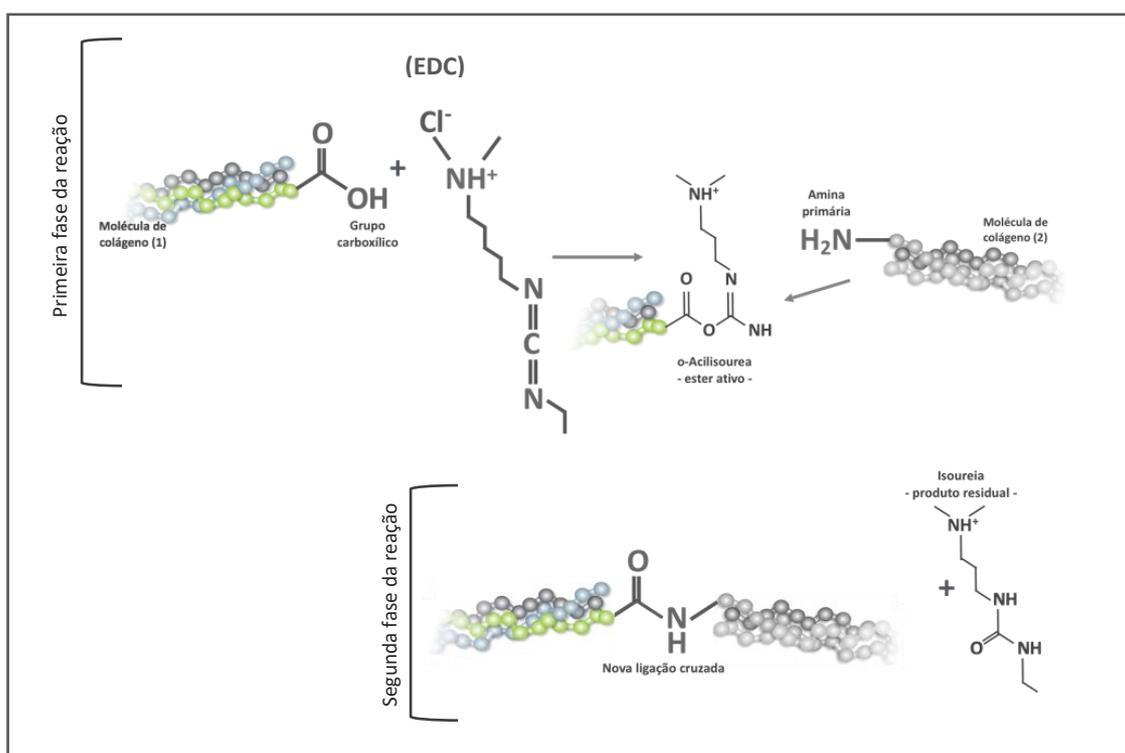
A indução de ligações cruzadas tem sido utilizada na medicina regenerativa para viabilizar o emprego de matrizes de colágeno como biomaterial em engenharia de tecidos (Duncan et al.³², 2010; Malcor et al.⁴⁷, 2016). A mesma estratégia tem sido aplicada nos procedimentos restauradores adesivos, uma vez que a biomodificação ou reticulação do colágeno dentinário tem melhorado a resistência da camada híbrida à degradação (Bedran-Russo et al.⁹, 2010; Scheffel et al.⁷⁶, 2014; Tezvergil-Mutluay et al.⁹⁴, 2012; Mazzoni et al.⁵⁰, 2013). Agentes promotores de ligações cruzadas exógenas promovem a estabilidade da camada híbrida via dois mecanismos: (1) aumento da resistência do colágeno à degradação hidrolítica e enzimática e (2) inativação da atividade das proteases dentinárias (Bedran-Russo et al.⁸, 2014).

O aumento de ligações cruzadas no colágeno pode ser induzido externamente por métodos químicos ou físicos (Malcor et al.⁴⁷, 2016; Bedran-Russo et al.⁸, 2014). Os métodos físicos incluem o envelhecimento, irradiação com raios ultra violeta (Cova et al.²⁸, 2011) e os químicos são representados por agentes sintéticos, como os aldeídos (glutaraldeído) e carbodiimidas (EDC) (Bedran-Russo et al.⁹, 2010; Scheffel et al.⁷⁶, 2014; Tezvergil-Mutluay et al.⁹⁴, 2012; Mazzoni et al.⁵⁰, 2013; Bedran-Russo et al.⁸, 2014), e os metabólitos naturais, como os compostos polifenólicos vegetais, entre eles as proantocianidinas (PAs) (Bedran-Russo et al.⁷, 2008; Castellan et al.²⁵, 2013; Bedran-Russo et al.⁸, 2014).

O 1-etil-3-(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) é um reagente químico indutor de ligações cruzadas altamente solúvel em água (Olde Damink et al.⁵⁷ 1996). O EDC reage inicialmente com os grupos do ácido carboxílico (-COOH) formando um composto intermediário (O-acylisourea), que em seguida pode reagir diretamente às amins primárias (-NH₂), formando ligações amida (Bedran Russo et al.⁹, 2010). O EDC não se torna parte da ligação transversal final (ligação amida) entre as moléculas-alvo, por isso é conhecido como um agente de ligação cruzada de comprimento zero em química orgânica (Olde Damink et al.⁵⁷, 1996). Além disso, o seu excesso e o produto formado da reação intermediária, a uréia, é hidrosolúvel e pode ser facilmente removido por extração ou enxágue (Bedran-Russo et al.⁹, 2010). A habilidade do EDC em conjugar os grupos amins primárias e ácido carboxílico é uma versátil ferramenta para formar ligações cruzadas covalentes por meio de ligações amida em peptídeos e proteínas (Olde Damink et al.⁵⁷, 1996). Como a estrutura molecular do colágeno é formada por três cadeias polipeptídicas, a reticulação química acontece por reação do EDC com os grupos carboxílicos de resíduos da molécula de colágeno que então se conjuga a amins formando ligações covalentes por meio de ligações amidas (Figura 2).

O EDC é capaz de aumentar a rigidez da dentina desmineralizada da camada híbrida (Bedran-Russo et al.⁹, 2010) e inibir a degradação enzimática (Tezvergil-Mutluay et al.⁹⁴, 2012; Scheffel et al., 2014⁷⁶; Scheffel et al.⁷⁷, 2015) e consequentemente, preservar a união resina-dentina em longo prazo (Bedran-Russo et al.⁹, 2010; Scheffel et al.⁷⁷, 2015; Tezvergil-Mutluay et al.⁹⁴, 2012; Mazzoni et al.⁵⁰ 2013). Scheffel et al.⁷⁶ (2014) demonstraram que a aplicação de EDC 0,5 mol/L por 1 minuto sobre a dentina desmineralizada com ácido fosfórico foi capaz de inativar em 92% a atividade de MMPs. Além disso, os autores também

Figura 2- Esquema da reação de ligação cruzada entre duas moléculas de colágeno promovida pelo EDC. Na primeira fase, o EDC reage com o grupo carboxílico, preferencialmente dos resíduos de ácido glutâmico e aspártico, e forma uma ester ativo que reage com o grupo amina de uma segunda proteína. Na segunda fase, é estabelecida uma nova ligação cruzada peptídica e formado um produto residual devivado, a uréia.



Fonte: Esquema adaptado de Thermo fisher Scientific, Thermofisher.com.

demonstraram que nessa concentração o EDC não produziu efeito citotóxico transdentinário em células odontoblastóides MDPC-23 (Scheffel et al.⁷⁵, 2015), encorajando a realização de pesquisas de nível clínico em seres humanos. Em estudo recente esses mesmos autores (Scheffel et al.⁷⁷, 2015) mostraram que o tratamento da dentina humana com EDC 0,5 mol/L por 60 segundos, previamente aos procedimentos adesivos foi capaz de prevenir a degradação da interface adesiva resina-dentina após 12 meses de envelhecimento dos espécimes em saliva artificial.

2.7 Lesões cervicais não cariosas (LCNC) como modelo para avaliação do desempenho de sistemas e protocolos adesivos

Segundo recomendações da American Dental Association (ADA², 2001), lesões cervicais não cariosas (LCNC) são ideais para a avaliação do desempenho de novos materiais e estratégias adesivas. Essas cavidades reúnem um conjunto de características que permite observar a efetividade direta do mecanismo de adesão (ADA², 2001; Carvalho et al.²³, 2012). São essas características: 1) ausência de retenção macromecânica; (2) presença de margens em esmalte e dentina/cimento; (3) localização na superfície vestibular, facilitando a execução, o acompanhamento clínico e a replicação em modelos para análise laboratorial; (4) multiplicidade em um mesmo paciente, favorecendo a comparação entre diferentes materiais/técnicas e (5) as propriedades do material restaurador são menos importantes para o resultado final do que o desempenho adesivo (Carvalho et al.²³, 2014). Adicionalmente, essas cavidades apresentam esclerose dentinária, processo de proteção e reparo tecidual que ocorre frente aos fatores etiológicos que determinam a sua formação, geralmente a combinação de erosão, abrasão e abfração (Rees⁶⁹, 2000). Tem sido demonstrado que a adesão à dentina esclerótica chega a ser de 20 a 50% inferior em comparação a adesão efetuada em dentina sadia (Tay, Pashley⁹¹, 2004), conferindo as LCNC um grande desafio aos procedimentos restauradores.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar o desempenho clínico, em 12 meses de acompanhamento, de restaurações de resina composta realizadas em lesões cervicais não cariosas (LCNC), com ou sem a aplicação de carbodiimida (EDC).

4 MATERIAL E MÉTODO

Aspectos éticos

O delineamento deste estudo clínico randomizado triplo cego seguiu as normas de padronização para relatórios clínicos do CONSORT – *Consolidated Standards of Reporting Trials* (Schulz et al.⁷⁹, 2010). O estudo foi integralmente realizado nas dependências da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr, UNESP – Brasil, no período de setembro de 2014 a junho de 2016. Os pacientes que atenderam aos critérios de inclusão e exclusão do estudo (descritos abaixo) foram convidados a participar e informados sobre a natureza e objetivos do estudo. Os voluntários receberam os esclarecimentos de forma verbal e escrito, por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), redigido segundo as orientações da Resolução 466, do Conselho Nacional de Saúde (CNS) (Apêndice A). O projeto de pesquisa, assim como o TCLE foram submetidos à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em Seres Humanos da mesma Instituição de Ensino Superior (IES) onde foi desenvolvida a pesquisa, devidamente registrada na Plataforma Brasil (processo- CAAE: 34361914.0.0000.5416) (Anexo A). Adicionalmente foi obtida autorização junto à prefeitura Municipal de Araraquara para divulgação da presente pesquisa junto às Unidades de Saúde (Anexo B).

Recrutamento e critérios de inclusão e exclusão dos pacientes

Por amostragem não probabilística, foram recrutados pacientes de ambos os gêneros e qualquer etnia na faixa etária de 25 a 55 anos (Apêndice B1), que procuraram a faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr - UNESP) e necessitavam de tratamento de lesões

cervicais não cariosas (LCNC) na face vestibular dos dentes por motivos de hipersensibilidade dental, prevenção da evolução das lesões e razões estéticas que atendessem aos critérios de inclusão descritos na Tabela 1 (Sartori et al.⁷⁴, 2013). Os pacientes que apresentaram os critérios de exclusão também descritos na Tabela 1, não foram incluídos no estudo, porém foram encaminhados para o tratamento necessário. Além disso, os pacientes que apresentaram hipersensibilidade dental, de forte intensidade, no período de até sete dias após a realização da restauração foram excluídos do estudo e substituídos por novos pacientes. Contudo, esses pacientes excluídos por hipersensibilidade dental receberam toda assistência necessária para remissão do sintoma, incluindo a troca da restauração e/ou encaminhamento para tratamento apropriado.

Tabela 1- Critérios de inclusão e exclusão dos pacientes recrutados para o estudo.

Critérios de inclusão
Paciente com idade entre 25 a 55 anos
Pacientes com mais de 20 dentes naturais
Presença de, no mínimo, duas lesões cervicais não cariosas na face vestibular de caninos, pré-molares e molares
Cavidades não retentivas
Presença de dentes antagonistas
Margem cervical em dentina ou cimento e incisal/oclusal em esmalte
Critérios de exclusão
Pacientes não hábeis ao entendimento dos procedimentos e orientações
Gestantes ou mulheres em fase de amamentação
Pacientes fazendo o uso de analgésicos ou medicamentos antiinflamatórios
Pacientes com severas doenças sistêmicas ou psicológicas
Pacientes sob tratamento ortodônticos
Pacientes com alto risco a cárie
Pacientes com bruxismo severo. (>50% da estrutura dental perdida por atrição)
Pacientes com doenças periodontais e gengivais severas
Presença de cárie, trincas, fraturas nos dentes selecionados
Ausência de vitalidade pulpar
Presença de esclerose dentinária grau 4, de acordo com a classificação de Swift Jr et al. ⁸⁶ , 2001 (Tabela 3)
Pacientes Fumantes

Fonte: Adaptado de Sartori et al.⁷⁴, 2013 (com modificações).

Avaliação e classificação das lesões cervicais não cariosas (LCNC)

Após terem concordado em participar deste estudo e assinado o TCLE, todos os pacientes recrutados foram submetidos à classificação das lesões cervicais não cariosas. Todas as LCNC foram classificadas quanto à vitalidade pulpar, forma da lesão em “V” ou “U” na superfície vestibular dos dentes com margem incisal/oclusal em esmalte e margem gengival em dentina, profundidade (≤ 1 mm e $>$ que 1 mm), altura cérvico-oclusal e extensão méso-distal ($\leq 1,5$ mm; de 1,5 a 2,5 mm ou $> 2,5$ mm), presença de faceta de atrição incisal/oclusal, hipersensibilidade pré-operatória e intensidade da dor, grau de esclerose dentinária (Swift Jr. et al.⁸⁶, 2001) e distribuição dos dentes (caninos, pré-molares e molares) superiores ou inferiores (Tabela 2). As dimensões das lesões foram verificadas com sonda periodontal milimetrada.

A hipersensibilidade dental foi avaliada após o dente ter sido submetido a jato de ar por 2 segundos, e, além da ausência ou presença de dor, a intensidade também foi registrada por meio de uma escala verbal numérica (EVN) que compreende uma linha horizontal de 10 cm, sendo que, zero significa ausência total de dor; um a três (1 a 3) dor de fraca intensidade; quatro a seis (4 a 6) dor de intensidade moderada; sete a nove (7 a 9) dor de forte intensidade e 10 o nível de dor máxima suportável pelo paciente (Figura 3). A escala verbal/numérica foi apresentada ao paciente para que ele indicasse o grau ou número que representou a intensidade da dor ou do alívio no momento das avaliações. As avaliações de hipersensibilidade dental foram realizadas antes do procedimento restaurador e em cada retorno do paciente.

Tabela 2- Características das lesões cervicais não cariosas (LCNC)

Quanto à forma e profundidade
Forma de Cunha ou V (≤ 1 mm)
Forma de Cunha ou V (> 1 mm)
Forma em U (≤ 1 mm)
Forma em U (> 1 mm)
Quanto à altura cérvico-oclusal/incisal
< 1,5 mm
1,5-2,5 mm
>2,5 mm
Quanto à largura mesio-distal
< 1,5 mm
1,5-2,5 mm
>2,5 mm
Quanto ao grau de esclerose dentinária
Nenhuma esclerose
Esclerose leve
Esclerose moderada
Esclerose severa
Quanto à presença de faceta de atrição incisal/oclusal
Ausência de faceta de atrição
Presença de atrição
Quanto à sensibilidade pré-operatória ao jato de ar por 2 segundos
Não
Sim
Quanto à intensidade da dor (hipersensibilidade)
Nenhuma
Leve
Moderada
Intensa
Distribuição dos dentes
Caninos superiores
Pré-molares superiores
Molares superiores
Caninos inferiores
Pré-molares inferiores
Molares inferiores

Fonte: Adaptado de Ermis et al.³³, 2012.

Figura 3- Escala verbal/numérica para a determinação da intensidade da dor.

0 ___ 1 ___ 2 ___ 3 ___ 4 ___ 5 ___ 6 ___ 7 ___ 8 ___ 9 ___ 10

Fonte: Adaptado de Sartori et al.⁷⁴, 2013 (com modificações).

O grau de esclerose dentinária foi avaliado segundo os critérios estabelecidos por Swift Jr. et al.⁸⁶ (2001) (Tabela 3) e registrado por fotografias. O risco a cárie dental foi avaliado de acordo com os critérios: hábitos alimentares, higiene, fluxo salivar, presença ou ausência de lesões visíveis de cárie. Desta forma, o paciente classificado como desfavorável a um destes critérios, foi categorizado como médio risco, e a dois ou mais critérios, como alto risco e excluído do estudo (Singh et al.⁸¹, 2013).

Tabela 3- Categorias do grau de esclerose dentinária.

Categorias	Descrição dos graus de esclerose
1	Nenhuma esclerose – a dentina é amarela claro ou esbranquiçada. A dentina é opaca com pouca translucência ou transparência. Estas lesões são típicas de indivíduos jovens.
2	Esclerose leve - maior que a categoria 1 e inferior a 50% da diferença entre as categorias 1 e 4
3	Esclerose moderada – amarela. Menor que a categoria 4 e superior a 50% da diferença entre as categorias 1 e 4.
4	Esclerose severa – A dentina é amarela escura ou marrom. Dentina vítrea com translucidez ou transparência evidente e significativa. Estas lesões são típicas em indivíduos mais velhos.

Fonte: Adaptado de Swift Jr. et al.⁸⁶ (2001).

Delineamento experimental, clínico randomizado

O desenho deste estudo clínico randomizado, triplo cego foi de “boca dividida” (*split-mouth design*). Desta forma, cada paciente recebeu, no mínimo, uma restauração do grupo experimental e uma restauração do grupo controle, as quais foram designadas aos grupos por alocação randômica.

A randomização foi realizada por meio de aleatorização por ruído atmosférico, disponibilizada pelo site: www.random.org (*True Random Number Generator*) onde foram gerados números com frequência aleatória por ruído atmosférico e intervalos determinados pelo operador. Para esta pesquisa o intervalo foi 2, uma vez que estabelecemos apenas dois grupos: grupo experimental (G1) e grupo controle (G2). O cegamento foi feito de forma que os dados da randomização foram anotados e dispostos em uma tabela como dentes do grupo 1 e dentes do grupo 2, sem especificar qual tipo de tratamento seria realizado. Da mesma forma, a solução de EDC diluído em PBS (a ser utilizada no grupo experimental) e a solução tamponada (PBS) sem o princípio ativo (a ser utilizada no grupo controle) foram codificadas apenas como Solução 1 e 2 e este código permaneceu sob sigilo por dois profissionais que não participaram da realização e da avaliação das restaurações. A solução de EDC é incolor e inodora, assim como o PBS, permitindo o cegamento do operador e paciente (Figura 3). O operador não teve acesso às informações dos códigos em nenhum momento do desenvolvimento do estudo.

Cada grupo, experimental e controle, foi constituído de 71 lesões cervicais não cariosas (total de 142 LCNC), selecionadas de 21 pacientes. O tamanho da amostra deste estudo teve como parâmetro o valor amostral médio referente a estudos clínicos relevantes

encontrados na literatura e acrescido em 20%, considerando-se o índice de evasão aproximado. Foram considerados para o cegamento: operador, paciente e avaliador.

Grupos de Tratamento

Os mesmos procedimentos restauradores foram realizados nos dois grupos do estudo. A única exceção foi a aplicação do EDC 0,5 mol/L (EDC, ProteoChem, Denver, CO, EUA) (pH 6,0) diluído em PBS (solução de tampão fosfato) por 60 segundos, que foi realizada apenas no grupo experimental (G2), após o condicionamento com ácido fosfórico 35% (Ultra Etch, Ultradent Products Inc., Salt Lake, Utah, EUA) e antes da aplicação do sistema adesivo (Adper Single Bond 2, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) e material restaurador (Filtek Z350 XT, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA). O grupo controle (G1) recebeu o mesmo tratamento descrito acima apenas com PBS sem o EDC. O nome comercial, fabricante e principais componentes dos produtos a serem utilizados no estudo estão apresentados na Tabela 4.

Todos os pacientes recrutados receberam orientações de higiene dental, procedimentos de limpeza dental e registro da cor dos dentes, realizados em uma sessão anterior aos procedimentos restauradores (Figura 4).

Tabela 4- Nome comercial, fabricante e principais componentes dos produtos a serem utilizados no estudo.

Material		Fabricante	Principais componentes
Condicionador (Ultra Etch)	ácido	Ultradent Products Inc., Salt Lake, Utah, EUA	35% H ₃ PO ₄
EDC 0,5 mol/L (9,6%)		EDC-HCl, ProteoChem, Denver, CO, EUA	EDC 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
Adper Single Bond 2		3 M ESPE, St. Paul, MN, EUA	Bis-GMA, HEMA, UDMA, ácido polialquenoico, canforoquinona, água, etanol e glicerol 1.3 dimetacrilato, 10% peso nanopartículas de sílica
Filtek Z350 XT		3M ESPE, St. Paul, MN, EUA	Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, e bis-EMA. As partículas são uma combinação de sílica com tamanho de 20 nm não-aglomeradas/não agregadas, zircônia com tamanho de 4-11 nm não aglomeradas/não-agregadas e aglomerados, clusters, de partículas agregadas de zircônica/sílica (combinação de partículas de sílica com 20 nm e Zircônia com 4-11 nm).

Abreviaturas: **BIS-GMA** (Bisfenol glicidil metacrilato), **HEMA** (hidroxietil metacrilato), **UDMA** (uretano dimetacrilato), **TEGDMA** (triethylene glicol dimetacrilato), **Bis-EMA** (bisfenol-A etoxilado dimetacrilato).

Fonte: Autoria própria.

Figura 4- Imagens representativas dos procedimentos pré-operatórios. (A) Remoção de cálculo dental, quando necessário; (B) profilaxia com pedra pomes e água; e (C) registro de cor dos dentes (Escala Vita).



Fonte: Autoria própria.

Antes dos procedimentos restauradores o paciente foi submetido, quando necessário, à anestesia local com lidocaína (com ou sem vasoconstritor), e profilaxia dental com escovas

de Robinson e suspensão de pedra pomes em água. As LCNC não receberam nenhum tipo de preparo cavitário ou bisel conforme recomendações do relatório da ADA², 2001. Os dentes receberam isolamento relativo com retratores labiais, roletes de algodão, sugador de saliva e fio retrator gengival (Ultrapak 000; Ultradent Products Inc, South Jordan, IR, EUA). As lesões foram condicionadas com ácido fosfórico 35% (Ultra Etch, Ultradent Products Inc., Salt Lake, Utah, EUA) em esmalte por 30 segundos e dentina por 15 segundos e em seguida foram abundantemente enxaguadas com spray água-ar. O excesso de água na dentina foi removido com papel absorvente esterilizado. Após o condicionamento, a dentina condicionada foi tratada com EDC 0,5 mol/L ou PBS, respectivamente no grupo experimental e controle. Ambas as soluções, EDC e o PBS, foram mantidas em contato com a dentina por 60 segundos, sendo levemente agitadas com pincel do tipo *microbrush* durante todo esse período. Em seguida, as soluções foram enxaguadas por 15 segundos e o excesso de água da dentina foi removido com papel lenço absorvente. O esmalte foi seco com jato de ar, após proteção da dentina com papel absorvente. Em seguida, o sistema adesivo (Adper Single Bond 2, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) foi aplicado conforme as recomendações do fabricante, por meio de pincel *microbrush* e delicadamente seco por 2 segundos, e em seguida, foi fotoativado por 10 segundos por uma fonte de luz LED Ultrablue D-2000NA 7850 (DMC, São Carlos, Brasil), com potência de 1200 mW/cm². Em seguida as cavidades foram preenchidas por incrementos de 1 mm de resina composta (Filtek Z350 XT, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) da cor previamente selecionada, iniciando pela margem gengival. Cada incremento foi fotoativado por 20 segundos com a mesma fonte de luz LED utilizada para a fotoativação do sistema adesivo.

O acabamento e polimento das restaurações foram realizados na mesma sessão, finalizado o procedimento restaurador, usando ponta diamantada cônica 3195 FF (KG SORENSEN , Cotia, SP, Brasil), pontas carbide multilaminadas (30 lâminas - 9904 FF (Microdont – FG, SP, Brasil), pontas de borracha siliconada (FlexiCups – Cosmedent, Chicago, IL 60611), discos de feltro (FlexiBuff – Cosmedent, Chicago, IL 60611) e pasta de polimento (Enamelize – Cosmedent, Chicago, IL 60611). A sequência operatória esta está ilustrada nas Figuras 5 e 6.

Figura 5- Imagens representativas da sequência dos procedimentos operatórios e restauradores. A- Profilaxia; B- Inserção do fio retrator gengival; C- Aplicação de ácido fosfórico 37% em esmalte; D- Aplicação do ácido fosfórico 37% em dentina por 15 segundos; E- Remoção do gel com jatos de água e sucção; F- Secagem com papel feltro e jatos de ar; G- Aplicação da solução 1 ou 2 por 1 minuto; H- Remoção da solução com água; I- Secagem com papel feltro e jatos de ar e J- Aplicação do agente adesivo.

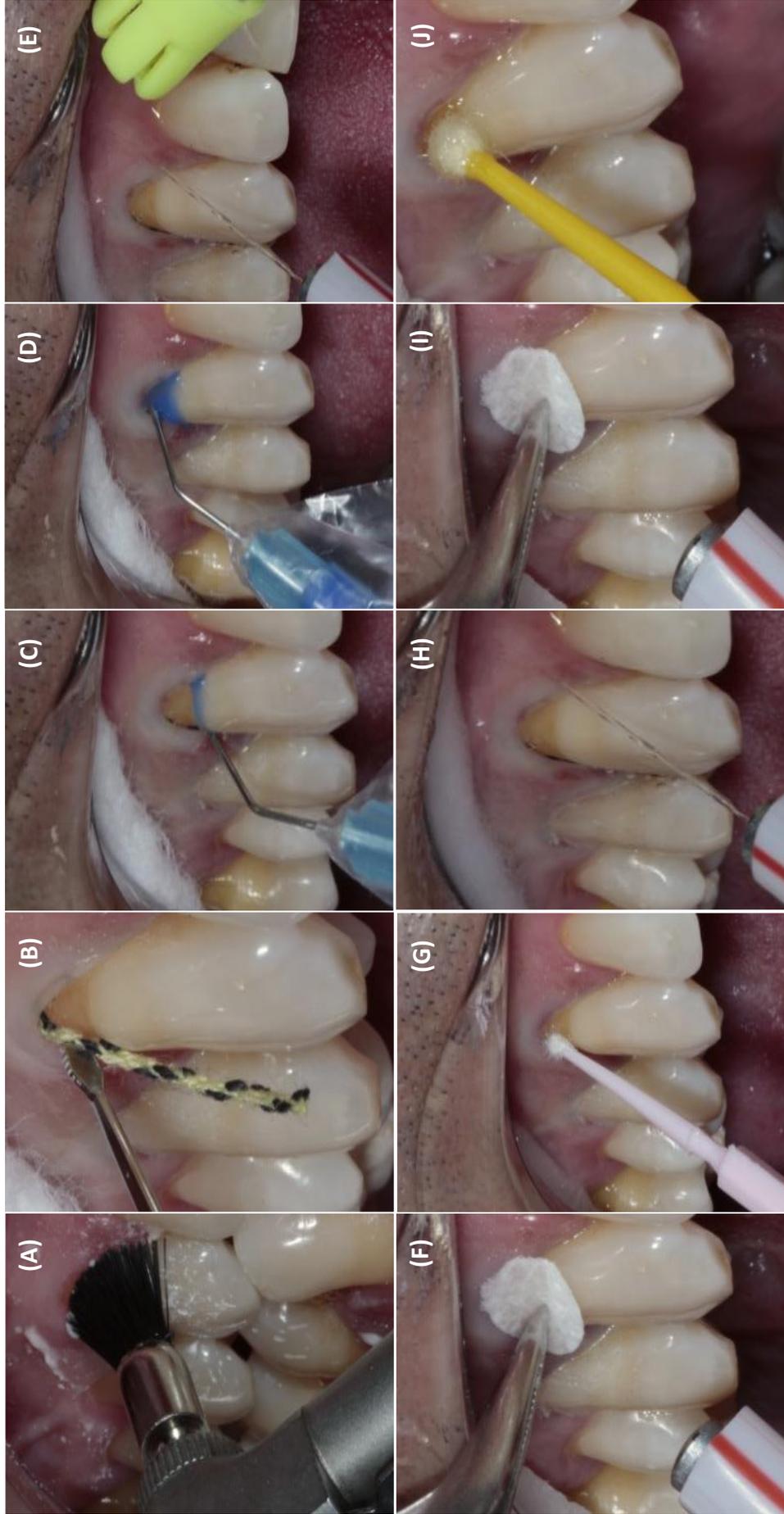
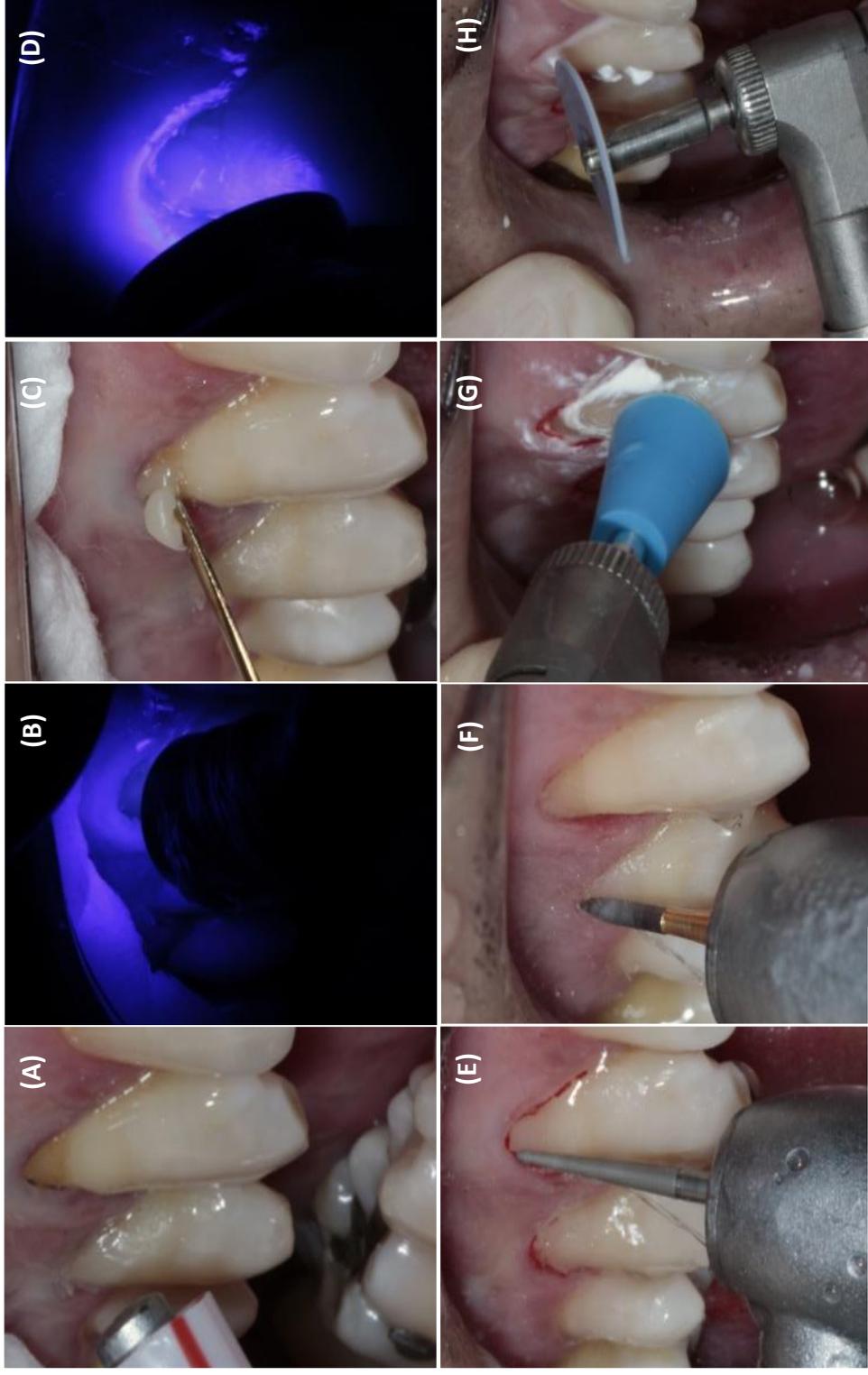


Figura 6- Imagens representativas continuação da sequência dos procedimentos operatórios e restauradores. A- Espalhamento do adesivo com leve jato de ar; B- aplicação de luz fotopolimerizadora; C- aplicação das camadas de resina composta; D- Fotopolimerização das camadas de resina composta; E- Acabamento com fresa diamantada série dourada FF; F- Acabamento com fresa multilaminada; G- Polimento com taças de borracha e pasta para polimento de resinas compostas e H- Polimento final com disco de feltro.



Fonte: Autoria própria.

Avaliação fotográfica

Foram realizados registros fotográficos: (i) no início da primeira sessão clínica antes dos procedimentos restauradores, (ii) uma semana após a conclusão da restauração, (iii) 6 meses e (iv) 12 meses após a conclusão da restauração.

A documentação fotográfica foi realizada por meio de uma máquina DSLR Nikon (D80, Nikon, Nikon Corporation, Tokio, Japão) com lente intercambiável do tipo macro (AF-S VR Micro-NIKKOR 105 mm f/2.8G IF-ED, Nikon, Japão) e *flash* circular (Sigma EM-140 DG Macro Ring Flash for Nikon AF). Para padronização das tomadas fotográficas, a máquina e o *flash* foram operados no modo manual (M) com completo controle do operador. Deste modo, foram fixados os seguintes valores: velocidade do obturador: 1/125 segundos; abertura do diafragma: f 32-40; potência do flash: 1/4; padrão ISO: 200; foco: manual em ponto central e medição de luz: matricial. As imagens foram salvas pela máquina no modo RAW para posterior avaliação.

Avaliação clínica

Neste estudo foi utilizado o critério de avaliação USPHS/Ryge modificado (USPHS -*United States Public Health Service*) (Cvar, Ryge²⁹, 2005), dentro do qual foram selecionadas as propriedades clinicamente relevantes para avaliações do desempenho de restaurações adesivas, sendo elas: retenção, integridade marginal, pigmentação marginal, ocorrência de lesões de cárie e sensibilidade dental (Tabela 5). Um cirurgião dentista experiente, calibrado (taxa média de concordância intra-examinador de 97%) e que não participou dos procedimentos operatórios e de randomização foi responsável pelas avaliações de todas as 142 restaurações. Este profissional não tinha conhecimento quanto ao tipo de tratamento

realizado em cada dente (cegamento). Os dentes foram submetidos à profilaxia com solução de pedra pomes em água imediatamente antes das avaliações. A avaliação clínica das restaurações foi realizada após uma semana, seis e doze meses da realização das restaurações.

Tabela 5- Descrição dos critérios de avaliação das restaurações de acordo com o sistema USPHS/Ryge.

Características Clínicas	Alpha	Bravo	Charlie
Integridade marginal	A sonda não trava nas margens da restauração.	A sondagem identifica fendas e desadaptação marginal sem exposição de dentina ou base cavitária.	Desadaptação marginal com exposição de dentina e/ou base cavitária subjacente.
Pigmentação marginal	Não há manchamento (pigmentação) entre a restauração e o dente.	Há manchamento (pigmentação) em menos da metade da circunferência das margens.	Há manchamento (pigmentação) em mais da metade da circunferência das margens.
Recorrência de cárie	Clinicamente ausente.	Não Aplica.	Clinicamente Presente.
Sensibilidade Dentária	Sensibilidade ausente quando o dente é seco por jatos de ar por 2 segundos a uma distância de 1 cm da restauração e os dentes vizinhos estão cobertos por gaze.	Sensibilidade presente quando o dente é seco por jatos de ar por 2 segundos a uma distância de 1 cm da restauração e os dentes vizinhos estão cobertos por gaze. A sensibilidade cessa quando o estímulo é removido.	Sensibilidade presente quando o dente é seco e não cessa após a remoção do estímulo.
Retenção da restauração	Retida	Parcialmente retida	Perdida

Fonte: Adaptado de Cvar, Ryge²⁹, 2005 (USPHS, United States Public Health Service).

Análise micromorfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As margens das restaurações foram qualitativamente analisadas em MEV. Dez pacientes foram aleatoriamente selecionados e uma restauração representativa de cada grupo (n=10) foi moldada com silicone por adição (Express XT; 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) em todos os períodos de avaliação. Os moldes foram convertidos a réplicas positivas em resina epóxica (EpoxiCure® 2 Epoxy System; Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA) (Figura 7), montadas em stubs e revestidas em ouro para análise em MEV (Topcon modelo SM300; School of Materials, Manchester, Inglaterra) (Van Dijken, Hörstedt¹⁰², 1997; Boecklera et al.¹¹, 2012). Fotografias foram registradas em aumentos de 20x e 100x e avaliadas quanto à integridade marginal e presença de fenda marginal:

Integridade Marginal: 0. Margem Perfeita; 1. Pelo menos 2/3 da margem está perfeita; 2. De 1/3 a 2/3 da margem está perfeita; 3. Menos de 1/3 da margem está perfeita.

Fenda marginal: 0. Nenhum fenda; 1. Fenda a 1/3 do perímetro; 2. Fenda a partir de 1/3 a 2/3 da circunferência; 3. Mais do que 2/3 do perímetro com Fenda (Boecklera et al.¹¹, 2012).

Figura 7- Imagens fotográficas das etapas do processo de confecção das réplicas em resina epóxica dos dentes restaurados. (1) Imagem da moldagem em silicone por adição; (2) réplica após a cura da resina epóxica; e (3) parte da réplica montada em base metálica e recoberta com ouro para análise em MEV.



Fonte: Autoria própria.

Análise estatística dos dados

Foram considerados fatores de variação do estudo o “tipo de tratamento” e, como estrato, o “período de acompanhamento”. Os escores obtidos a partir das variáveis resposta (integridade marginal, pigmentação marginal, presença de cárie, sensibilidade dentária e retenção) foram utilizados para a comparação dos grupos dentro de cada período de avaliação pela aplicação do teste Cochran-Mantel-Haenszel.

O possível efeito das covariáveis do estudo (Tabela 2) sobre cada variável resposta também foi avaliado pela aplicação do teste de Cochran-Mantel-Haenszel, aos dados obtidos no 12^o mês de avaliação. Todas as inferências estatísticas foram baseados no nível de significância de 5%, ou seja, grupos foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADO

Quarenta e sete pacientes de ambos os gêneros e etnia variada apresentaram-se como voluntários durante a etapa de recrutamento. Destes, apenas 23 atenderam aos critérios de inclusão e exclusão. Os pacientes não incluídos (n= 24) na pesquisa foram encaminhados para tratamento regular na clínica de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr). Os principais motivos da não inclusão dos pacientes avaliados estão dispostos na Tabela 6, sendo que muitos pacientes estavam inseridos em mais de uma categoria.

Tabela 6- Principais fatores responsáveis pela não inclusão dos pacientes recrutados no estudo.

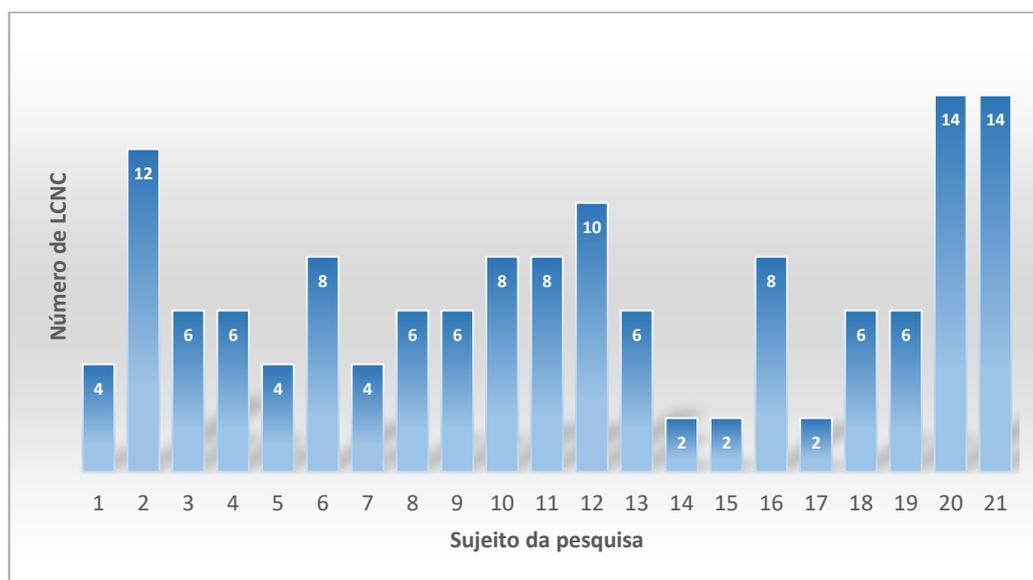
Principais causas da não inclusão na pesquisa	n. de ocorrências
Não apresentaram LCNC	8
Idade acima de 55 anos	9
Higiene deficiente	4
Doença periodontal avançada	3
Lesões de cárie	5
Portador de prótese total	2
Ausência de dentes antagonistas	4
Fumantes	5
Doenças crônicas	1
Bruxismo severo	1

Fonte: autoria própria

Os 23 pacientes incluídos no estudo foram identificados por números (Apêndice-Tabela B2). Dentre eles um desistiu de participar antes da primeira consulta e outro foi excluído devido a hipersensibilidade grau 10 após a intervenção, recebeu uma nova

intervenção, o que proporcionou remissão da sintomatologia e, conseqüentemente, não entrou nos dados estatísticos da pesquisa. Os 21 pacientes (sujeitos da pesquisa) restantes apresentaram um total de 142 LCNC (Figura 8), que foram randomicamente alocadas em dois grupos: controle e experimental (Figura 9).

Figura 8- Gráfico ilustrativo do número de lesões cervicais não cariosas (LCNC) em cada um dos 21 sujeitos incluídos na pesquisa. Um total de 142 lesões foram incluídas no estudo, as quais foram randomicamente divididas nos grupos controle (n=71) e experimental (n=71).



Fonte: Autoria própria.

Do início até o final do período de 12 meses, três pacientes descontinuaram a avaliação da pesquisa, um deles devido ao início de tratamento ortodôntico, outro por motivo de mudança de cidade e outro por não comparecimento à consulta agendada por gravidez de risco (Figura 9). Desta forma, a taxa de retorno dos pacientes para avaliação nos períodos de 7 dias, 6 e 12 meses foi de 100%, 90,5% e 85,7%, respectivamente. Isso significa

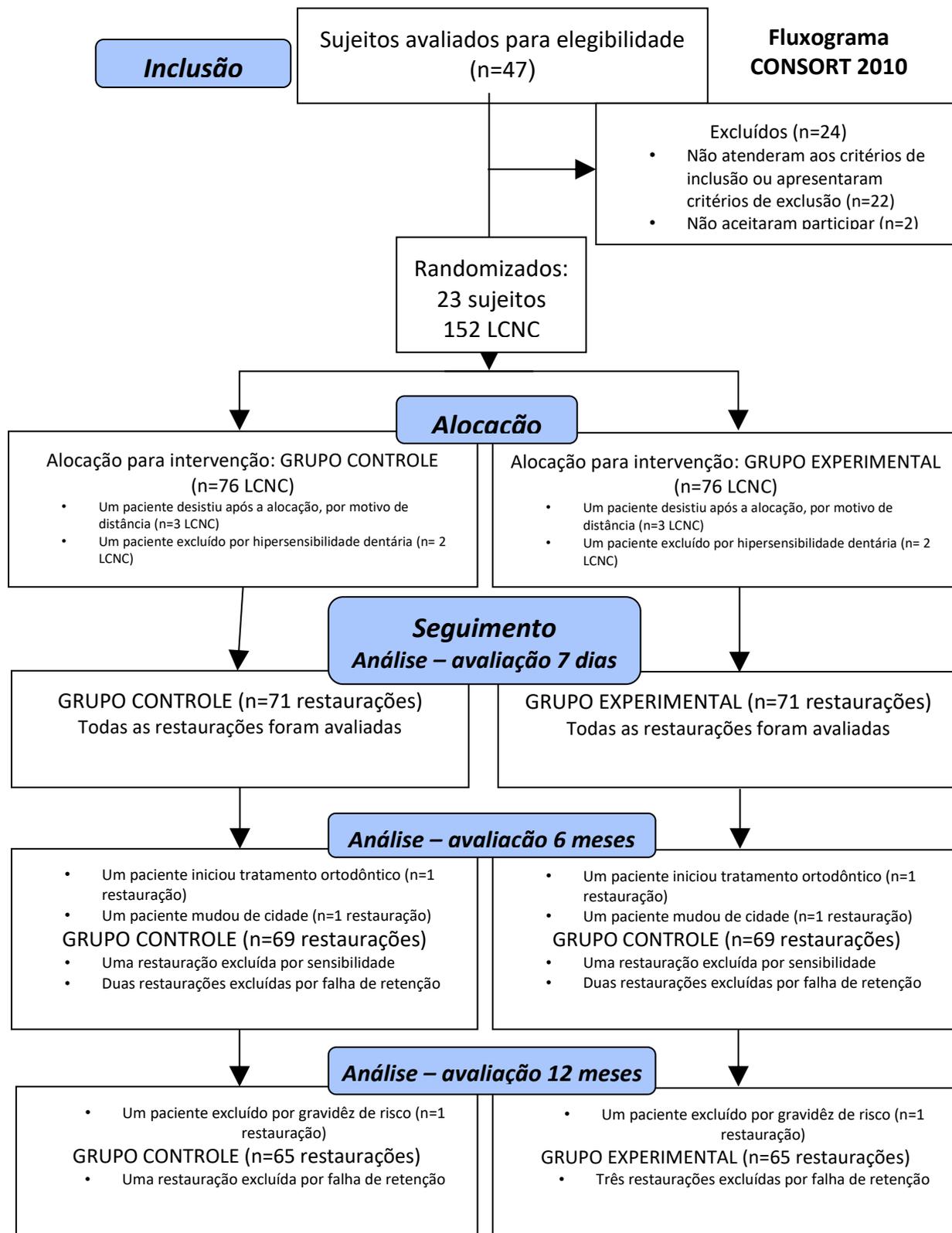
dizer que a taxa de abandono do estudo (*dropout rate*) foi de 14,3% ao final dos 12 meses. Nesses três pacientes excluídos do estudo haviam sido realizadas 6 restaurações, conseqüentemente, em termos de número de restaurações avaliadas, a taxa de reavaliação foi de 100%, 97,2% e 95,8%, respectivamente, para os períodos de 7 dias, 6 e 12 meses.

Análise das variáveis resposta

Um total de 410 avaliações clínicas foram realizadas ao longo do estudo. Os critérios analisados em cada avaliação foram considerados as variáveis resposta deste estudo: integridade marginal, pigmentação marginal, lesão de cárie, sensibilidade dentária e retenção da restauração.

Para os critérios clínicos de integridade marginal, pigmentação marginal e lesão de cárie, em nenhum dos períodos de análise, foi atribuído o escore C (Charlie) do método USPHS/Ryge (As frequências de sucesso e insucesso podem ser vistas no Apêndice - Tabelas B3, B4 e B5, respectivamente). Apenas quatro restaurações foram classificadas como escore B (Bravo) para o critério integridade marginal (margens desadaptadas sem exposição dentina, Tabela 7), 2 no período de 6 meses e 2 no período de 12 meses (Apêndice – Tabela B6). Essas restaurações pertenciam ao grupo controle. Para o critério pigmentação marginal, escore B (manchamento em menos da metade da circunferência das margens, Tabela 7) foi atribuído também para apenas 2 restaurações no período de 6 meses (uma do grupo controle e uma do grupo experimental), e 1 restauração do grupo experimental aos 12 meses (Apêndice- Tabela B7).

Figura 9- Fluxograma referente ao desenvolvimento do estudo clínico randomizado.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 7- Definições classificatórias de sucesso e insucesso para os critérios de avaliação clínica.

SUCESSO				
Integridade marginal	Pigmentação marginal	Lesão de cárie	Sensibilidade dentária	Retenção da restauração
Alfa: Margens imperceptíveis ou	Alfa: Sem pigmentação		Alfa: Ausente	
Bravo: Margens desadaptadas sem exposição dentina	Bravo: Há manchamento (pigmentação) em menos da metade da circunferência das margens.	Alfa: Ausente	Bravo: Transitória	Alfa: Retida
INSUCESSO				
Charlie: Margens desadaptadas com exposição de dentina	Charlie: Há manchamento (pigmentação) em mais da metade da circunferência das margens.	Charlie: Presente	Charlie: Contínua	Bravo: restauração parcialmente retida Charlie: Restauração perdida

Fonte: Autoria própria.

Insucesso (escore C, Tabela 7), entretanto, foi atribuído a duas restaurações no período de 6 meses, para o critério sensibilidade dentária, uma restauração de cada grupo. Assim, a taxa global de insucesso para essa variável foi de apenas 1,4% dos casos. Esses casos foram excluídos do estudo e as restaurações foram substituídas, garantindo o bem-estar do paciente.

A quantidade de insucessos quanto à retenção foi de 8 restaurações no final de 12 meses. Assim, a taxa de insucesso global representou 5,63% dos casos. As taxas de falhas acumuladas na retenção das restaurações nos períodos 7 dias, 6 e 12 meses, foram de 0%; 3,0% e 4,5%, respectivamente, para o grupo controle e de 0%; 3,0% e 7,4% para o grupo experimental (EDC). Esses insucessos estavam assim distribuídos: 4 aos 6 meses, sendo 2 restaurações de cada grupo, e 4 aos 12 meses, 1 restauração do grupo controle e 3 do grupo experimental.

As porcentagens de sucesso para cada uma das variáveis resposta avaliadas clinicamente nos diferentes períodos de análise estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8- Porcentagem de sucesso clínico, segundo os critérios USPHS/Ryge, de acordo com as variáveis resposta e período de avaliação clínica.

Critérios clínicos	Tempo					
	7 dias		6 meses		12 meses	
	Controle	Experimental (EDC)	Controle	Experimental (EDC)	Controle	Experimental (EDC)
Integridade marginal	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Pigmentação marginal	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Lesão de cárie	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Sensibilidade dentária	100,0	100,0	98,5	98,5	100,0	100,0
Retenção da restauração	100,0	100,0	97,1	97,1	98,4	95,4

Fonte: Autoria própria.

Embora tenha havido uma tendência de aumento na quantidade de falhas verificadas para a variável resposta retenção em função do tempo, os grupos não apresentaram diferenças significativas dentro de cada período de análise clínica. Uma vez que não houve efeito da interação entre os fatores (grupo versus período), o teste de Cochran-Mantel-Haenszel foi aplicado para a comparação dos grupos dentro de cada período. Não foi revelada diferença estatística entre os grupos ($\chi^2=0,000048$, $p=1,000$), e, portanto, a hipótese nula de que a retenção de restaurações realizadas com EDC não seria diferente daquela do tratamento controle também não foi rejeitada.

Análise da intensidade da dor

A intensidade da dor de cada dente foi registrada por meio de uma escala visual numérica (EVN) sub-dividida em 5 categorias (zero - ausência de dor; 1 a 3 - dor de fraca intensidade, 4 a 6 - dor de intensidade moderada; 7 a 9 - dor de forte intensidade e 10 –

intensa) nos períodos pré-operatório, 7 dias, 6 e 12 meses. Houve um aumento na frequência de restaurações categorizadas com ausência de sensibilidade ao longo dos períodos avaliados para os dois grupos, quando comparados com a intensidade da sensibilidade pré-operatória. A frequência de cada período e grupo está disposta na Tabela 9 e ilustrada na Figura 10.

Tabela 9- Frequência da intensidade da dor nos diferentes grupos e períodos de avaliação.

Intensidade da dor*	Tempo							
	Pré-operatório		7 dias		6 meses		12 meses	
	Controle	Exp	Controle	Exp	Controle	Exp	Controle	Exp
0	17	20	54	54	56	52	50	52
1 a 3	18	22	14	14	6	6	8	7
4 a 6	18	18	3	3	2	6	2	3
7 a 9	17	10	0	0	2	2	4	0
10	1	1	0	0	1	1	0	0
Total dentes	71	71	71	71	67	67	64	62

*de acordo com uma escala verbal numérica de 0 a 10

Fonte: Autoria própria.

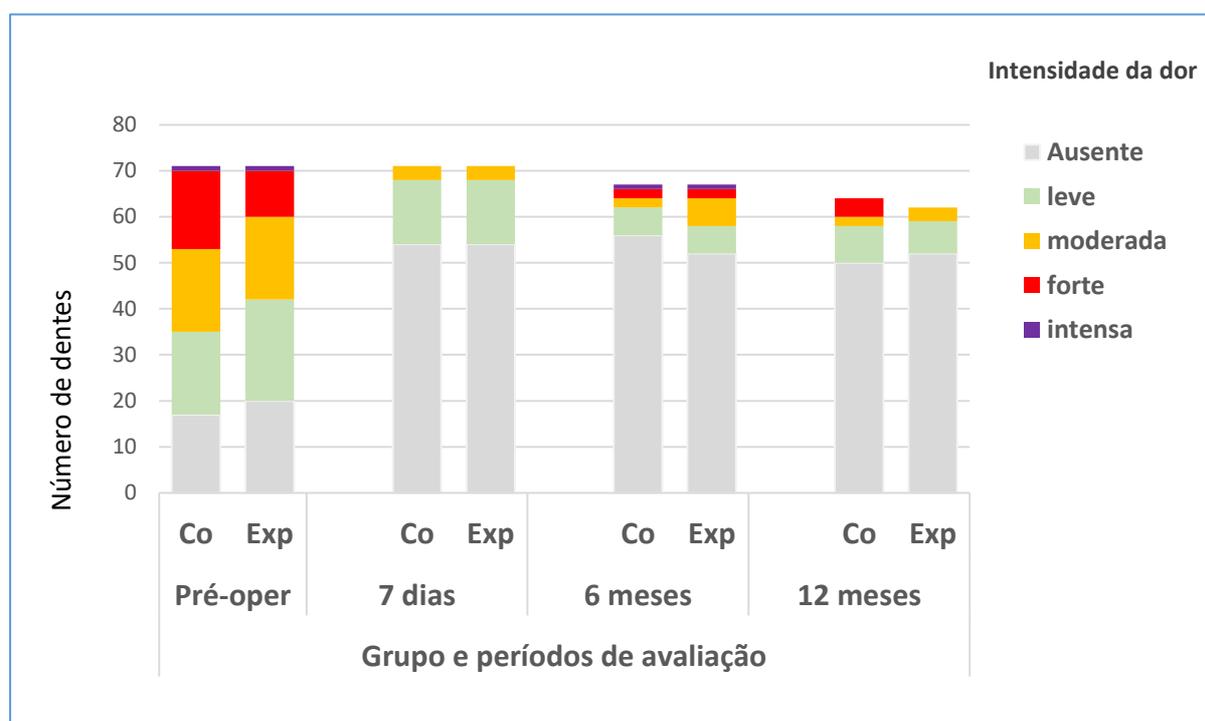
Análise das covariáveis

Para as variáveis resposta integridade marginal, pigmentação marginal e lesão de cárie não foram observados insucesso das restaurações no período de 12 meses. Portanto, o efeito das covariáveis (fatores de confundimento) foi analisado apenas para a variável resposta retenção, no período de 12 meses.

A Tabela 10 apresenta os testes χ^2 de Cochran-Mantel-Haenszel com o cruzamento entre a variável retenção da restauração, grupos e cada uma das covariáveis. Considerando

o nível de significância de 5%, não há evidências de que haja associação entre os riscos de pertencer a qualquer um dos grupos, sob o cruzamento com cada uma das covariáveis com relação às chances de sucesso ou fracasso na retenção da restauração após 12 meses do procedimento.

Figura 10- Gráfico ilustrativo da frequência da intensidade da dor para os grupos controle e experimental (exp) nos diferentes períodos de avaliação clínica.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 10- P-Valores encontrados no teste χ^2 de Mantel-Haenzel para cada uma das covariáveis.

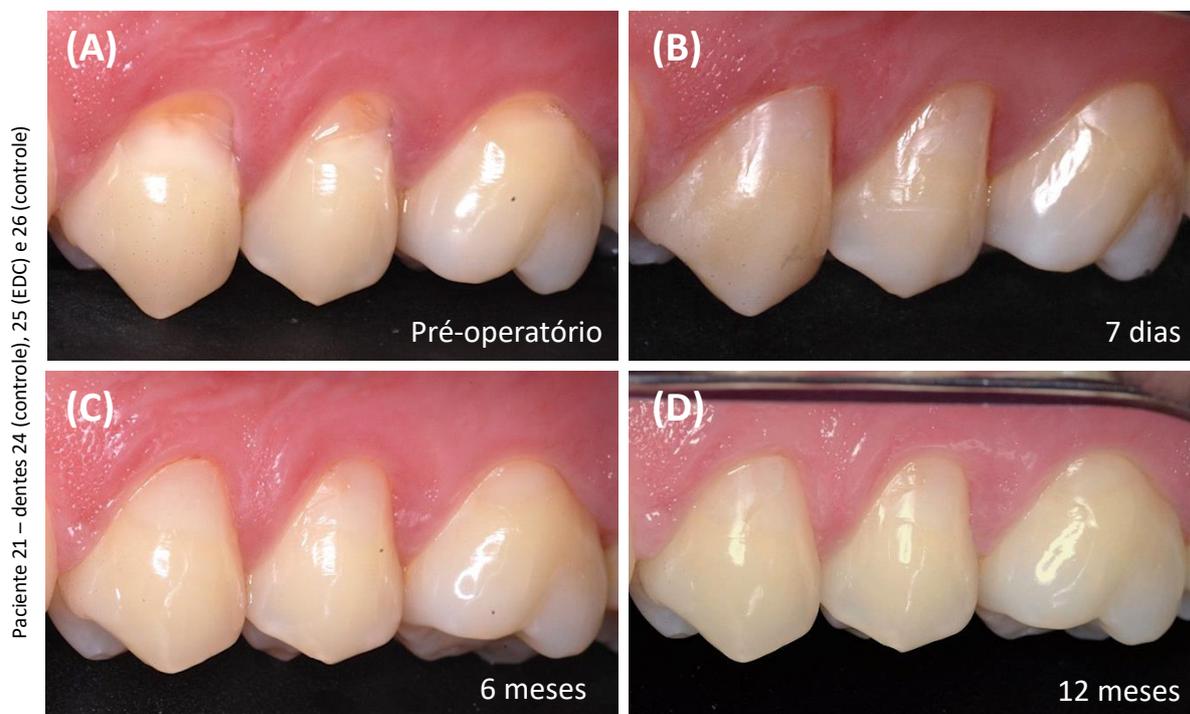
Covariável	χ^2	P-Valor
Gênero	0,2373	0,6261
Forma/Profundidade	0,3624	0,5472
Altura	0,1863	0,6661
Largura	0,1223	0,7266
Grau de esclerose	0,2340	0,6286
Faceta de atrição	0,1560	0,6928
Sensibilidade pré-operatória	0,3031	0,5819
Intensidade da dor	0,2112	0,6459

Fonte: A autoria própria.

Análise fotográfica

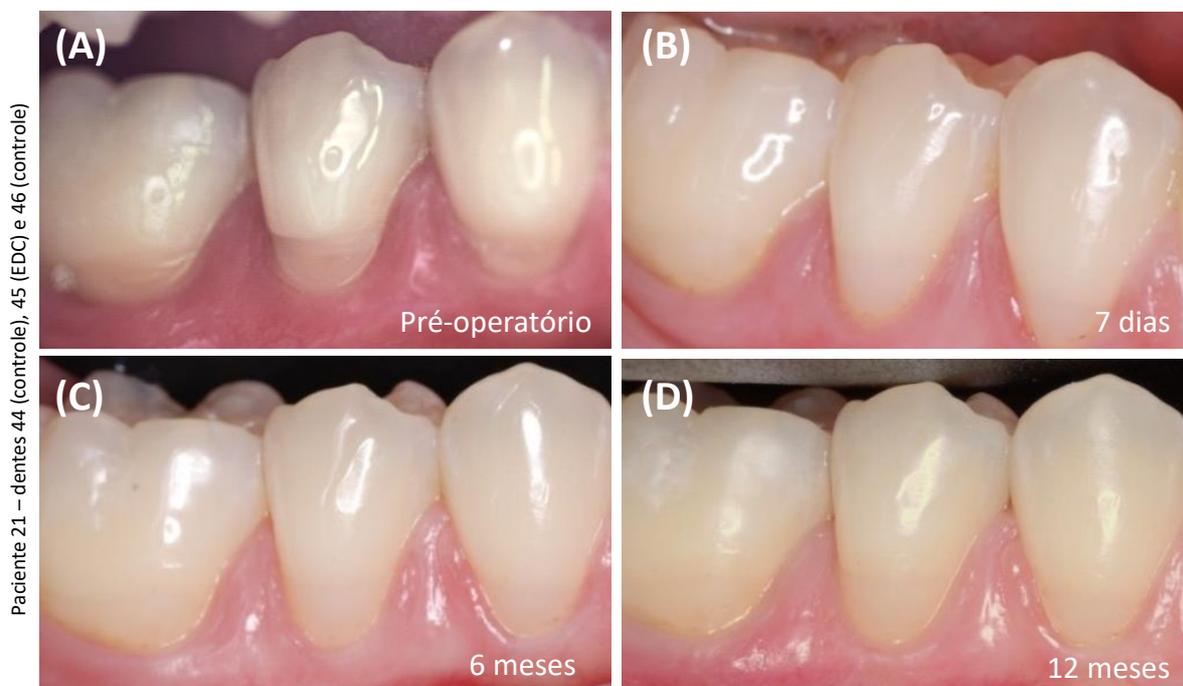
Imagens fotográficas foram realizadas em todos os dentes submetidos aos procedimentos restauradores, e foram utilizados como registros visuais do desempenho das restaurações nos diferentes grupos e tempos, e também para comparações entre as análises clínica e em microscopia eletrônica de varredura (MEV). As Figuras de 11 a 13 ilustram a documentação fotográfica de alguns dentes.

Figura 11- Imagens fotográficas realizadas nos períodos (A) pré-operatório, (B) após 7 dias da realização da restauração, (C) após 6 e (D) após 12 meses. Dois dos três dentes fotografados pertencem ao grupo controle (dentes número 24 e 26), enquanto que o dente 25 foi tratado com EDC. Todas as três restaurações foram consideradas sucesso após 12 meses.



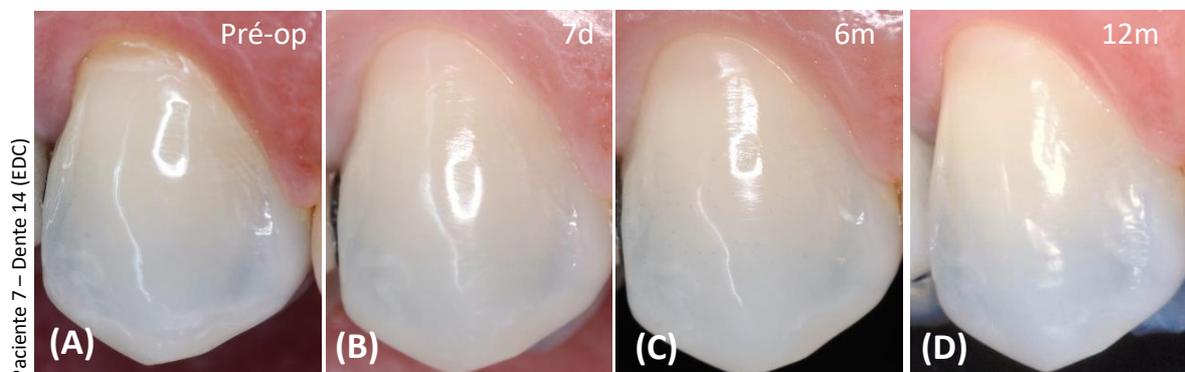
Fonte: Autoria própria.

Figura 12- Imagens fotográficas realizadas nos períodos (A) pré-operatório, (B) após 7 dias da realização da restauração, (C) após 6 e (D) após 12 meses. Os dentes 44 e 46 pertencem ao grupo controle enquanto que o dente 45 pertence ao grupo experimental, ou seja, tratado com EDC. Ambas as restaurações foram consideradas sucesso após 12 meses.



Fonte: Autoria própria.

Figura 13- Imagens fotográficas do dente 14, pertencente ao grupo experimental (tratado com EDC) nos períodos (A) período pré-operatório, (B), 7 dias (C) 6 meses e (D) 12 meses após a restauração. Em todos os períodos de análise clínica, a restauração foi considerada sucesso.



Fonte: A autoria própria.

Análise quantitativa e qualitativa por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Dez restaurações foram aleatoriamente selecionadas para a análise quantitativa em MEV quanto à integridade e a presença de fenda marginal. Na avaliação da integridade marginal, três restaurações dos dois grupos apresentaram escores de grau 1, com pelo menos 2/3 da margem perfeita (Tabela 11). Uma vez que não foram detectadas fendas marginais nestas restaurações, sugerimos que irregularidades relacionadas à deficiência no polimento das margens impossibilitaram atribuir o escore 0, ou seja, considerar as margens perfeitas (Figuras 14 a 20).

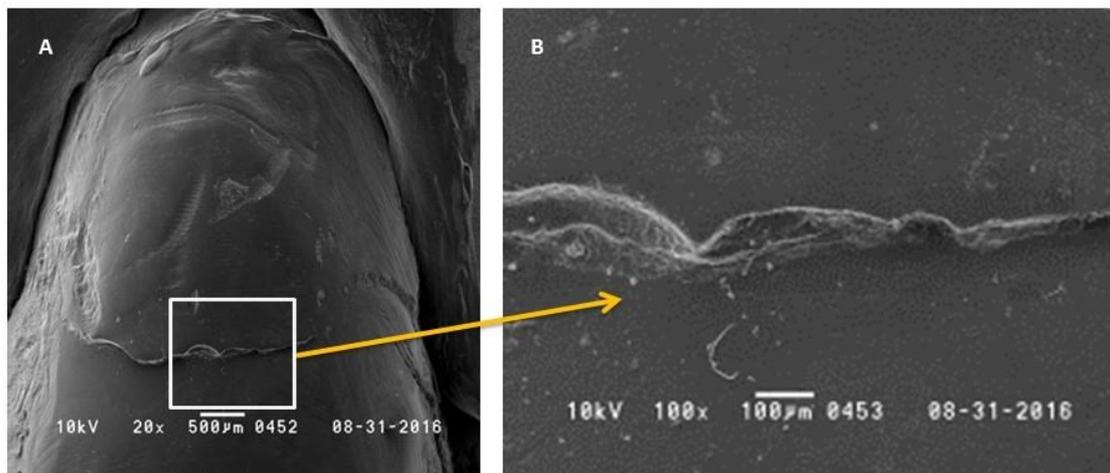
Tabela 11- Análise quantitativa de restaurações pertencentes aos grupos controle (n=5) e experimental (n=5), realizadas em réplicas de resina epóxica, quanto à integridade marginal (IM) e presença de fenda marginal (FM) nos períodos de 7 dias, 6 e 12 meses após a confecção das restaurações.

Grupo	Dente (Paciente)	Período de avaliação clínica					
		7 dias		6 meses		12 meses	
		IM	FM	IM	FM	IM	FM
Controle	44 (P12)	0	0	0	0	0	0
	34 (P10)	0	0	1	0	1	0
	24 (P10)	0	0	0	0	0	0
	44 (P6)	1	0	1	0	1	0
	16 (P7)	1	0	1	0	1	0
Experimental (com EDC)	14 (P6)	1	0	1	0	1	0
	35 (P10)	0	0	0	0	0	0
	25 (P10)	0	0	0	0	0	0
	45 (P6)	1	0	1	0	1	0
	14 (P7)	1	0	1	0	1	0

EDC, carbodiimida (0,5 mol/L)

Fonte: A autoria própria.

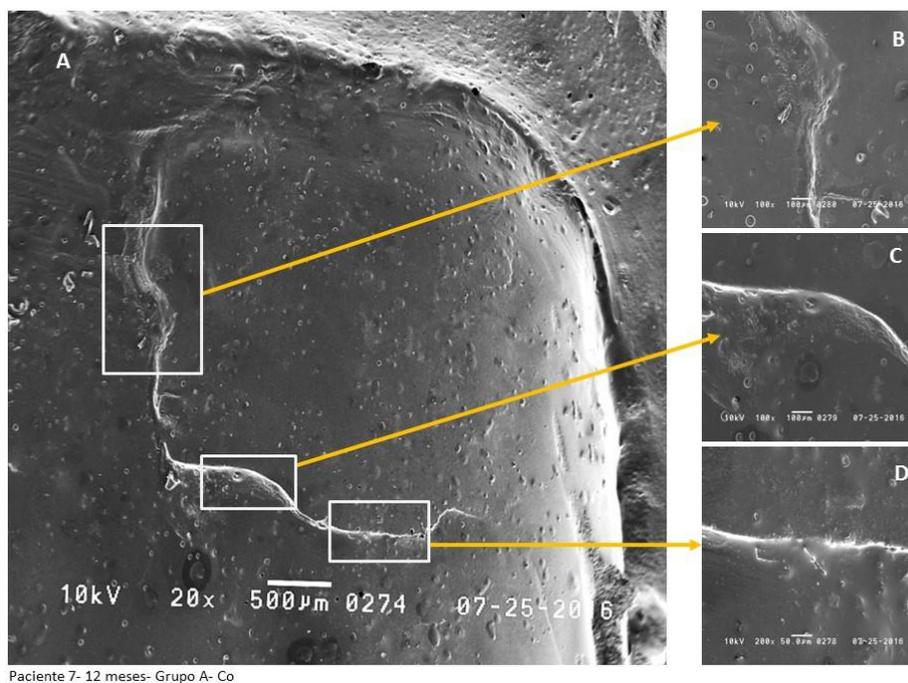
Figura 14- Fotomicrografias em MEV de réplica de resina epóxica de restauração de LCNC pertencente ao grupo experimental (EDC) após 12 meses. (A) Menor aumento (20x) incluindo toda a extensão da margem da restauração, e (B) maior aumento da área destacada em (A), evidenciando imperfeições marginais da restauração sem evidência de fenda marginal (100x).



Paciente 6 – GB (EDC) – 12 meses

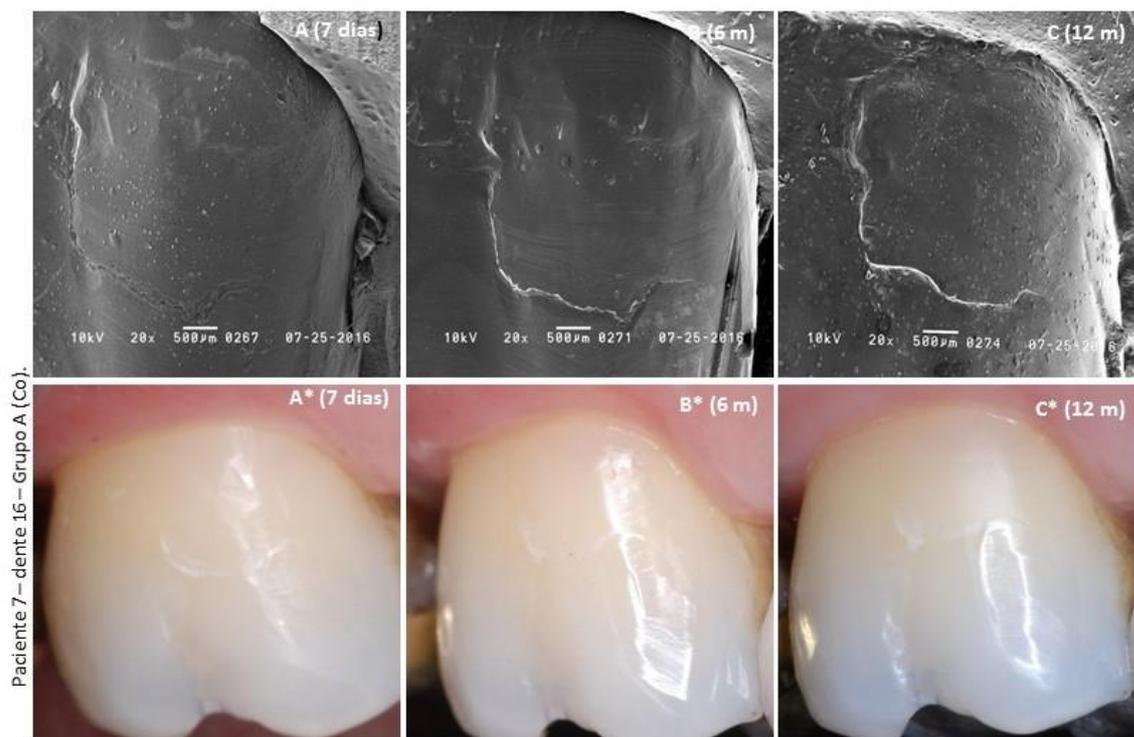
Fonte: Autoria própria.

Figura 15- Fotomicrografias em MEV de réplica de resina epóxica de restauração de LCNC pertencente ao grupo controle, após 12 meses. (A) Menor aumento (20x) incluindo toda a extensão da margem da restauração, e (B), (C) e (D) detalhes das áreas destacadas em (A), evidenciando imperfeições marginais da restauração sem evidência de fenda marginal (100x e 200x).



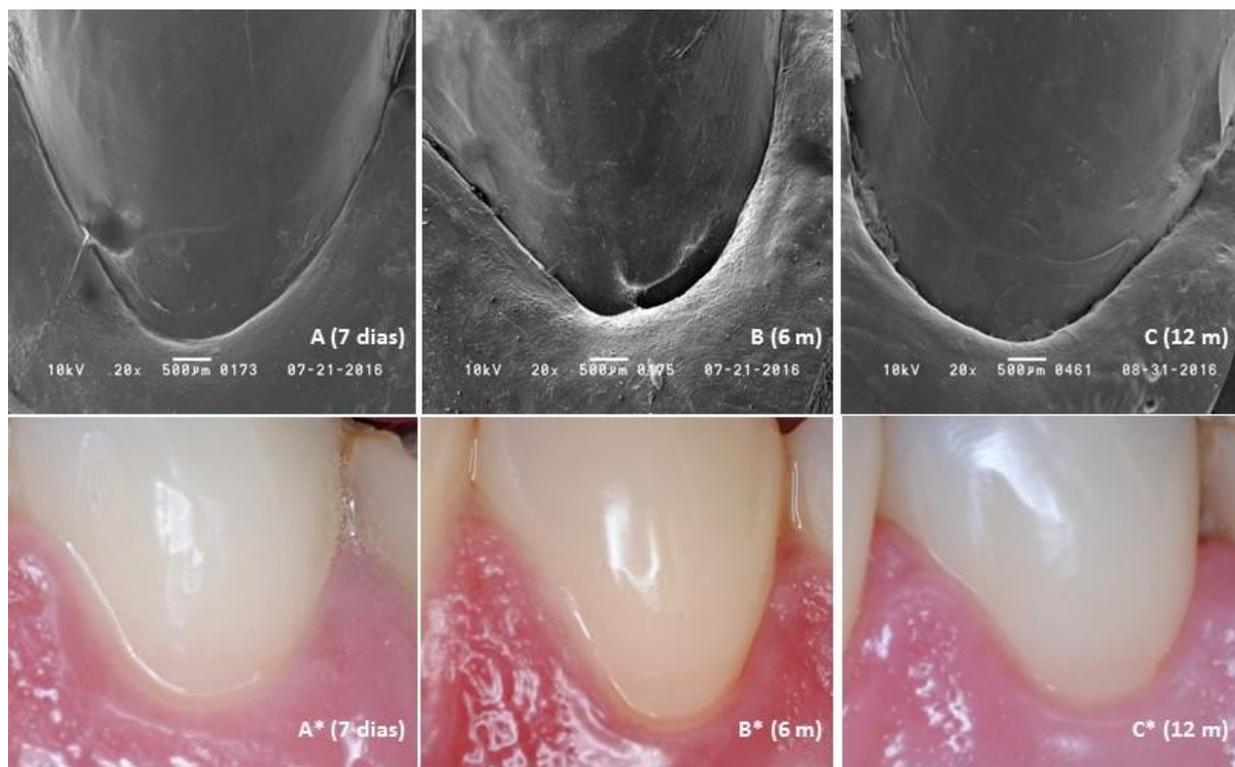
Fonte: Autoria própria.

Figura 16- (A), (B) e (C) são fotomicrografias em MEV (20x) obtidas da réplica em resina epóxica de um primeiro molar superior direito (dente 16) pertencente ao grupo controle, nos períodos de 7 dias, 6 e 12 meses, respectivamente; enquanto que (A*), (B*) e (C*) são as respectivas fotografias do mesmo dente. Desadaptação marginal foi identificada nas réplicas, porém sem a presença de fenda marginal.



Fonte: Autoria própria.

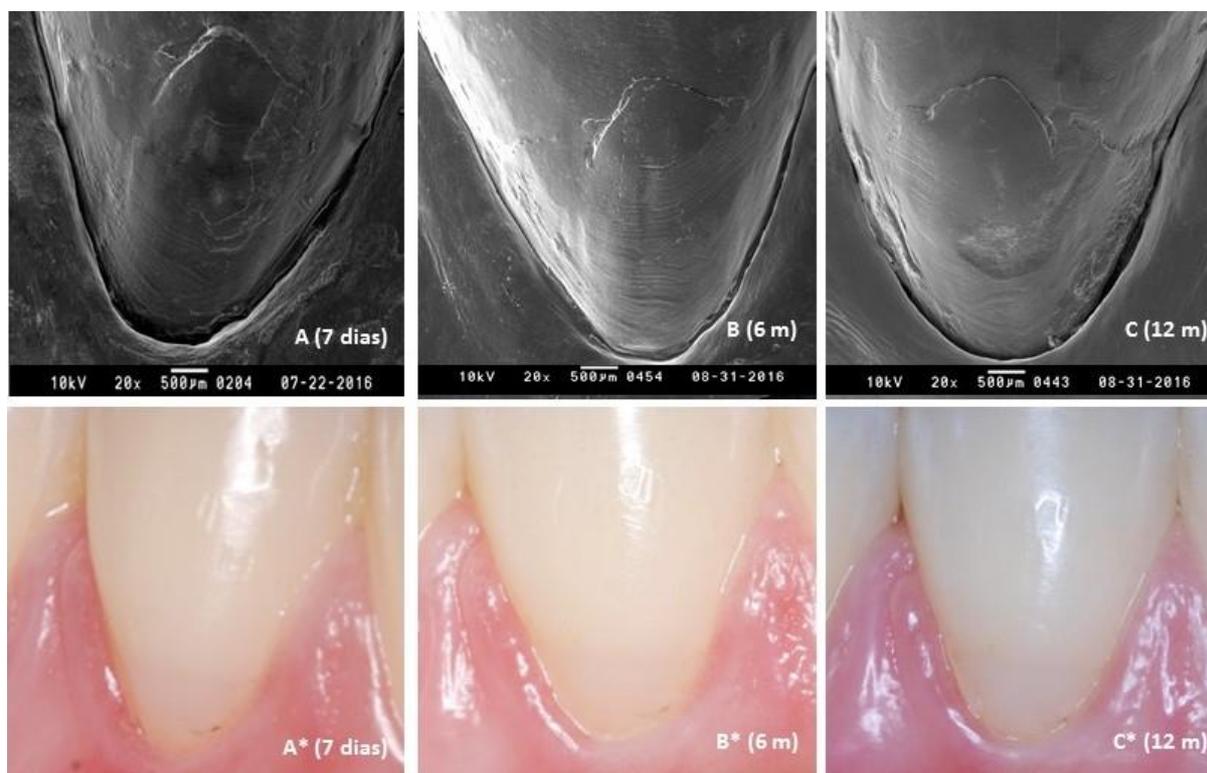
Figura 17- (A), (B) e (C) são fotomicrografias em MEV (20x) obtidas da réplica em resina epóxica de um segundo pré-molar inferior direito (dente 35, paciente 10) pertencente ao grupo experimental (aplicação de EDC), nos períodos de 7 dias, 6 e 12 meses, respectivamente; enquanto que (A*), (B*) e (C*) são as respectivas fotografias registradas clinicamente do mesmo dente. Em toda a sua extensão, a interface dente-restauração foi considerada perfeita nas duas avaliações.



Paciente 10 - dente 35 (EDC)

Fonte: Autoria própria.

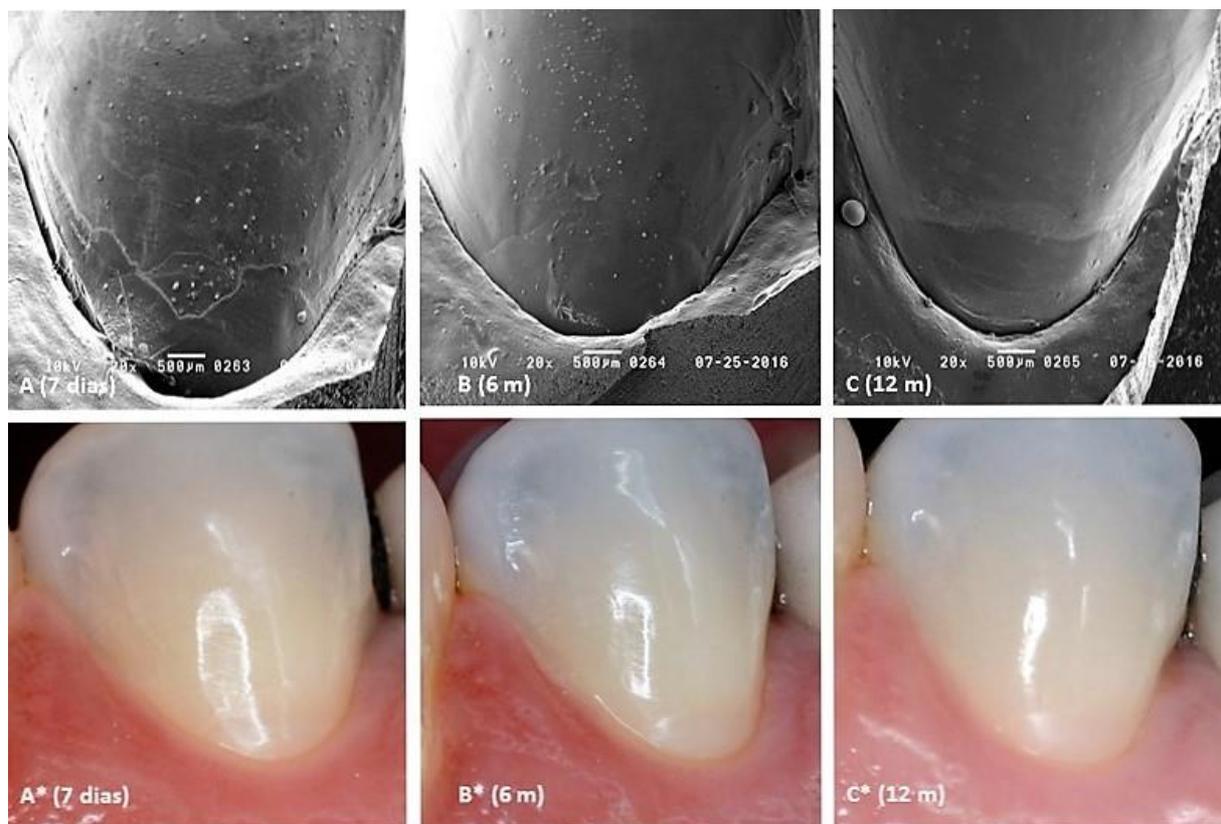
Figura 18- (A), (B) e (C) são fotomicrografias em MEV (20x) obtidas da réplica em resina epóxica de um primeiro pré-molar inferior direito (dente 44, paciente 6) pertencente ao grupo controle, nos períodos de 7 dias, 6 e 12 meses, respectivamente; enquanto que (A*), (B*) e (C*) são as respectivas fotografias clínicas do mesmo dente. Falta de integridade marginal foi identificada nas réplicas, porém sem a presença de fenda marginal.



Paciente 6- dente 44 (Co)

Fonte: Autoria própria.

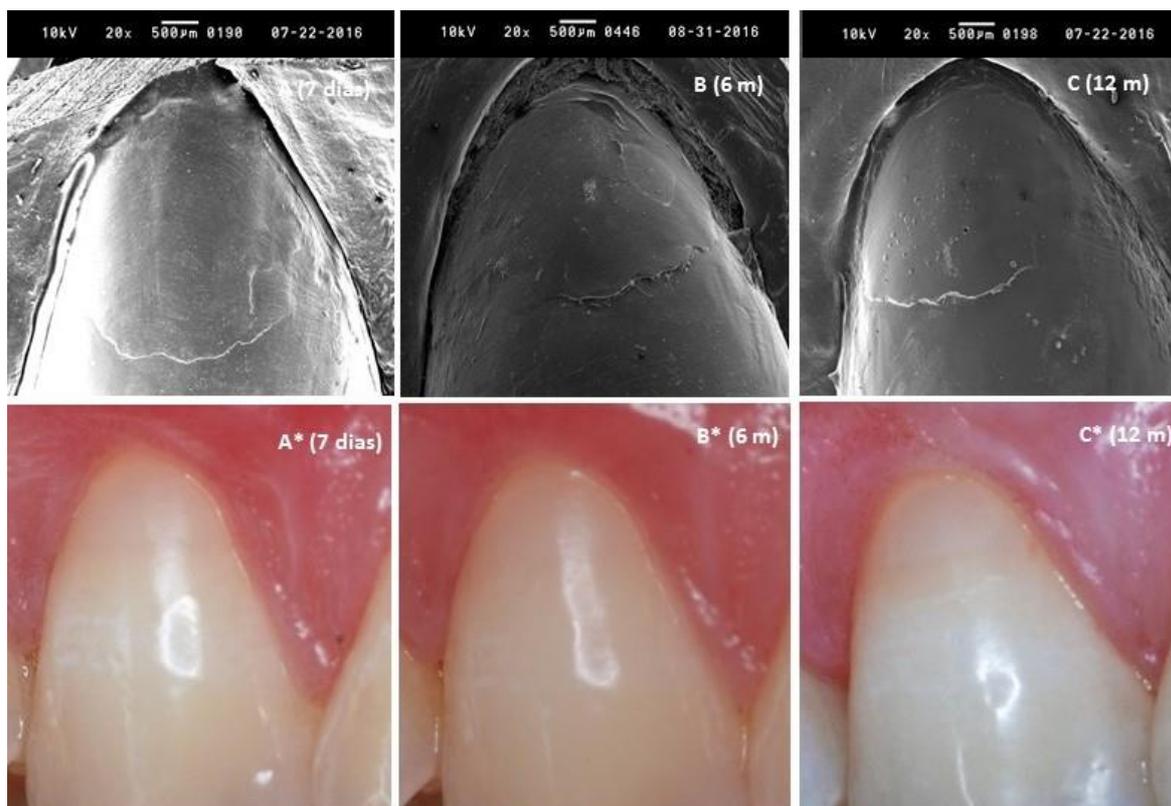
Figura 19- (A), (B) e (C) são fotomicrografias em MEV (20x) obtidas da réplica em resina epóxica de um primeiro pré-molar superior direito (dente 14, paciente 7) pertencente ao grupo experimental (aplicação de EDC), nos períodos de 7 dias, 6 e 12 meses, respectivamente; enquanto que (A*), (B*) e (C*) são as respectivas fotografias registradas clinicamente do mesmo dente. Falta de integridade marginal foi identificada nas réplicas, porém sem a presença de fenda marginal.



Paciente 7 - dente 14 - GB (EDC)

Fonte: Autoria própria.

Figura 20- (A), (B) e (C) são fotomicrografias em MEV (20x) obtidas da réplica em resina epóxica de um primeiro pré-molar superior direito (dente 14, paciente 6) pertencente ao grupo experimental (aplicação de EDC), nos períodos de 7 dias, 6 e 12 meses, respectivamente; enquanto que (A*), (B*) e (C*) são as respectivas fotografias registradas clinicamente do mesmo dente. Falta de integridade marginal foi identificada nas réplicas, porém sem a presença de fenda marginal.



Paciente 6- dente 14- GB (EDC)

Fonte: Autoria própria.

6 DISCUSSÃO

A biomodificação do colágeno dentinário objetiva aumentar a durabilidade da união resina-dentina por meio da fixação da matriz dentinária (Bedran-Russo et al.⁹, 2010; Pashley et al.⁶¹, 2011; Tjäderhane et al.⁹⁹, 2013). Além de promover novas ligações inter e intramoleculares no colágeno e torná-lo mecanicamente mais resistente, muitos dos agentes promotores de ligações cruzadas também têm ação inespecífica contra proteases, inibindo metaloproteinases da matriz (MMPs) e, potencialmente, cisteínas catepsinas (Pashley et al.⁶¹, 2011; Scheffel et al.⁷⁸, 2014).

Dentre os vários agentes promotores de ligações cruzadas, tem sido demonstrado *in vitro* que a carbodiimida (EDC) é capaz de aumentar significativamente as propriedades mecânicas do colágeno como módulo de elasticidade, resistência máxima a tração e resistência à desnaturação térmica em períodos de aplicação reproduzíveis clinicamente (Scheffel et al.⁷⁶, 2014; Cadenaro et al.¹⁹, 2016; Turco et al.¹⁰¹, 2016). Adicionalmente, esse agente é capaz de inativar MMPs (Tezvergil-Mutluay et al.⁹⁴, 2012; Scheffel et al.⁷⁸, 2014) e preservar a união resina-dentina após 12 meses de armazenamento (Scheffel et al.⁷⁷, 2015) quando aplicado por apenas 60 segundos sobre a dentina desmineralizada.

Devido ao seu mecanismo de promoção de ligações cruzadas, com a produção de um produto intermediário antes da efetivação da ligação entre o grupo carboxílico e o grupo amida de diferentes proteínas, o tempo de ação necessário para a biomodificação do colágeno (60 segundos) é maior de que o tempo necessário para a inativação de MMPs (apenas 30 segundos) quando comparado ao glutaraldeído (Scheffel et al.⁷⁸, 2014).

A despeito dos resultados favoráveis obtidos *in vitro*, até o presente momento, não é de conhecimento dos autores a existência de algum trabalho clínico avaliando o efeito da

carbodiimida na longevidade de restaurações de resina composta. Com respaldo do estudo desenvolvido por Scheffel et al.⁷⁵ (2015), no qual foi demonstrado que a carbodiimida não exerceu efeitos citotóxicos sobre células do tipo odontoblasto quando aplicada sobre discos de dentina com apenas 0,4 mm de espessura, o presente estudo foi delineado, utilizando-se o modelo experimental de boca dividida. LCNC foram selecionadas e restauradas com a combinação dos materiais Single Bond 2 como adesivo dentinário e a resina composta Z350. Em metade das restaurações, a dentina condicionada com ácido fosfórico foi tratada com EDC 0,5 mol/L (9,6%) por 60 segundos.

As LCNC são recomendadas pela ADA (*American Dental Association*) (ADA³, 2001) para avaliar o desempenho adesivo de restaurações (Carvalho et al.²⁴, 2012) por apresentarem ausência de retenção mecânica, margens em esmalte e dentina, facilidade de acesso e visibilidade, prevalência e disponibilidade. Por outro lado, estas lesões apresentam etiologia multifatorial que incluem a combinação de abrasão, erosão, abfração devido à baixa resistência intrínseca da estrutura dental na região cervical e oclusão traumática (Tay, Pashley⁹¹, 2004; Rees⁶⁹, 2000) e são capazes de reter restaurações por tempos mais longos do que os observados em estudos laboratoriais (Peumans et al.⁶⁷, 2015; Van Meerbeek et al.¹⁰⁴ 2010).

Após 12 meses de avaliação, não houve diferença significativa de desempenho clínico entre as restaurações realizadas com ou sem a incorporação de EDC. Um total de 410 avaliações clínicas foram realizadas, somente oito restaurações receberam escore C (Charlie) para o critério clínico de retenção, sendo 2 de cada grupo aos 6 meses e aos 12 meses uma restauração do grupo controle e 3 do experimental. A perda de retenção é o

parâmetro clínico mais objetivo em estudos clínicos de LCNC determinando a eficiência de um sistema adesivo e/ou tratamento (Peumans et al.⁶⁸, 2005).

Cem por cento (100%) das restaurações apresentaram integridade marginal com ausência de pigmentação degrau C (Charlie) e lesão de cárie em ambos os grupos e em todos os períodos de análise. Somente 1 dente de cada grupo apresentou sensibilidade no período de 6 meses e em relação à pigmentação marginal, apenas 3 restaurações tiveram avaliação B (Bravo), sendo 2 no período de 6 meses (1 do grupo controle e 1 do grupo experimental) e 1 aos 12 meses no GB, não correspondendo a insucesso clínico. Já a integridade marginal teve quatro casos de classificação Bravo, duas no período de 6 meses e 2 aos 12 meses, todas do grupo controle, o que também não caracterizou insucesso clínico.

Embora tenha-se utilizado um sistema adesivo simplificado (Adper Single Bond 2) visando favorecer a degradação da interface adesiva e contribuir para a avaliação em menor prazo dos possíveis efeitos protetores do EDC, os índices de sucesso clínico observados foram altos. O acúmulo de falhas na retenção variou de 0% nos primeiros 7 dias à aproximadamente 4,5% (GA) e 7,4% (GB) após 12 meses, não havendo diferença entre os grupos controle e EDC. O número elevado de sucesso clínico em LCNC (86%-93%) também foi observado por Peumans et al.⁶⁷ (2015) utilizando o sistema adesivo Clearfil SE Bond e provavelmente se deve ao fato de que todas as cavidades do presente estudo apresentavam pelo menos metade de suas margens circundadas por esmalte. Devido ao baixo conteúdo orgânico e aquoso do esmalte dentário, este tecido, após o condicionamento ácido, é facilmente infiltrado por monômeros hidrófobos do sistema adesivo, formando polímeros de alta qualidade. Assim, a união resina-esmalte é altamente confiável e durável quando comparada a união resina-dentina (Reis et al.⁷⁰, 2008).

Nenhum dos critérios avaliados apresentou diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo tratado com o agente formador de ligações cruzadas, levando a não rejeição da hipótese nula testada, de que o EDC não interfere na performance clínica das restaurações de resina composta no período de 12 meses. No entanto, certa discrepância foi observada entre os achados clínicos e as imagens obtidas em MEV, onde 60% dos dentes apresentaram alterações marginais nos 3 períodos para os 2 grupos avaliados. Esses dados refletem a maior sensibilidade e precisão da MEV, onde se utiliza aumentos acima de 20x, em relação à avaliação clínica com sonda exploradora e a olho nu. Contudo, as imperfeições encontradas nas margens das réplicas podem ser resultantes da deficiência no polimento das restaurações, uma vez que fendas marginais não foram detectadas em nenhum dos grupos e períodos, tanto nas avaliações clínicas quanto na análise qualitativa por MEV, mesmo em maiores aumentos de 100x e 200x.

O real efeito do EDC sobre a preservação da união resina-dentina *in vivo* só poderá ser comprovado com períodos mais longos de acompanhamento, nos quais se possa observar a degradação efetiva do grupo controle. Estudos realizados *in vitro* com o Single Bond 2 não demonstram redução da resistência de união à dentina nos primeiros 6 meses, mesmo em condições altamente desafiadoras, como a imersão total dos espécimes em água deionizada ou solução semelhante à saliva com as interfaces resina-dentina completamente expostas ao meio (Scheffel et al.⁷⁷, 2015; Breschi et al.¹⁶, 2009; Breschi et al.¹⁴, 2010).

A degradação da camada híbrida ocorre em duas frentes diferentes, porém não independentes: a clivagem do colágeno e a hidrólise e lixiviação da porção resinosa (Pashley et al.⁶¹, 2011; Tjäderhane et al.⁹⁹, 2013; Frassetto et al.³⁴, 2016). O colágeno dentinário começa a ser degradado logo após a ativação das proteases da dentina (MMPs e catepsinas)

e atinge seu pico de degradação em aproximadamente 4 dias (Turco et al.¹⁰¹, 2016). Após 7 dias de armazenamento, cerca de 10% da massa de colágeno é perdida e após 4 semanas a perda acumulada chega à quase 30%. Concomitantemente, os monômeros residuais e polímeros de baixa qualidade começam a ser hidrolizados e removidos da camada híbrida pelo fluido circulante. As áreas antes ocupadas por colágeno passam a ser ocupadas por fluido, o que gera um aumento na hidrólise da porção resinosa, expondo mais colágeno e continuando assim o processo de degradação da união resina-dentina (Hashimoto et al.³⁵, 2000; Hashimoto et al.³⁶, 2002). Este fenômeno requer tempo para ser observado, especialmente no cenário clínico. Ao prevenir a degradação inicial do colágeno por biomodificar a dentina e reduzir a atividade de MMPs, o EDC reduziria a degradação da união adesiva em longo prazo. Portanto, períodos superiores a 12 meses de acompanhamento são necessários para confirmar esta hipótese in vivo.

7 CONCLUSÃO

Após 12 meses de avaliação, nenhuma diferença de desempenho clínico foi observada para restaurações de resina composta realizadas em lesões cervicais não cariosas com ou sem a aplicação de carbodiimida (EDC). As taxas de sucesso clínico foram de 98,4 e 94,4 para os grupos controle e EDC, respectivamente.

REFERÊNCIAS*

1. Abdalla AI, Feilzer AJ. Four-year water degradation of a total-etch and two self-etching adhesives bonded to dentin. *J Dent*. 2008; 36(8): 611-7.
2. American Dental Association. Acceptance program guidelines for resin-based composites for posterior restorations. Chicago: Council on Scientific Affairs; 2001.
3. American Dental Association. American National Standard: specification no. 27 for resin-based filling materials. Chicago: Council on Scientific Affairs; 1993.
4. Armstrong SR, Jessop JL, Winn E, Tay FR, Pashley DH. Denaturation temperatures of dentin matrices. I. Effect of demineralization and dehydration. *J Endod*. 2006; 32(7): 638-41.
5. Armstrong SR, Vargas MA, Chung I, Pashley DH, Campbell JA, Laffoon JE et al. Resin-dentin interfacial ultrastructure and microtensile dentin bond strength after five-year water storage. *Oper Dent*. 2004; 29(6): 705-12.
6. Baldan A, Relat J, Marrero PF, Haro D. Functional interaction between peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and Mef-2C on human carnitine palmitoyltransferase 1beta (CPT1beta) gene activation. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32(16): 4742-9.
7. Bedran-Russo AK, Pashley DH, Agee K, Drummond JL, Miescke KJ. Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen crosslinkers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008; 86(2): 330-4.
8. Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, McAlpine J, Castellan CS, Phansalkar RS et al. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. *Dent Mater*. 2014; 30(1): 62-76.

* De acordo com manual da FOAr/UNESP, adaptado as normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

9. Bedran-Russo AKB, Vidal CMP, Dos Santos PH, Castellan CS. Long-term effect of carbodiimide on dentin matrix and resin dentin Bonds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010; 94(1): 250-5.
10. Bertassoni LE, Orgel JP, Antipova O, Swain MV. The dentin organic matrix – limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale. *Acta Biomater.* 2012; 8(7): 2419-33.
11. Boecklera A, Boecklera L, Eppendorfc K, Schallerd HG, Gernhardtte CR. A prospective, randomized clinical trial of a two-step self-etching vs two-step etch-and-rinse Adhesive and SEM margin analysis: four-year results. *J Adhes Dent.* 2012; 14(6): 585-92.
12. Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dib A, Sword RJ, Pashley DH. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. *Oper Dent.* 2007; 32(2): 107-11.
13. Breschi L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vita F, Carrilho M, et al. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. *J Adhes Dent.* 2009; 11(3): 191-8.
14. Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L, et al. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dental Mater.* 2010; 26(6): 571-8.
15. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L, et al. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dent Mater.* 2010; 26(4): 320-5.
16. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater.* 2008; 24(1): 90-101.
17. Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3(3): 207-14.
18. Cadenaro M, Antonioli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Prati C, et al. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2005; 113(6): 525-30.
19. Cadenaro M, Fontanive L, Navarra CO, Gobbi P, Mazzoni A, Di Lenarda R, et al. Effect of carbodiimide on thermal denaturation temperature of dentin collagen. *Dent Mater.* 2016; 32(4): 492-8.

20. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldeli S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res.* 2007; 86(1): 90-4.
21. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay FR, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, et al. In vivo preservation of hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res.* 2007; 86(6): 529–33.
22. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjäderhane L, Mazzoni A, et al. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 90(1): 373-80.
23. Carvalho RM, Manso AP, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH. Durability of bonds and clinical success of adhesive restorations. *Dent Mater.* 2012; 28(1): 72-86.
24. Carvalho RM, Tay F, Sano H, Yoshiyama M, Pashley DH. Long-term mechanical properties of EDTA-demineralized dentin matrix. *J Adhes Dent.* 2000; 2(3): 193-9.
25. Castellan CS, Bedran-Russo AK, Antunes A, Pereira PN. Effect of dentin biomodification using naturally derived collagen cross-linkers: one-year bond strength study. *Int J Dent.* 2013; 2013: 918010.
26. Chapman JE, Tzaphlidou M, Meek KM, Kadler KE. The collagen fibril - a model system for studying the staining and fixation of a protein. *Electron Microsc Ver.* 1990; 3(1): 143-82.
27. Chee B, Rickman L, Satterthwaite JD. Adhesives for the restoration of non-carious cervical lesions: a systematic review. *J Dent.* 2012; 40(6): 443-52.
28. Cova A, Breschi L, Nato F, Ruggeri A Jr, Carrilho M, Tjäderhane L, et al. Effect of UVA-activated riboflavin on dentin bonding. *J Dent Res.* 2011; 90(12): 1439-45.
29. Cvar JF, Ryge G. Reprint of criteria for the clinical evaluation of dental restorative materials. *Clin Oral Investig.* 2005; 9(4): 215-32.
30. Dayan D, Binderman I, Mechanic GL. A preliminary study of activation of collagenase in carious human dentine matrix. *Arch Oral Biol.* 1983; 28(2): 185-7.

31. Di Lullo GA, Sweeney SM, Korkko J, Ala-Kokko L, San Antonio JD. Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *J Biol Chem.* 2002; 277(6): 4223-31.
32. Duncan TJ, Tanaka Y, Shi D, Kubota A, Quantock AJ, Nishida K. Flow-manipulated, crosslinked collagen gels for use as corneal equivalents. *Biomaterials.* 2010; 31(34): 8996-9005.
33. Ermis RB, Van Landuyt KL, Cardoso MV, De Munck J, Van Meerbeek B, Peumans M: Clinical effectiveness of a one-step self-etch adhesive in non-carious cervical lesions at 2 years. *Clin Oral Investig.* 2012; 16(3): 889-97.
34. Frassetto A, Breschi L, Turco G, Marchesi G, Di Lenarda R, Tay FR, et al. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability--A literature review. *Dent Mater.* 2016; 32(2):e41-53.
35. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res.* 2000; 79(6): 1385-91.
36. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. *Biomaterials.* 2003; 24(21): 3795-803.
37. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Tay FR, Kaga M, Kudou Y, et al. Micromorphological changes in resin-dentin bonds after 1 year of water storage. *J Biomed Mater Res.* 2002; 63(3): 306-11.
38. Hass V, Dobrovolski M, Zander-Grande C, Martins GC, Gordillo LA, Rodrigues Accorinte Mde L, et al. Correlation between degree of conversion, resin-dentin bond strength and nanoleakage of simplified etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater.* 2013; 29(9): 921-8.
39. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res.* 2005; 84(8): 741-6.
40. Hosaka K, Nishitani Y, Tagami J, Yoshiyama M, Brackett WW, Agee KA, et al. Durability of resin-dentin bonds to water- vs. ethanol-saturated dentin. *J Dent Res.* 2009; 88(2): 146-51.

41. Kafienah W, Dieter, Buttle DJ, Croucher LJ, Hollander AP. Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *Biochem J.* 1998; 1; 331(Pt 3): 727-32.
42. Kim J, Gu L, Breschi L, Tjäderhane L, Choi KK, Pashley DH, et al. Implication of ethanol wet-bonding in hybrid layer remineralization. *J Dent Res.* 2010; 89(6): 575-80.
43. Kim J, Uchiyama T, Carrilho M, Agee KA, Mazzoni A, Breschi L, et al. Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. *Dent Mater.* 2010; 26(8): 771-8.
44. Landis WJ. Mineral characterization in calcifying tissues: atomic, molecular and macromolecular perspectives. *Connect Tissue Res.* 1996; 34(4): 239-46.
45. Liu N, Li F, Chen Y, Zhang L, Lu S, Kang J, et al. The inhibitory effect of a polymerisable cationic monomer on functional matrix metalloproteinases. *J Dent.* 2013; 41(11): 1101-8.
46. Loguercio AD, Stanislawczuk R, Polli LG, Costa JA, Michel MD, Reis A. Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin–dentin bond strength durability. *Eur J Oral Sci.* 2009; 117(5): 587-96.
47. Malcor JD, Bax D, Hamaia SW, Davidenko N, Best SM, Cameron RE, et al. The synthesis and coupling of photoreactive collagen-based peptides to restore integrin reactivity to an inert substrate, chemically-crosslinked collagen. *Biomaterials.* 2016; 85: 65-77.
48. Marchesi G, Frassetto A, Visintini E, Diolosa M, Turco G, Salgarello S, et al. Influence of ageing on self-etch adhesives: one-step vs two-step systems. *Eur J Oral Sci.* 2013; 121(1): 43-9.
49. Marshall Jr. Dentin: microstructure and characterization. *Quintessence Int.* 1993; 24(9): 606-17.
50. Mazzoni A, Angeloni V, Apolonio FM, Scotti N, Tjäderhane L, Tezvergil-Mutluay A, et al. Effect of carbodiimide (EDC) on the bond stability of etch-and-rinse adhesive systems. *Dent Mater.* 2013; 29(10): 1040-7.

51. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Leo Tjäderhane L et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials*. 2006; 27(25): 4470-6.
52. Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri A Jr, et al. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis. *J Biomed Mater Res A*. 2009; 88(3): 697-703.
53. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. 2006; 69(3): 562-73.
54. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res*. 1982; 16(3): 265-73.
55. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, et al. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci*. 2006; 114(2): 160-6.
56. Niu LN, Zhang W, Pashley DH, Breschi L, Mao J, Chen JH, et al. Biomimetic remineralization of dentin. *Dent Mater*. 2014; 30(1): 77-96.
57. Olde Damink LH, Dijkstra PJ, van Luyn MJ, van Wachem PB, Nieuwenhuis P, Feijen J. Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. *Biomaterials*. 1996; 17(8): 765-73.
58. Orsini G, Ruggeri A Jr, Mazzoni A, Papa V, Piccirilli M, Falconi M, et al. Immunohistochemical identification of type I and type III collagen and chondroitin sulphate in human pre-dentine: a correlative FEI-SEM/TEM study. *Int Endod J*. 2007; 40(9): 669-78.
59. Osorio R, Erhardt MC, Pimenta LA, Osorio E, Toledano M. EDTA treatment improves resin-dentin bonds' resistance to degradation. *J Dent Res*. 2005; 84(8): 736-40.
60. Osorio R, Yamauti M, Sauro S, Watson TF, Toledano M. Experimental resin cements containing bioactive fillers reduce matrix metalloproteinase-mediated dentin collagen degradation. *J Endod*. 2012; 38(9): 1227-32.

61. Pashley DH, Tay FR, Imazato S. How to increase the durability of resin-dentin bonds. *Compend Contin Educ Dent*. 2011; 32(7): 60-4, 66.
62. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res*. 2004; 83(3): 216-21.
63. Pashley DH. In vitro simulations of in vivo bonding conditions. *Am J Dent*. 1991; 4(5): 37-40.
64. Paul SJ, Leach M, Rueggeberg FA, Pashley DH. Effect of water content on the physical properties of model dentine primer and bonding resins. *J Dent*. 1999; 27(3): 209–14.
65. Perdigão J, Muñoz MA, Sezinando A, Luque-Martinez IV, Staichak R, Reis A, et al. Immediate adhesive properties to dentin and enamel of a universal adhesive associated with a hydrophobic resin coat. *Oper Dent*. 2014; 39(5): 489-99.
66. Perdigão J, Reis A, Loguercio AD. Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. *J Esthet Restor Dent*. 2013; 25(4): 219-41.
67. Peumans M, De Munck J, Van Landuyt K, Van Meerbeek B. Thirteen-year randomized controlled clinical trial of a two-step self-etch adhesive in non-cariou cervical lesions. *Dent Mater*. 2015; 31(3): 308-14.
68. Peumans M, Kanumilli P, De Munk J, Van Landuyt K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Clinical effectiveness of contemporary adhesives: A systematic review of current clinical trials. *Dent Mater*. 2005; 21(9): 864-81.
69. Rees JS. A review of the biomechanics of abfraction. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 2000; 8(4): 139-44.
70. Reis A, Carrilho M, Breschi L, Loguercio AD. Overview of clinical alternatives to minimize the degradation of the resin-dentin bonds. *Oper Dent*. 2013; 38(4): E1-E25.
71. Ricci HA, Sanabe ME, de Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Chlorhexidine increases the longevity of in vivo resin–dentin bonds. *Eur J Oral Sci*. 2010; 118(4): 411-6.
72. Sabbagh J, Vreven J, Leloup G. Dynamic and static moduli of elasticity of resin-based materials. *Dent Mater*. 2002; 18(1): 64-71.

73. Salz U, Zimmermann J, Zeuner F, Moszner N. Hydrolytic stability of self-etching adhesive systems. *J Adhes Dent.* 2005; 7(2): 107-16.
74. Sartori N, Stolf SC, Silva SB, Lopes GC, Carrilho M. Influence of chlorhexidine digluconate on the clinical performance of adhesive restorations: a 3-year follow-up. *J Dent.* 2013; 41(12): 1188-95.
75. Scheffel DL, Bianchi L, Soares DG, Basso FG, Sabatini C, de Souza Costa CA, et al. Transdental cytotoxicity of carbodiimide (EDC) and glutaraldehyde on odontoblast-like cells. *Oper Dent.* 2015; 40(1): 44-54.
76. Scheffel DL, Hebling J, Scheffel RH, Agee KA, Cadenaro M, Turco G, et al. Stabilization of dentin matrix after cross-linking treatments, in vitro. *Dent Mater.* 2014; 30(2): 227-33.
77. Scheffel DLS, Delgado CC, Soares DG, Basso FG, de Souza Costa CA, Pashley DH, et al. increased durability of Resin-dentin bonds following cross-linking treatment. *Oper Dent.* 2015; 40(5): 533-9.
78. Scheffel DLS, Hebling J, Scheffel RH, Agee K, Turco G, de Souza Costa CA, et al. Inactivation of matrix-bound matrix metalloproteinases by cross-linking agents in acid-etched dentin. *Oper Dent.* 2014; 39(2): 152-8.
79. Schulz KF, Altman DG, Moher D, for the CONSORT Group. CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *Ann Int Med.* 2010; 152(11): 726-32.
80. Sezinando A, Luque-Martinez I, Muñoz MA, Reis A, Loguercio AD, Perdigão J. Influence of a hydrophobic resin coating on the immediate and 6-month dentin bonding of three universal adhesives. *Dent Mater.* 2015; 31(10): e236-46.
81. Singh M, Papas A, Vollmer W, Bader J, Laws R, Maupome G et al. Predictors of coronal caries progression in adults: results from the prevention of adult caries study. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2013; 41(6): 558-64.
82. Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res.* 2002; 62(3): 447-56

83. Spencer P, Ye Q, Park J, Topp EM, Misra A, Marangos O, et al. Adhesive/dentin interface: the weak link in the composite restoration. *Ann Biomed Eng.* 2010; 38(6): 1989-2003.
84. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res.* 2002; 81(9): 603-7.
85. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(2): 121-7.
86. Swift Jr EJ, Perdigão J, Heymann HO, Wilder Jr AD, Bayne SC, May Jr KN et al. Eighteen-month clinical evaluation of a filled and unfilled dentin adhesive. *J Dent.* 2001; 29(1): 1-6.
87. Takano Y, Sakai H, Baba O, Terashima T. Differential involvement of matrix vesicles during the initial and appositional mineralization processes in bone, dentin, and cementum. *Bone.* 2000; 26(4): 333-9.
88. Tay FR, Pashley DH, Kapur RR, Carrilho MR, Hur YB, Garrett LV, et al. Bonding BisGMA to dentin--a proof of concept for hydrophobic dentin bonding. *J Dent Res.* 2007; 86(11): 1034-9.
89. Tay FR, Pashley DH. Guided tissue remineralisation of partially demineralised human dentine. *Biomaterials.* 2008; 29(8): 1127-37.
90. Tay FR, Pashley DH. Have dentin adhesives become too hydrophilic? *J Can Dent Assoc.* 2003; 69(11): 726-31.
91. Tay FR, Pashley DH. Resin bonding to cervical sclerotic dentin: a review. *J Dent.* 2004; 32(3): 173-96.
92. Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Pääkkönen V, Martins MT, et al. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *J Endod.* 2010; 36(3): 475-81
93. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Uchiyama T, Imazato S, Mutluay MM, Cadenaro M, et al. Inhibitory effects of quaternary ammonium methacrylates on soluble and matrix-bound MMPs. *J Dent Res.* 2011; 90(4): 535-40.

94. Tezvergil-Mutluay A, Mutluay MM, Agee KA, Seseogullari-Dirihan R, Hoshika T, Cadenaro M, et al. Carbodiimide cross linking inactivates soluble and matrix-bound MMPs, in vitro. *J Dent Res.* 2012; 91(2): 192-6.
95. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Hoshika T, Carrilho M, Breschi L, Tjäderhane L, et al. The requirement of zinc and calcium ions for functional MMP activity in demineralized dentin matrices. *Dent Mater.* 2010; 26(11): 1059-67.
96. Thompson JM, Agee K, Sidow SJ, McNally K, Lindsey K, Borke J, et al. Inhibition of endogenous dentin matrix metalloproteinases by ethylenediaminetetraacetic acid. *J Endod.* 2012; 38(1): 62-5.
97. Tjäderhane L, Carrilho MR, Breschi L, Tay FR, Pashley DH: Dentin basic structure and composition- an overview. *Endod Topics.* 2012; 20(1): 3-29.
98. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinase in dentin matrix during breakdown in carious lesions. *J Dent Res.* 1998; 77(8): 1622-9.
99. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol ILS, Geraldeli S, et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer—a review. *Dent Mater.* 2013; 29(10): 999-1011.
100. Tjäderhane L. Dentin bonding: can we make it last? *Oper Dent.* 2015; 40(1): 4-18.
101. Turco G, Frassetto A, Fontanive L, Mazzoni A, Cadenaro M, Di Lenarda R, et al. Occlusal loading and cross-linking effects on dentin collagen degradation in physiological conditions. *Dent Mater.* 2016; 32(2): 192-9.
102. Van Dijken JW, Hörstedt P. Marginal adaptation to enamel of a polyacid-modified resin composite (compomer) and a resin-modified glass ionomer cement in vivo. *Clin Oral Investig.* 1997; 1(4): 185-90.
103. Van Landuyt KL, De Munck J, Mine A, Cardoso MV, Peumans M, Van Meerbeek B. Filler debonding & subhybridlayer failures in self-etch adhesives. *J Dent Res.* 2010; 89(10): 1045-50.

104. Van Meerbeek B, Peumans M, Poitevin A, Mine A, Van Ende A, Neves A, et al. Relationship between bond-strength tests and clinical outcomes. *Dent Mater.* 2010; 26(2): e100-21.
105. Wang Y, Spencer P. Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interface using confocal Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res.* 2002; 59(1): 46-55.
106. Xu HH, Smith DT, Jahanmir S, Romberg E, Kelly JR, Thompson VP, et al. Indentation damage and mechanical properties of human enamel and dentin. *J Dent Res.* 1998; 77(3): 472-80.

APÊNDICE

A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Eu _____ portador(a) do documento
n. _____, profissão _____, morador(a)
a _____ n.º _____, município de
_____, entendo que estou autorizando a minha participação
como voluntário(a) na pesquisa intitulada “ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO TRIPLO CEGO DO
EFEITO DA APLICAÇÃO DA CARBODIIMIDA (EDC) NO DESEMPENHO DE RESTAURAÇÕES EM RESINA
COMPOSTA - 12 MESES DE AVALIAÇÃO”, sob responsabilidade da Profa. Dra. Josimeri Hebling.

Para tanto, tomo ciência de que:

01. A pesquisa tem o objetivo de testar um novo material, já utilizado, quanto a sua capacidade de aumentar a durabilidade da restauração. Esta pesquisa se justifica devido ao grande interesse no desenvolvimento de materiais que produzam restaurações de resina composta mais duráveis.
02. As restaurações e avaliações serão realizadas na faculdade de odontologia de Araraquara (FOAr- UNESP) e serei submetido a fotografias e moldagens parciais dos dentes restaurados em todas as consultas e retornos agendados. As fotografias não serão publicadas com a identificação do paciente ou sem a sua autorização prévia e por escrito. Os retornos para avaliação serão agendados para 1 semana, 6, 12 meses após a realização das restaurações.
03. A realização da pesquisa não implica em riscos aos participantes uma vez que os materiais a serem avaliados já foram testados e são utilizados em consultórios odontológicos ou na área médica. Porém, acidentes decorrentes da anestesia para tratar o dente podem acontecer, como dor, hemorragia, falta de sensibilidade na área e infecção. A ocorrência de tais problemas será minimizada com a utilização de material esterilizado e cuidados no momento da anestesia. Após a restauração se o dente permanecer sensível, a restauração será imediatamente substituída;
04. O pesquisador se responsabilizará por qualquer problema decorrido da realização da restauração dos dentes, ficando responsável pela assistência integral necessária;
05. Não será oferecido nenhum tipo de pagamento pela minha participação nesta pesquisa.
06. Tenho total autonomia para cancelar ou interromper a minha participação na pesquisa, sem qualquer penalidade, perda de benefícios ou repercussão ao atendimento nesta Faculdade.
07. O pesquisador responsável garante sigilo quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa. Fotografias serão realizadas, porém a minha identidade será preservada.

Eu declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma via deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Em caso de dúvidas poderei chamar a estudante de doutorado Cláudia Huck, no telefone (19) 981689963 ou Professora Dra. Josimeri Hebling no telefone (16) 33016334 ou o Comitê de Ética em

Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara SP, nos telefones: (16) 3301 6432 ou (16) 3301 6434.

Araraquara, __/__/_____.

Assinatura do paciente ou responsável

Josimeri Hebling
Pesquisadora Responsável

B – Tabelas complementares

Tabela B1- Tabela de distribuição por idade dos indivíduos que participaram do recrutamento e intervenção.

Distribuição por idade	n de homens avaliados	n de mulheres avaliados	n de pacientes avaliados	n de homens encaminhados para intervenção	n de mulheres encaminhados para intervenção	n total de pacientes encaminhados para intervenção
25-30 anos	0	1	1	0	0	0
31-40 anos	6	10	16	5	5	10
41-50 anos	3	12	15	3	4	7
51-60 anos	4	9	13	2	4	6
61- 70 anos	1	1	2	0	0	0
Total	14	33	47	9	13	23

Tabela B2- Tabela com os números de identificação dos indivíduos que participaram do estudo (IDp) e respectivas, idade, gênero e número de LCNC restauradas.

Número de identificação (IDp)	Idade	Gênero	n. de LCNC
1	52	F	4
2	33	M	12
3	45	M	6
4	49	M	6
5	34	M	4
6	31	F	8
7	49	F	4
8	40	F	6
9	53	F	6
10	38	M	8
11	41	M	8
12	53	M	10
13	53	F	6
14	41	F	2
15	34	F	2
16	53	M	8
17	38	F	2
18	54	F	6
19	45	F	6
20	35	F	14
21	34	M	14

Tabela B3- Frequências de sucesso (S) e insucessos (I) observadas nas avaliações de integridade marginal.

Grupo	Integridade marginal	Tempo			Total
		7 dias	6 meses	12 meses	
Controle	S	71	67	64	202
	I	0	0	0	0
Experimental	S	71	67	62	200
	I	0	0	0	0
Total		142	134	126	402

Tabela B4- Frequências de sucesso (S) e insucessos (I) observadas nas avaliações de pigmentação marginal.

Grupo	Pigmentação marginal	Tempo			Total
		7 dias	6 meses	12 meses	
Controle	S	71	67	64	202
	I	0	0	0	0
Experimental	S	71	67	62	200
	I	0	0	0	0
Total		142	134	126	402

Tabela B5- Frequências de sucesso (S) e insucessos (I) observadas nas avaliações de lesão de cárie.

Grupo	Lesão de cárie	Tempo			Total
		7 dias	6 meses	12 meses	
Controle	S	71	69	65	205
	I	0	0	0	0
Experimental	S	71	69	65	205
	I	0	0	0	0
Total		142	138	130	410

Tabela B6- Frequências observadas nas avaliações de integridade marginal categorizadas como grau B (Bravo) pelo método USPHS/Ryge.

Período	Integridade Marginal	
	Grupo Controle	Grupo experimental (EDC)
7 dias	0	0
6 meses	2	0
12 meses	2	0
Total	4	0

Tabela B7- Frequências observadas nas avaliações de pigmentação marginal categorizadas como grau B (Bravo) pelo método USPHS/Ryge.

Período	Pigmentação Marginal	
	Grupo controle	Grupo experimental (EDC)
7 dias	0	0
6 meses	1	1
12 meses	0	1
Total	1	2

ANEXO A

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO TRIPLO CEGO DO EFEITO DA APLICAÇÃO DA CARBODIIMIDA(EDC)NO DESEMPENHO DE RESTAURAÇÕES EM RESINA COMPOSTA - 12 MESES DE AVALIAÇÃO

Pesquisador: JOSIMERI HEBLING COSTA

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 34361914.0.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 917.242

Data da Relatoria: 15/12/2014

Apresentação do Projeto:

Estudo clínico randomizado triplo cego que seguirá as normas de padronização para relatórios clínicos do CONSORT, com pacientes com idade entre 25 e 55 anos.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o desempenho clínico de restaurações de resina composta em lesões cervicais não cariosas (LCNC) realizadas com ou sem a aplicação de um agente de ligação cruzada, durante o período de 12 meses.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O pesquisador descreve os riscos com anestesia, com sensibilidade pós-operatória, mordida pós-anestesia e do uso do EDC sem diluição, descrevendo as formas de minimização dos mesmos com EPI e garante no TCLE assistência integral ao paciente inclusive com substituição da restauração caso ocorra algum problema.

BENEFÍCIOS: O principal benefício será o tratamento dos dentes acometidos por lesões cervicais não cariosas nos dentes, lesões estas, que podem se apresentar sensíveis. Também será realizada profilaxia e orientação a higiene oral a todos os pacientes no início do tratamento. Se o paciente

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: 1633-0164

Fax: 1633-0164

E-mail: cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 917.242

apresentar outras necessidades, será adequadamente orientado a procurar atendimento, o qual poderá ser realizado em nossas clínicas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa bem delineada com critérios de inclusão e exclusão claramente definidos.

Critérios de inclusão: Paciente com idade entre 25 a 55 anos. Pacientes com mais de 20 dentes naturais. Presença de duas (2) ou mais lesões cervicais não cáries em dentes caninos, pré molares e molares. Cavidades não retentivas. Presença de dentes antagonistas naturais. Margem cervical em dentina ou cimento e incisal/oclusal em esmalte.

Critérios de exclusão Pacientes não hábeis ao entendimento dos procedimentos e orientações. Gestantes ou mulheres em fase de amamentação. Pacientes que estejam usando analgésicos ou medicamentos anti-inflamatórios de uso contínuo. Pacientes com severas doenças sistêmicas ou psicológicas. Pacientes sob tratamento ortodônticos. Fumantes Pacientes com bruxismo severo. (>50% da estrutura dental perdida por atrição) Pacientes com doenças periodontais e gengivais severas. Presença de cárie, trincas, fraturas nos dentes selecionados. Ausência de vitalidade pulpar. Presença de esclerose dentinária grau 4.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Atendidas pendências de reunião, considero APROVADO o protocolo.

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: 1633-0164

Fax: 1633-0164

E-mail: cep@foar.unesp.br;

mnagle@foar.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 917.242

ARARAQUARA, 16 de Dezembro de 2014

Assinado por:
Lígia Antunes Pereira Pinelli
(Coordenador)

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: 1633-0164

Fax: 1633-0164

E-mail: cep@foar.unesp.br;

mnagle@foar.unesp.br

ANEXO B



SECRETARIA DE SAÚDE
ARARAQUARA
DESENVOLVIMENTO PARA TODOS

AUTORIZAÇÃO

Informamos que Cláudia Huck, pesquisadora e aluna da Pós-Graduação/Doutorado da FOAr/UNESP Araraquara está autorizada pelas Gerências de Saúde Bucal e da Educação Permanente a realizar conversas com os Cirurgiões Dentistas das unidades básicas de saúde (CMS e USF) para divulgar seu projeto de pesquisa intitulado **Estudo Clínico randomizado triplo cego do efeito da aplicação da carbodiimida (EDC) no desempenho de restaurações em resina composta – 12 meses de avaliação**, a ser realizado nas dependências da Faculdade de Odontologia (FOAr/ENESP), sob a orientação da Prof^a Dr^a Josimeri Hebling Costa, Pesquisadora responsável.

A aluna Cláudia Huck apresentou todos os documentos necessários solicitados e o parecer com aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa sem pendências à Gerência de Educação Permanente e foi orientada a realizar agendamento prévio das datas para as visitas, conforme sugestão da Gerência de Saúde Bucal.

Araraquara, 24 de fevereiro de 2015

Maria do Rosário Quinello Carnesecca

Gerente da Educação Permanente

Secretaria Municipal de Saúde

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 12/12/2018

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara 12 de dezembro de 2016.

CLÁUDIA HUCK