



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



CRISTIANE MAYUMI INAGATI

ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E DEGRADAÇÃO DA MATRIZ DA DENTINA
BOVINA E HUMANA

Araraquara

2017



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



CRISTIANE MAYUMI INAGATI

ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E DEGRADAÇÃO DA MATRIZ DA DENTINA
BOVINA E HUMANA

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Josimeri Hebling

Araraquara

2017

Inagati, Cristiane Mayumi

Atividade proteolítica e degradação da matriz da dentina bovina e humana / Cristiane Mayumi Inagati. -- Araraquara: [s.n.], 2017
78 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Prótese) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Josimeri Hebling

1. Dentina 2. Metaloproteases 3. Hidroxiprolina I. Título

CRISTIANE MAYUMI INAGATI

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E DEGRADAÇÃO DA MATRIZ DA DENTINA
BOVINA E HUMANA**

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Comissão julgadora

Presidente e orientadora: Profa. Dra. Josimeri Hebling

2º Examinador: Prof. Dra. Mariane Emi Sanabe

3º Examinador: Prof. Dr. Gelson Luis Adabo

Araraquara, 12 de maio de 2017

DADOS CURRICULARES

CRISTIANE MAYUMI INAGATI

NASCIMENTO: 17/08/1987, Apucarana - PR

FILIAÇÃO: Eva Sizuka Inagati
Carlos Inagati

2009/2014: Curso de Graduação em Odontologia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

2015/2017: Curso de Pós-graduação em Reabilitação Oral
Nível: mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp

DEDICATÓRIA

“A Grande Conquista é o resultado de pequenas vitórias que passam despercebidas.”

Paulo Coelho

Em primeiro lugar, dedico a **Deus**, por sempre me acompanhar nas horas boas e ruins. Acredito que sem a presença Dele iluminando todos os meus passos não teria alcançado todas as minhas realizações e conquistas. Para Deus nada é impossível.

À Maria, mãe do nosso Senhor, pela força que me dá a cada dia para que eu continue lutando, em meio a tantas dificuldades, e por me permitir levantar todos os dias para um novo recomeço de cada dia.

Ao meu pai, **Carlos Inagati** (*in memoriam*)...não há palavras para descrever o amor que eu sempre sentirei pelo senhor. Dizer um simples muito obrigada é pouco por tudo que o senhor fez por mim. Obrigada pela família maravilhosa que construímos, por todo o seu amor e principalmente por sempre me incentivar a estudar diariamente e nunca desistir dos meus sonhos e objetivos.

À minha mãe, **Eva Inagati**...não há palavras para te agradecer por tudo que você fez e faz por mim até hoje. Obrigada por ser uma mãe exemplar, por ter me concedido uma educação de excelência, sobretudo por ser guerreira em dar

continuidade naquilo que foi deixado pelo meu pai e por cuidar da nossa família tão bem. Sem a sua força e confiança não poderia ter chegado tão longe.

Ao meu irmão, **Alex**, que mesmo com todas as nossas diferenças sempre permanecemos unidos.

Aos meus avós maternos, **Tshumoru** (*in memorian*) e **Nakako Yamada** (*in memorian*), mesmo distantes sei que sempre torceram e torcem por mim.

Os meus tios, **Teresa e Paulo**, apesar da distância, sempre estão presentes na minha e na vida da minha família, nos ajudando e torcendo para que tudo ocorra como o planejado.

Aos meus primos **Augusto, Silvana, Marisa, Osvaldo, Eliza, Hélio, Meire, Edna, Marcia e Sadao** agradeço por sempre torcerem por mim e por estarem presentes na minha vida. Saibam que tenho imensa alegria de ter vocês como parte da minha família.

Aos meus amigos que me dão o conforto, palavras de amizade sincera e força para eu continuar batalhando por aquilo que eu acredito, fica aqui a minha singela homenagem.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu alcançasse os meus sonhos e objetivos finais saibam que estão guardados em meu coração.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

“É nos momentos difíceis que encontramos os verdadeiros amigos.”

Clarice Lispector

Gostaria primeiramente de agradecer a minha querida orientadora, **Profa. Dra. Josimeri Hebling**, professora do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp. Agradeço por todo o seu carinho, auxílio, dedicação, paciência e, sobretudo, por me passar um pouco do seu amplo conhecimento. Agradeço também por todo o seu acolhimento e confiança depositada em meu trabalho mesmo sem me conhecer. Foi uma experiência difícil, mas muito gratificante. Apesar da distância durante o primeiro ano do meu mestrado, a senhora sempre esteve disposta a me ajudar, me dando todo o suporte necessário para que eu desenvolvesse a minha pesquisa. Para mim foi um imenso prazer ter tido a oportunidade de trabalhar com uma pesquisadora e pessoa tão maravilhosa quanto a senhora. Muito obrigada.

À **Profa. Dra. Débora Scheffel**, aluna de pós-doutorado da Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp. Muito obrigada por sua amizade, conversas, conselhos e por sempre estar disposta a me ajudar em tudo que necessitei durante o mestrado. Acredito que sem os seus conhecimentos e o seu incentivo não teria realizado a minha pesquisa. Você é uma inspiração para mim e dizer um simples obrigado é pouco por tudo que você fez e faz por mim. Sucesso sempre.

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, professor do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp. Agradeço por ter me recebido com tanto carinho em seu laboratório durante a ausência da minha orientadora, pelo seu apoio e contribuição para a realização deste projeto.

Um professor que não posso esquecer de agradecer pela sua calma e tranquilidade que transmite a todos os seus alunos, **Prof. Dr. Gelson Luis Adabo**, professor do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese. Meus sinceros agradecimentos por transmitir a mim todo o seu conhecimento e sua experiência durante esses dois anos. Tenho a certeza que sou uma pessoa melhor com todo o conhecimento que o senhor me transmitiu.

À **Profa. Dra. Ligia Antunes Pereira Pinelli**, professora do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese. Professora, agradeço por sua orientação no estágio docência na disciplina de prótese fixa e sobre implantes I e II, sobretudo pela sua amizade durante os dois anos de convívio. Suas palavras, seus conselhos e suas críticas construtivas durante esses anos me fizeram crescer a cada dia.

Ao **Prof. Dr. José Mauricio dos Reis**, professor do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese. Obrigada por todo o seu conhecimento que foi transmitido a mim, pelo clínico que o senhor é, pela sua amizade e sua humildade meus sinceros agradecimentos. Se um dia eu obter 10 por cento dos seus conhecimentos clínicos eu estarei imensamente feliz.

À **Profa. Dra. Renata Garcia Fonseca**, professora do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese. Meus sinceros agradecimentos pela calma e tranquilidade que me transmitiu durante o meu exame de qualificação com todo o seu conhecimento, dedicação e contribuição para enriquecer ainda mais o meu trabalho.

À **Dra. Giovana Anovazzi Medeiros**, aluna de pós-doutorado da Faculdade de Odontologia de Araraquara. Giovana, faz poucos meses que nos conhecemos, mas parece que já convivemos há anos. Apesar de pouco tempo, você tem me ajudado muito nesses últimos meses, me aconselhando e sempre se oferecendo para ajudar. Você é uma pessoa muito especial, espero continuar trabalhando com você. Muito obrigada por tudo.

Às minhas amigas, **Bruna Cristina de Souza, Carla Barbosa e Rosângela Viegas**. Vocês, para mim, além de amigas são como minhas irmãs. Com vocês eu aprendi o poder da amizade sincera e sei que posso contar sempre com cada uma para eu desabafar quando necessitar. Obrigada por me ouvirem sempre. Dizer um muito obrigada é pouco para vocês que sempre torceram por mim. Valeu meninas que a nossa amizade perdure para o resto das nossas vidas.

Às minhas amigas **Fabielle, Patricia, Luciana, Aline, Gabriela, Luana, Mariany, Simoni e Karla**. Sou grata por nossa amizade que começou num pensionato de freiras há quase 10 anos. Morei com cada uma em épocas diferentes, mas todas vocês são muito especiais para mim. Morar com vocês foi incrível, lá nascia uma linda amizade, que mesmo com a distância, perdura até os dias de hoje. Muito obrigada por tudo “girls”.

Aos meus amigos, **Willian, Aneliza, Adriana, Ana Márcia, Luciene, Andressa, Flávia, Camila Terra, Camila Rafaela, Esdras, Nádia, Kezia e Fabiola.** Amigos que ganhei durante a minha graduação. Apesar da distância sempre os tenho em meu coração. Obrigada sempre pela torcida e confiança.

Ao **Dr. Marcos Guskuma e toda a sua equipe** por todos os seus ensinamentos durante o período em que estive em sua clínica como estagiária e hoje posso agradecer pela amizade e carinho.

Às minhas amigas, **Midian, Natali e Uxua**, muito obrigada pela amizade sincera. Sinto que vocês foram o meu maior presente desses dois anos. Admiro cada uma de vocês pelo o que são. Aprendi um pouco com cada uma e fico muito agradecida, sobretudo, pela força que vocês transmitem a mim. Vocês são os amigos que conquistei durante o mestrado.

À minha amiga e colega de laboratório **Cláudia Huck**, minha eterna gratidão pela sua amizade, paciência e pelo seu convívio diário nesses dois anos. Levarei você sempre comigo.

Às minhas amigas de laboratório, **Carla, Ana Paula, Juliana, Leopoldina, Fernanda, Diana, Taisa, Suelen, Maria Luisa, Ester, Mariana e Lais** pelo o convívio do dia a dia e por todo o suporte que vocês me deram durante o mestrado.

A todos os alunos do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais muito obrigada pela convivência e pelo o aprendizado que me foram transmitidos.

Aos meus amigos do mestrado, **Stephania, Lucas, Guilherme Rocha, Guilherme Braidó, Vinicius, Gabriela, Bruna, Larissa, Priscila, Jacqueline e Elkin**, pela batalha de cada dia.

AGRADECIMENTOS

*“Por mais simples que seja, um riso autêntico inscreve
um agradecimento aos nossos olhos.”*

Marcel Franco

À **Universidade Estadual Paulista - “Julio de Mesquita Filho”**, em nome do atual magnífico reitor **Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini** e do vice-reitor **Prof. Dr. Sergio Roberto Nobre**. Agradeço por fazer parte dessa universidade que me fez crescer pessoalmente e, principalmente, profissionalmente.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara**, nas pessoas da atual diretora **Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato** e seu vice-diretor **Prof. Dr. Edson Alves de Campos**, por ter me acolhido nesta Instituição de Ensino.

Ao **Laboratório de Pesquisas e Análises de Biomateriais**, do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp, sob a coordenação da **Profa. Dra. Josimeri Hebling**, onde foi desenvolvida grande parte desta pesquisa.

Ao **Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais**, sob a coordenação do **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, pelo apoio financeiro e de infraestrutura para esta pesquisa.

Ao **Departamento de Fisiologia e Patologia**, nas pessoas do atual chefe de departamento, **Prof. Dr. Eduardo Colombari** e seu vice-chefe **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**.

Ao **Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral**, aqui representado pela atual coordenadora **Prof. Dra. Ana Cláudia Pavarina** e vice-coordenadora **Profa. Dra. Renata Garcia Fonseca**, pela confiança depositada no meu potencial, meus sinceros agradecimentos.

Ao **Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese**, nas pessoas do atual chefe de departamento **Prof. Dr. Gelson Luis Adabo** e seu vice-chefe **Prof. Dr. João Neudenir Arioli Filho**. Meus sinceros agradecimentos por terem permitido o meu crescimento profissional, pelos conhecimentos compartilhados por todos os professores nas disciplinas cursadas e nos estágios docência durante o mestrado.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**, pela concessão da bolsa de mestrado, concedida no período de dezembro/ 2015 a março/ 2017.

À **Sonia Maria Tircallo**, secretária do Departamento de Clínica Infantil. Muito obrigada por toda a atenção e por sempre estar disposta a solucionar os problemas quando estes apareceram.

A todos os professores do programa de Reabilitação Oral por todo o conhecimento e dedicação em transmitir o que sabem, minha singela homenagem.

A todos os funcionários da faculdade de Odontologia de Araraquara, pelo convívio e carinho com os quais desenvolvem seus trabalhos, deixando o ambiente mais agradável, e também pela atenção que cada um teve por mim.

A todos os professores e funcionários da Universidade Estadual de Londrina (UEL) meus sinceros agradecimentos. Eu não teria chegado tão longe se vocês não tivessem me dado tantas oportunidades, conselhos, prestatividade, amizade e carinho durante a minha graduação.

A todos os orientados da clínica de Prótese Fixa meu muito obrigada por todos os ensinamentos e pela amizade sincera de cada um. Vocês foram o meu maior presente e foi um enorme prazer ter compartilhado um pouco do que aprendi com vocês.

Por fim agradeço a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha história, sempre torcendo e vibrando pelo o meu sucesso profissional e pessoal, minha singela homenagem.

***“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que
as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia
impossível.***

(Charles Chaplin)

Inagati CM. Atividade proteolítica e degradação da matriz da dentina bovina e humana [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

RESUMO

Dentes bovinos têm sido utilizados como substitutos aos dentes humanos, especialmente em pesquisas sobre adesão. Entretanto, ainda não foi demonstrada se a degradação do colágeno de ambos os substratos ocorre na mesma intensidade/velocidade. Portanto, esse estudo comparou a atividade de metaloproteinases da matriz (MMPs) e a degradação da matriz dentinária de dentes bovinos versus humanos. A coroa de dentes humanos e bovinos foram seccionadas para a obtenção de espécimes de dentina (0,5x1,0x4,0 mm). Todos os espécimes (n=30/tipo de dente) foram completamente desmineralizados em ácido fosfórico. Quinze espécimes foram aleatoriamente selecionados para a análise da atividade total de MMPs por método colorimétrico, e os restantes foram utilizados para a análise de perda de massa seca em balança microanalítica. Concluídas as análises iniciais, os espécimes foram armazenados em saliva e as análises, perda de massa seca e MMPs, foram repetidas após 7, 14 e 21 dias. Em cada período, a saliva foi coletada para a análise da liberação de hidroxiprolina por meio de teste colorimétrico. Os dados foram submetidos aos testes de Friedman, Wilcoxon para medidas repetidas e Mann-Whitney ($p < 0,05$). A atividade inicial de MMPs foi similar dentre os dois substratos, com redução significativa em função do tempo, especialmente após 7 dias de armazenamento. Aos 7, 14 e 21 dias de análise, a atividade de MMPs foi mais intensa para a dentina bovina. Aos 7 dias houve elevada liberação de hidroxiprolina para ambos os substratos, sendo que maiores valores foram encontrados para a dentina bovina. Aumento da perda de massa seca também foi observado em função do tempo. Entretanto, diferença significativa entre os dois substratos foi detectada apenas aos 21 dias. Em conclusão, embora a velocidade da atividade proteolítica e de liberação de hidroxiprolina tenha sido similar para ambos os substratos, a intensidade desses eventos foi maior para a dentina bovina.

Palavras-chave: Dentina. Metaloproteases. Hidroxiprolina.

Inagati CM. Proteolytic activity and matrix degradation of bovine and human dentin [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

ABSTRACT

Bovine teeth have been often used as a substitute for human teeth in studies about enamel and dentin adhesion. However, it has not yet been shown if the degradation of collagen of both substrates occurs at the same intensity and rate. Therefore, this study compared the total activity of matrix metalloproteinases (MMPs) and the degradation rate of dentin matrix from bovine versus human teeth. The crowns of human and bovine teeth were sectioned to obtain specimens of dentin (0.5x1.0x4.0mm). All specimens (n=30/tooth type) were completely demineralized in phosphoric acid. Fifteen specimens were randomly selected for the total MMPs activity analysis by a colorimetric method, while the remaining specimens were used to determine the loss of dry mass in a microanalytical balance. Once the initial analyses were concluded, the specimens were stored in saliva-like solution, and both analyzes, dry mass and MMPs activity, were repeated after 7, 14 and 21 days. In each period, the saliva was collected to determine the amount of hydroxyproline released by means of a colorimetric assay. The data were submitted to Friedman, repeated-measures Wilcoxon and Mann-Whitney tests ($p < 0.05$). Similar initial MMP activity was seen between the two substrates, with a significant reduction over time, especially after 7 days. At 7, 14 and 21 days, bovine dentin had a higher proteolytic activity. After 7 days, there was a high hydroxyproline release for both substrates, with significantly higher amounts seen for the bovine dentin. Increased dry mass loss was also observed as a function of time. However, a significant difference between both substrates was detected only after 21 days. In conclusion, although the rate of proteolytic activity and hydroxyproline release were similar for both substrates, the intensity of these events were greater for the bovine dentin.

Keywords: Dentin. Metalloproteases. Hydroxyproline.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Adesão à dentina	21
2.2 Degradação da união resina-dentina	22
2.3 A dentina humana e suas proteases	23
2.4 Características da dentina bovina	29
2.5 Dentina bovina vs. humana na odontologia adesiva	30
3 PROPOSIÇÃO	33
3.1 Proposição geral	33
3.2 Proposições específicas	33
4 MATERIAL E MÉTODO	34
4.1 Organograma do estudo	34
4.2 Obtenção dos espécimes de dentina	35
4.3 Obtenção das matrizes de colágeno	37
4.4 Determinação da atividade total de MMP	38
4.5 Equivalência à atividade de MMP-9	39
4.6 Determinação da massa seca e das frações constituintes da dentina .	40
4.7 Armazenamento em solução tipo saliva	41
4.8 Liberação de hidroxiprolina (HYP)	42
4.9 Análise estatística	43
5 RESULTADO	45
5.1 Composição simplificada da dentina bovina e humana	45
5.2 Atividade total de MMPs da dentina bovina e humana	45
5.3 Equivalência à MMP-9	46
5.4 Perda de massa seca	47
5.5 Liberação de hidroxiprolina (HYP)	49
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXO A	70
ANEXO B	73

1 INTRODUÇÃO

Os procedimentos restauradores adesivos têm se tornado mais eficazes, estéticos e conservadores. Enquanto as primeiras resinas compostas e sistemas adesivos apresentavam baixa resistência de união e reduzida durabilidade (Davidson et al.²⁰, 1984; Asmussen et al.⁴, 1985), os materiais contemporâneos apresentam resultados muito mais satisfatórios. Mesmo assim, cerca de 50% dos procedimentos restauradores realizados atualmente, ainda tem por objetivo a substituição ou reparo de restaurações que falharam por diferentes motivos, dentre eles, a degradação da interface adesiva (Gordan et al.³⁵, 2012). Essa degradação pode ser inferida clinicamente pela presença de pigmentação marginal, desadaptação marginal, perda parcial ou total da restauração e/ou presença de lesão de cárie associada as margens da restauração (Demarco et al.²², 2012).

A união resina-dentina é estabelecida após a desmineralização superficial do tecido dentinário por meio da aplicação de ácido fosfórico, no caso de sistemas adesivos convencionais, ou de monômeros ácidos quando da utilização de sistemas autocondicionantes (Nakabayashi et al.⁶⁴, 1982; Wang, Spencer¹¹⁶, 2003; Spencer et al.⁹⁷, 2004; Carvalho et al.¹³, 2005; Anchieta et al.², 2015). A dissolução dos cristais de hidroxiapatita cria espaços para a infiltração do sistema adesivo por entre as fibrilas de colágeno, as quais deveriam ser completamente protegidas por polímeros (Nakabayashi et al.⁶⁴, 1982), preferencialmente hidrófobos e resistentes a degradação hidrolítica mediada por esterases (Tay et al.¹⁰³, 2007; Sadek et al.⁸², 2008; Shin et al.⁹¹, 2009). Entretanto, em função de tempo, temperatura e pressão comparáveis clinicamente, não é possível a produção de uma camada híbrida livre de imperfeições, e, portanto, essa

estrutura é considerada como sendo a mais frágil da união resina-dentina (Spencer et al.⁹⁸, 2010). Como consequência da infiltração incompleta da zona de dentina desmineralizada, componentes orgânicos da dentina ficam expostos na camada híbrida, favorecendo a degradação (Wang, Spencer¹¹⁶, 2003; Spencer et al.⁹⁷, 2004; Carvalho et al.¹³, 2005; Anchieta et al.², 2015; Scheffel et al.⁸⁶, 2016).

O colágeno do tipo I representa 90% do conteúdo orgânico da matriz dentinária, enquanto que proteínas não colagênicas compreendem os restantes 10% (Tjäderhane et al.¹⁰⁸, 2012). Durante o processo de desmineralização da dentina essas proteínas não colagênicas são expostas juntamente com o colágeno. Dentre essas proteínas, encontram-se as metaloproteinases da matriz (MMPs), proteases residentes no próprio tecido (endopeptidases) capazes de degradar a maioria dos componentes da matriz extracelular, incluindo o colágeno em sua forma nativa ou desnaturada. As MMPs têm responsabilidade direta no processo de deterioração da interface adesiva por clivarem as moléculas de colágeno expostas na camada híbrida via inclusão de uma molécula de água (portanto são classificadas como hidrolases) (Pashley et al.⁷², 2011; Mazzoni et al.⁶⁰, 2012; Seseogullari-Dirihan et al.⁹⁰, 2015; Larger et al.⁴⁹, 2016; De Vito Moraes et al.²⁴, 2016).

A deterioração da interface adesiva ocorre simultaneamente em duas frentes, (1) a degradação da porção orgânica da camada híbrida (fibrilas de colágeno), que corresponde a aproximadamente 46% do processo (Hu et al.⁴², 2015), e (2) a degradação do componente resinoso da interface, ou seja, a hidrólise dos polímeros instáveis e de natureza hidrófila (De Munck et al.²³, 2003; Ferrari, Tay²⁷, 2003; Wang, Spencer¹¹⁶, 2003; Pashley et al.⁷³, 2004).

Devido às dificuldades crescentes na obtenção de dentes humanos para pesquisas *in vitro*, muitos estudos têm utilizado a dentina bovina como substrato alternativo em pesquisas sobre adesão (Francisconi et al.³¹, 2008; Li et al.⁵¹, 2014; Prylinska-Czyzewska et al.⁷⁷, 2015; Li et al.⁵⁰, 2015; Chiba et al.¹⁹, 2016). No entanto, há restrições quanto a extrapolação dos resultados obtidos com dentina bovina para a dentina humana. Trabalhos que avaliaram as características morfológicas e fisiológicas de ambos os substratos mostraram similaridades entre eles quanto ao número e diâmetro de túbulos presentes na dentina coronária de incisivos bovinos e molares humanos decíduos e permanentes (Schilke et al.⁸⁷, 2000; Soares, Santos⁹⁵, 2015), ao coeficiente de expansão térmica (Lopes et al.⁵⁷, 2012), a resistência de união imediata (Reis et al.⁷⁸, 2004; Soares et al.⁹³, 2016), ao desenvolvimento e inibição de lesões cáries (Hara et al.³⁷, 2003; Lippert, Lynch⁵⁴, 2014), erosivas e abrasivas (Young-Laurance et al.¹¹⁸, 2011; Wegehaupt et al.¹¹⁶, 2008), as propriedades mecânicas (Novais et al.⁶⁷, 2016), a permeabilidade dentinária (Schmalz et al.⁸⁸, 2001) e a composição química (Soares, Santos⁹⁴, 2015; Teruel et al.¹⁰⁴, 2015). Também foi demonstrado, que tanto MMP-2 como MMP-9 estão presentes em ambos os substratos (Kato et al.⁴⁶, 2011). Entretanto, neste último trabalho, os autores observaram que a atividade de MMP-9 foi equivalente para a dentina humana e bovina, enquanto que a atividade de MMP-2 foi 30% maior para a dentina humana.

A despeito da evidência produzida até o momento, respaldando a utilização de dentes bovinos em diferentes protocolos de pesquisa, não é de conhecimento dos autores da presente dissertação a existência de trabalhos que tenham comparado a taxa (velocidade) e a intensidade da degradação da matriz de dentina de dentes bovinos com a de dentes humanos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Adesão à dentina

Diferentemente do esmalte, a dentina apresenta uma característica mais orgânica e úmida, sendo que 20% de seu peso corresponde a proteínas, principalmente colágeno do tipo I, e 10% a água (Embery et al.²⁵, 2001; Tjaderhane et al.¹⁰⁸, 2012). Seu íntimo contato com o tecido pulpar permite a circulação de fluido dentinário pelos túbulos, repleto de íons e biomoléculas, mantendo este substrato constantemente úmido. Além disso, a presença dos odontoblastos confere à dentina sensibilidade e capacidade de defesa (Tjäderhane et al.¹⁰⁸, 2012).

Embora ao longo dos anos os sistemas adesivos tenham evoluído, tanto em sua formulação quanto na técnica empregada (Sauro et al.⁸⁴, 2008; Soares et al.⁹⁴, 2013), o estabelecimento de uma união resina-dentina perfeita e estável em longo prazo ainda não é uma realidade clínica (Pashley et al.⁷², 2011), podendo ser produzidas somente em laboratórios com temperatura, pressão e tempo rigorosamente controlados (Spencer et al.⁹⁸, 2010). A umidade intrínseca, heterogeneidade morfológica, composição complexa e atividade proteolítica da dentina a tornam um substrato mais hostil à hibridização quando comparada ao esmalte (Pashley et al.⁷², 2011).

Ao empregar a técnica úmida, a água mantida na matriz dentinária induz a separação de fases do sistema adesivo e dificulta a evaporação de seu solvente (Paul et al.⁷⁴, 1999). Estes fatores levam, respectivamente, a maior infiltração de monômeros com menor peso molecular e mais hidrófilos por entre os espaços interfibrilares do que monômeros maiores e mais hidrófobos (Spencer, Wang⁹⁶, 2002) e compromete o grau de conversão polimérica (Cadenaro et al.⁹, 2005; Chee et al.¹⁸, 2012; Hass et al.³⁹, 2013). Além disso, a profundidade de desmineralização

gerada pelo agente condicionador excede a capacidade de infiltração monomérica, resultando na formação de uma área de dentina desmineralizada não reforçada por resina na base da camada híbrida, (Nakabayashi et al.⁶⁵, 1998; Hashimoto et al.³⁸, 2000; Wang, Spencer¹¹⁶, 2003; Spencer et al.⁹⁷, 2004; Scheffel et al.⁸⁶, 2016) que pode ser observada tanto para sistemas convencionais (Wang, Spencer¹¹⁶, 2003; Spencer et al.⁹⁷, 2004; Scheffel et al.⁸⁶, 2016) como para sistemas auto-condicionantes (Oliveira et al.⁶⁹, 2004; Carvalho et al.¹³, 2005).

A hibridização incompleta da dentina desmineralizada leva ao estabelecimento de camadas híbridas imperfeitas, com porosidades, regiões com diferentes graus de hidrofilia e áreas de colágeno exposto. Assim, a camada híbrida é ao mesmo tempo a mais importante para o sucesso da interface adesiva e a mais suscetível a falhas e degradação de suas porções resinosa e proteica ao longo do tempo (Tjäderhane¹⁰⁹, 2015).

2.2 Degradação da união resina-dentina

Embora os sistemas adesivos atuais apresentem uma excelente efetividade a curto prazo (Peumans et al.⁷⁶, 2005; Carvalho et al.¹⁴, 2012), estudos clínicos e laboratoriais tem mostrado a degradação da interface adesiva ao longo do tempo, levando à redução considerável da resistência de união e até mesmo à perda da restauração (Van Meerbeek et al.¹¹⁴, 2010; Marchesi et al.⁴⁹, 2013; Perdigão et al.⁷⁵, 2013). A qualidade e durabilidade da camada híbrida depende da estabilidade de seus componentes, resina e colágeno, e sua capacidade de resistir ao processo de hidrólise (Tjäderhane et al.¹¹¹, 2013). Em 2004, Armstrong et al.³ demonstraram a quase completa desintegração desses componentes, em dentes permanentes,

após 44 meses de armazenamento. O mesmo processo foi descrito por Hebling et al.⁴⁰ (2005), em dentes decíduos, após somente 6 meses de função *in vivo*.

A água é a principal responsável pela degradação da camada híbrida, eluindo polímeros hidroliticamente instáveis ao se ligar a grupos ésteres durante a vida funcional da interface, o que leva ao aumento das imperfeições no interior da camada híbrida e à ocorrência e manutenção da nanoinfiltração (De Munck et al.²³, 2003; Ferrari, Tay²⁷, 2003; Tay, Pashley¹⁰², 2003; Wang, Spencer¹¹⁶, 2003; Pashley et al.⁷³, 2004). Além disso, a água viabiliza a clivagem do colágeno desprotegido, processo este que pode ser consideravelmente acelerado pelas proteases presentes no substrato dentinário (Pashley et al.⁷³, 2004; Tersariol et al.¹⁰⁴, 2010). A atividade proteolítica intrínseca da dentina foi descrita pela primeira vez por Dayan et al.²¹ (1983) e posteriormente melhor explorada por Pashley et al.⁷³ (2004), os quais demonstraram a liberação de metaloproteinases da matriz (MMPs) pelo condicionamento ácido e a capacidade destas enzimas de clivar o colágeno dentinário exposto, contribuindo para o processo de degradação da união resina-dentina. No mesmo trabalho, os autores também demonstraram a possibilidade do tratamento da dentina com agentes capazes de inibir as MMPs, como a clorexidina, abrindo um novo horizonte na pesquisa com inibidores de proteases.

2.3 A dentina humana e suas proteases

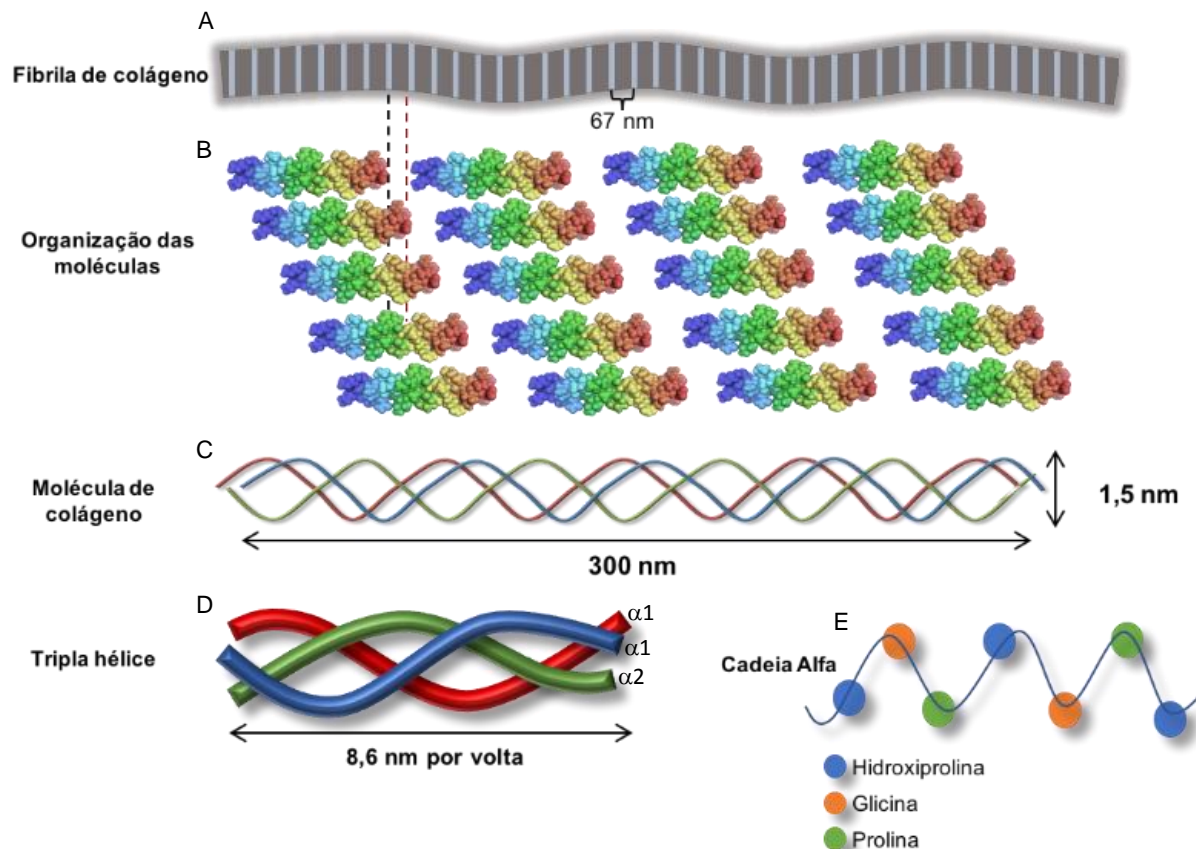
A dentinogênese tem início com a diferenciação das células ectomesenquimais da periferia da papila dentária em odontoblastos, que ao longo do processo de diferenciação e polarização passam a secretar matriz dentinária. Assim como os demais tecidos passíveis de mineralização, a matriz de dentina apresenta um componente fibrilar (fibrilas de colágeno) e a substância fundamental

interfibrilar. Concomitantemente à secreção das fibrilas de colágeno, surgem dos odontoblastos, as vesículas da matriz que darão início ao processo de mineralização (Katchburian, Arana⁴⁵, 2012). Durante a deposição de cristais de apatita a matriz dentinária excedente é degradada pelas metaloproteinases da matriz (MMPs) (Fanchon et al.²⁶, 2007) que permanecem aprisionadas na dentina após a conclusão do processo de mineralização (Mazzoni et al.⁶², 2009)

Ao final da odontogênese, a dentina humana é composta, em peso, por 70% de conteúdo mineral, 20% de conteúdo orgânico e 10% de água. Quando seu volume é levado em consideração estes valores são alterados para 45%, 33% e 22%, respectivamente (Marshall⁵⁹, 1993). A fração mineral da dentina é composta por cristais de apatita, fosfato de cálcio, carbonatos, sulfato, flúor, zinco e ferro. Já seu conteúdo orgânico apresenta 90% de colágeno, predominantemente do tipo I, e 10% de proteínas não colagenosas como sialoproteínas, fosfoproteínas, proteoglicanas, fosforinas, proteínas morfogênicas dentinárias, proteínas séricas, fatores de crescimento e proteases (Linde⁵³, 1989; Butler⁸, 1998; Orsini et al.⁷¹, 2007; Tjäderhane et al.¹⁰⁸, 2012).

As fibrilas de colágeno tipo I são constituídas por diversas moléculas dispostas de forma organizada. Cada molécula tem a forma de um pequeno bastão originado pelo entrelaçamento de 3 cadeias polipeptídicas denominadas de cadeias α , sendo duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$ (Figura 1) que apresentam variações na sequência e no número de aminoácidos (Chapman et al.¹⁶, 1990). Durante os procedimentos adesivos são estas fibrilas que, após o condicionamento ácido, servirão de arcabouço para o estabelecimento da camada híbrida (Nakabayashi et al.⁶⁴, 1982).

Figura 1- (A) Esquema representativo de uma fibrila de colágeno com suas estrias características, que distam 67 nm entre si. A região clara representa área de “gap” (linha pontilhada preta), enquanto a região escura representa área de “overlap” (linha pontilhada vermelha), ou seja, sobreposição de moléculas. (B) Moléculas de colágeno dispostas de forma organizada em número de cinco para formar uma microfibrila. (C) Cada molécula é uma tripla hélice (D) resultante do entrelaçamento de (E) 3 cadeias alfa que tem como principais aminoácidos a hidroxiprolina, a glicina e a prolina.



Fonte: Imagem reproduzida de Chapman et al.¹⁶, 1990

Excluindo-se o colágeno, o restante da porção orgânica da dentina (10%) apresenta diversas proteínas essenciais para sua organização, maturação e mineralização (Takano et al.¹⁰¹, 2000), dentre elas estão as proteases, enzimas capazes de degradar proteínas por meio da quebra de ligações peptídicas por hidrólise (hidrolases), convertendo-as a cadeias menores (Hannas et al.³⁶, 2007;

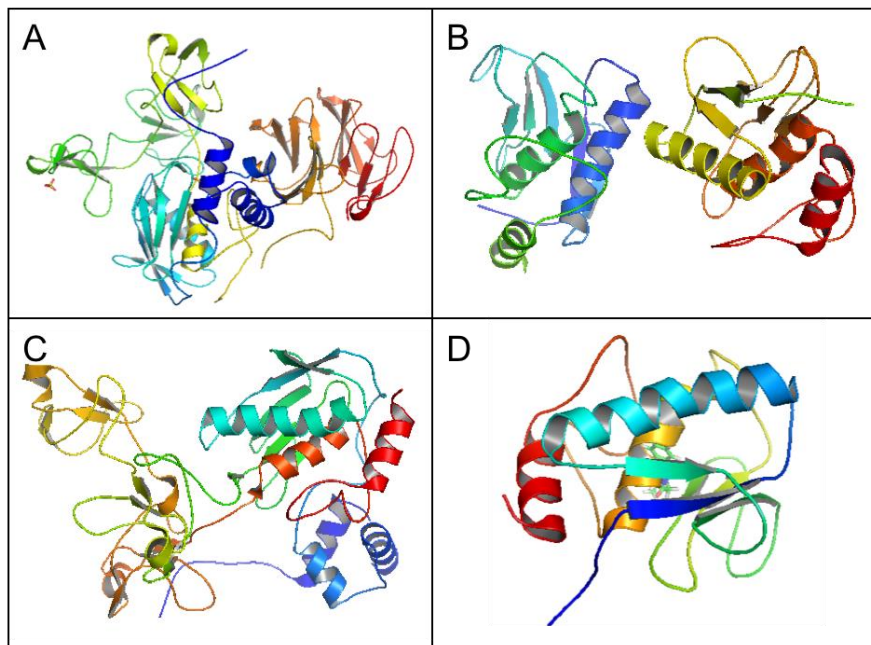
Frassetto et al.³², 2016). De modo geral, as hidrolases podem ser classificadas em 7 grupos: serinas, treoninas, proteases de ácido aspártico, proteases de ácido glutâmico, cisteínas e metaloproteinases (Kohei⁴⁷, 2012), sendo as duas últimas amplamente estudadas em dentina humana (Pashley et al.⁷³, 2004; Mazzoni et al.⁶¹, 2006; Carrilho et al.¹², 2009; Tersariol et al.¹⁰⁴, 2010).

As Metaloproteinases da Matriz (MMPs) recebem este nome por serem enzimas diretamente dependentes de cálcio e zinco (metais) para manterem, respectivamente, sua estrutura tridimensional e sua atividade catalítica (Visse, Nagase¹¹⁵, 2003; Tezvergil-Mutluay et al.¹⁰⁶, 2010). Elas estão espalhadas por diversos tecidos do corpo humano, participando de processos fisiológicos e patológicos como a formação e remodelação tecidual, mineralização dos tecidos dentários, inflamações, metástase de tumores, doenças periodontais, lesões de cárie, entre outros. As MMPs atuam destruindo o colágeno e outras proteínas da matriz extracelular (Tjäderhane et al.¹¹⁰, 1998; Brinckerhoff, Matrisian⁷, 2002; Nemeth et al.⁶⁷, 2002; Kukacka et al.⁴⁸, 2005; Chaussain- Miller et al.¹⁷, 2006; Liu et al.⁵⁵, 2006; Nagase et al.⁶⁶, 2006; Orsini et al.⁷⁰, 2012) e podem ser divididas, de acordo com a especificidade do substrato, em: colagenases, gelatinases, estromelinas, MMP tipo membrana, matrilisinas e outras MMPs (Orsini et al.⁷⁰, 2012). Na dentina humana foram identificadas, até o momento, a colagenases MMPs-8 (Sulkala et al.¹⁰⁰, 2007), as gelatinases MMP-2 e MMP-9 (Mazzoni et al.⁶², 2009) e a enamelesina MMP-20 (Sulkala et al.⁹⁹, 2002) (Figura 2).

O segundo grupo de proteases presente na dentina é o das Cisteínas Catepsinas (Kafienah et al.⁴⁴, 1998). Embora sejam, em sua maioria, enzimas lisossomais, as Catepsinas B e K (Figura 3) apresentam ação extracelular, são capazes de degradar outras proteínas, como o colágeno, e estão presentes na

matriz dentinária (Mazzoni et al.⁶¹, 2006; Tersariol et al.¹⁰⁴, 2010; Scaffa et al.⁸⁵, 2017). Assim como as MMPs, as catepsinas também atuam em processos fisiológicos e patológicos e têm sido ligadas especialmente às doenças que envolvem a remodelação tecidual (Orsini et al.⁷¹, 2007). As catepsinas podem ser observadas ao longo das fibrilas, embora ainda não esteja claro se elas se ligam ao próprio colágeno ou a proteoglicanas, uma vez que já foi demonstrado que as catepsinas formam complexos com as proteínas (Li et al.⁵², 2004; Fonovic, Turk²⁸, 2014).

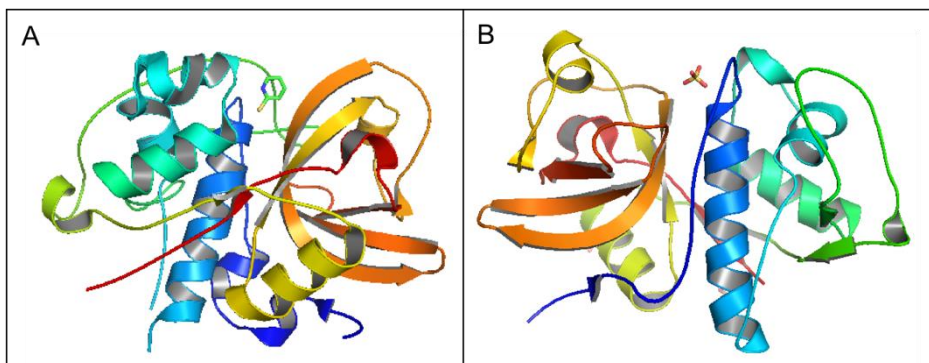
Figura 2- Imagens ilustrativas de MMPs humanas. (A) MMP-2 (gelatinase), composta por 660 aminoácidos e massa molecular de 73.880 Da. (B) MMP-8 (colagenase), com 467 aminoácidos e massa molecular de 53.412 Da. (C) MMP-9 (gelatinase), apresenta 707 aminoácidos e massa molecular de 78.458 Da. (D) MMP-20 (enamelesina) com 483 aminoácidos e massa molecular de 54.387 Da.



Fonte: A estrutura básica de cada enzima foi obtida em www.uniprot.org e as imagens foram produzidas utilizando o Sistema PyMOL Molecular Graphics, versão 1.7.4.5, Schrödinger LLC.

Um trabalho recentemente publicado por Scaffa et al.⁸⁵ (2017) demonstrou, pela primeira vez, a co-ocorrência e distribuição *in situ* de MMPs e catepsinas na dentina. Os autores também observaram uma maior atividade de MMPs em comparação às catepsinas o que sugere que elas possam desempenhar um papel mais relevante na degradação da união resina-dentina.

Figura 3- Imagens ilustrativas de cisteínas catepsinas humanas. (A) Catepsina B contém 339 aminoácidos e massa molecular de 37.822 Da. (B) Catepsina K apresenta 329 aminoácidos em sua composição e massa molecular de 36.966 Da.



Fonte: As estruturas básicas das enzimas foram obtidas em www.uniprot.org e as imagens foram produzidas utilizando o Sistema PyMOL Molecular Graphics, versão 1.7.4.5, Schrödinger LLC.

O processo de desmineralização superficial da dentina durante o estabelecimento da interface adesiva remove o conteúdo mineral e expõe a rede de fibrilas de colágeno e as proteínas não colagenosas da matriz dentinária. Uma vez liberadas e ativadas, estas enzimas passam a degradar o colágeno que não foi totalmente encapsulado pelo sistema adesivo e que permaneceu exposto na

camada híbrida (Pashley et al.⁷³, 2004; Mazzoni et al.⁶¹, 2006; Carrilho et al.¹², 2009; Tersariol et al.¹⁰⁴, 2010).

Assim sendo, a atividade proteolítica da dentina está diretamente relacionada à qualidade e estabilidade da interface adesiva em longo prazo, podendo levar a falha da união entre dentina e material restaurador devido à degradação do colágeno (Brackett et al.⁶, 2007; Carrilho et al.¹¹, 2007; Brackett et al.⁵, 2009; Ricci et al.⁷⁹, 2010).

2.4 Características da dentina bovina

Devido às crescentes barreiras encontradas para a obtenção de dentes humanos para pesquisas in vitro, muitos estudos têm utilizado como alternativa para adesão a dentina bovina (Francisconi et al.³¹, 2008; Li et al.⁵¹, 2014; Prylinska-Czyzewska et al.⁷⁷, 2015; Li et al.⁵⁰, 2015; Chiba et al.¹⁹, 2016). Entretanto, há ressalvas quanto a extrapolação dos resultados obtidos com substrato bovino para a dentina humana.

Quanto à morfologia, dentina humana e bovina apresentam similaridades quanto ao número e ao diâmetro dos túbulos dentinários quando a dentina coronária de incisivos centrais permanentes bovinos é comparada a molares decíduos e permanentes humanos (Schilke et al.⁸⁷, 2000). Além disso, também foram observadas similaridades quanto ao coeficiente de expansão térmica (Lopes et al.⁵⁷, 2012), radiodensidade (Fonseca et al.²⁹, 2008), propriedades mecânicas (Novais et al.⁶⁸, 2016) e permeabilidade dentinária (Schmalz et al.⁸⁸, 2001).

Em 2015, Soares e Santo⁹⁵ analisaram a composição inorgânica da dentina bovina em comparação a dentina humana. Segundo os autores não houve diferença entre o peso de cálcio ou fósforo entre os substratos, de modo que, a

razão entre os dois elementos foi de 1,82 ($\pm 0,06$) para dentes humanos e 1,79 ($\pm 0,03$) para bovinos. Conclusões semelhantes foram obtidas por Teruel et al.¹⁰⁵ (2015) quando analisaram o conteúdo de carbono e nitrogênio nestes substratos.

Até o momento pouco se sabe sobre a matriz orgânica da dentina bovina, incluindo sua atividade proteolítica. Em 2011, Kato et al.⁴⁶ descreveram a presença de MMP-2 e MMP-9 na dentina bovina. Estas metaloproteinases também são facilmente detectadas na dentina humana e tem papel fundamental no processo de degradação da interface adesiva, como descrito anteriormente. O trabalho citado descreveu que a atividade MMP-9 é similar para o substrato bovino e o substrato humano, enquanto a atividade de MMP-2 foi 30% maior para a dentina humana. Em relação ao colágeno bovino, pode-se verificar diferenças quanto ao número total de aminoácidos nas cadeias e seu peso molecular. O colágeno humano tipo I apresenta 1.464 aminoácidos e peso molecular de 138.941 Da em sua cadeia $\alpha 1$, ao passo que a mesma cadeia bovina contem 1.463 aminoácidos e peso molecular de 138.938 Da. Quando as cadeias $\alpha 2$ são comparadas o colágeno humano é composto por 1.366 aminoácidos com molecular de 129.314 Da contra 1.364 aminoácidos e peso molecular de 129.064 Da para o bovino.

2.5 Dentina bovina vs. humana na odontologia adesiva

A literatura tem, de modo geral, considerado a dentina bovina a mais próxima da dentina humana para estudos *in vitro* conforme relatado no tópico anterior, inclusive para testar materiais e técnicas ligados à odontologia adesiva (Ikemura et al.⁴³, 2003; Fonseca et al.³⁰, 2004; Helvatjoglu-Antoniades et al.⁴¹, 2004; Sato, Miyasaki⁸³, 2005; Almeida et al.¹, 2009; Soares et al.⁹⁴, 2013; Soares, Santo⁹⁵, 2015).

Os dentes bovinos são de fácil acesso, visto que, os rebanhos são abatidos em larga escala para a comercialização da carne. Além disso, a maior possibilidade de padronização da amostra também se torna um ponto positivo (Camargo et al.¹⁰, 2008). Em contrapartida, os dentes humanos são mais difíceis de conseguir em quantidade necessária e qualidade apropriada, devido à, por exemplo, extensas lesões de cárie (Rueggeberg⁸⁰, 1991; Mellberg⁶³, 1992; Skene⁹², 2002; Yassen et al.¹¹⁸, 2011).

Ao testar a resistência de união imediata apresentada por um sistema adesivo à dentina humana, bovina e suína, por microtração, Reis et al.⁷⁸ (2004) concluíram que o desempenho e morfologia da dentina bovina é similar a humana, sendo ela uma alternativa viável para substituir dentes humanos. No entanto, quando os testes de cisalhamento foram empregados mediante termociclagem, Ruttermann et al.⁸¹ (2013) observaram diferença significativa entre dentina humana e bovina ao utilizar dois sistemas adesivos (Clearfil SE Bond e Optibond FL).

Lopes et al.⁵⁶ (2009) compararam a ocorrência de microinfiltração em dentes humanos e bovinos em cavidades preparadas na face vestibular dos dentes com 3 mm de largura e 2 mm de profundidade. Dois sistemas adesivos, Clearfil SE Bond e Scotchbond, foram aplicados e os espécimes submetidos a termociclagem. A extensão da microinfiltração evidenciada por rodamina foi avaliada. Os autores concluíram que é preciso cautela ao utilizar dentes bovinos para este tipo de teste uma vez que, estes dentes apresentaram uma microinfiltração significativamente maior para o Scotchbond MP do que para o Clearfil SE Bond, enquanto nenhuma diferença entre os adesivos foi observada para os dentes humanos.

Diante dos resultados controversos, uma revisão sistemática e metanálise foi conduzida por Soares et al.⁹³ (2016). Após analisar 1.285 trabalhos e selecionar

apenas 10 de acordo com os critérios definidos, os autores concluíram que os dentes bovinos podem ser utilizados como substitutos confiáveis aos dentes humanos em testes de resistência de união de sistemas adesivos à dentina. Todos os dez trabalhos incluídos nessa revisão sistemática e metanálise, entretanto, avaliaram apenas a resistência de união imediata, na qual não é possível inferir sobre a contribuição das proteases dentinárias na estabilidade da interface resina-dentina.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Proposição geral

Baseados na literatura e nas lacunas que ainda precisam ser preenchidas, a proposição geral deste projeto foi investigar a atividade proteolítica e a degradação da matriz de colágeno da dentina de dentes bovinos comparados a da dentina de dentes humanos.

3.2 Proposições específicas

- Investigar a atividade total de metaloproteinases da matriz (MMPs) e a liberação de hidroxiprolina da matriz dentinária obtida de dentes bovinos e humanos, em função do tempo (velocidade);

- Comparar a intensidade da atividade proteolítica da matriz dentinária de dentes bovinos e humanos;

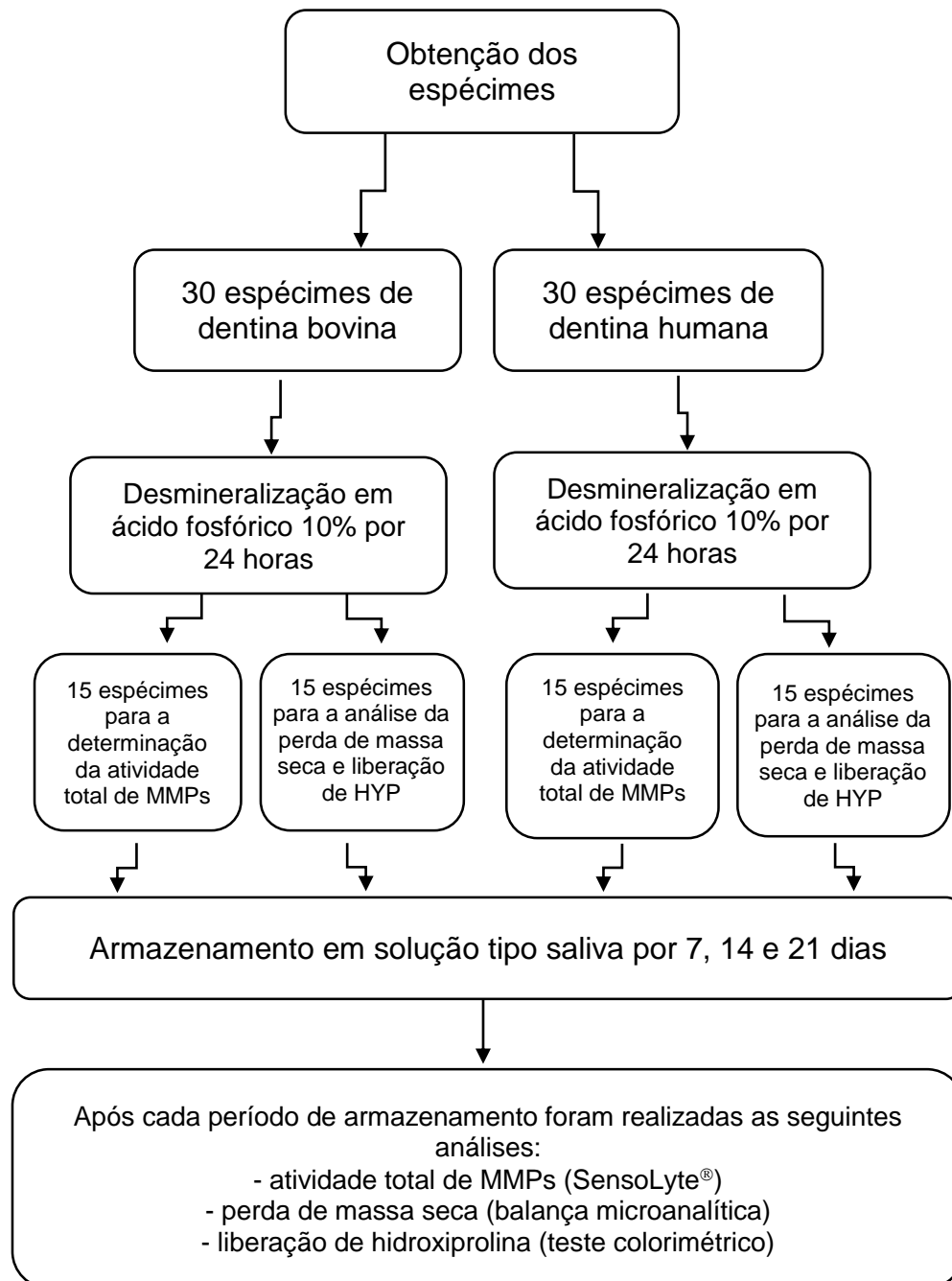
- Determinar a perda de massa seca (degradação) da matriz dentinária de dentes bovinos e humanos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Organograma do estudo

O organograma do presente estudo está apresentado na Figura 4.

Figura 4- Organograma dos diferentes protocolos desenvolvidos no presente estudo, a partir da obtenção dos espécimes de dentina dos dentes bovinos e humanos.



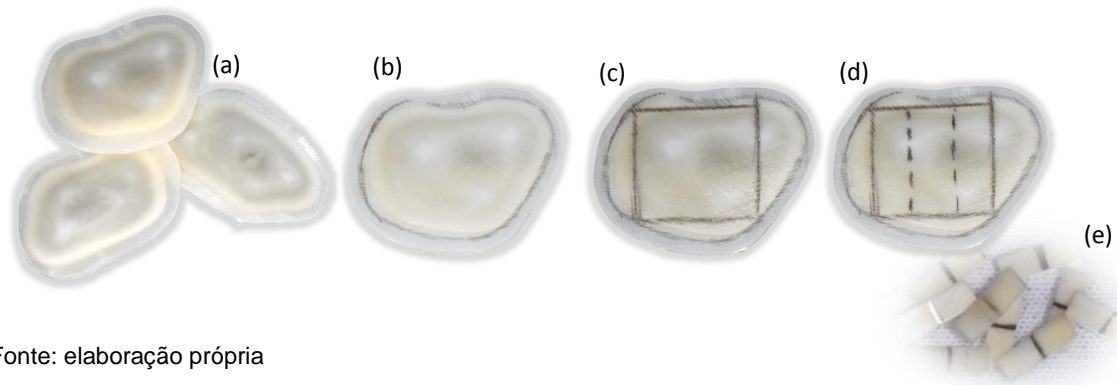
4.2 Obtenção dos espécimes de dentina

Dez incisivos bovinos e trinta molares humanos hígidos foram selecionados para o desenvolvimento desse estudo. Os dentes humanos foram obtidos junto ao Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da mesma instituição (Anexo A, CAAE 55962515.6.0000.5416). Os dentes bovinos foram obtidos junto ao frigorífico Vangelio Mondelli, na cidade de Bauru, provenientes de animais jovens, com idade aproximada de 3 anos. Após limpeza com água deionizada e profilaxia com pedra pomes e água, os dentes foram imersos em solução tampão fosfato contendo 0,1% timol e refrigerados à 4°C.

Para os dentes humanos, 30 discos de dentina de 0,5 mm de espessura foram obtidos do terço médio das coroas (um disco por dente) por meio de cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA) equipada com disco de diamante de 0,3 mm de espessura (Diamond Wafering Blade, Buehler Ltd.), sob irrigação constante. Em seguida, as amostras de dentina foram seccionadas em espécimes em forma de palitos (prismas retos) com dimensões de 0,5x1,0x4,0 mm (Figura 5). Após inspeção visual quanto a presença de esmalte, dimensões desejadas e paralelismos das faces, 30 dos 60 espécimes obtidos foram selecionados.

Para os dentes bovinos, a superfície vestibular foi desgastada em politriz metalográfica (Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA), em lixa de carbetto de silício de granulação 320 e umedecida, até a obtenção de uma área plana em dentina (Figura 6). Em seguida, os dentes foram montados em bases de madeira de tal forma que a superfície vestibular desgastada ficasse paralela e em contato com a lateral do disco diamantado da cortadeira metalográfica. Foi realizado um corte a 0,5 mm de

Figura 5- Obtenção de espécimes de dentina a partir de molares humanos. (a) Discos de dentina com espessura de 0,5 mm; (b) demarcação do limite amelo-dentinário e (c) da área de dentina disponível para a obtenção dos espécimes. (d) Delimitação dos espécimes com grafite para servir como guia durante o corte e (e) espécimes com dimensões de 0,5 mm de espessura x 1,0 mm de largura x 4,0 mm de comprimento, com a superfície oclusal demarcada com grafite.



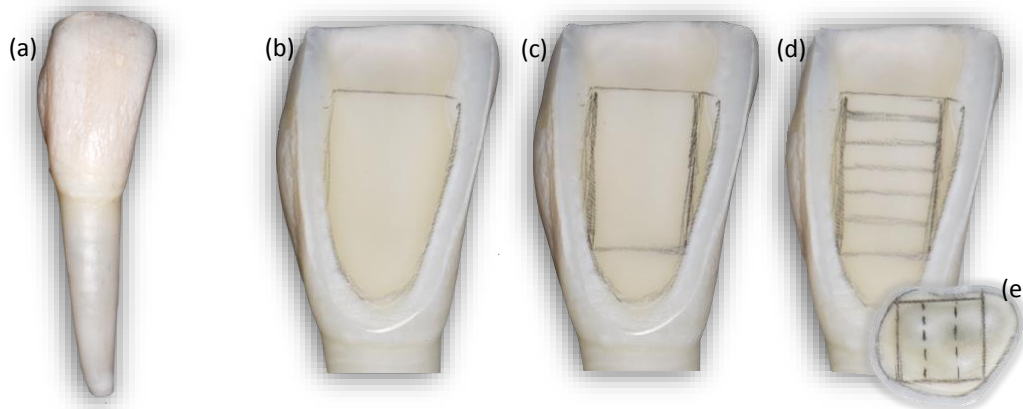
Fonte: elaboração própria

distância da superfície, possibilitando a obtenção de discos com essa espessura, assim como efetuado na superfície oclusal dos molares humanos. Com auxílio de grafite, foi realizada a delimitação da junção amelo-dentinária, da área de dentina disponível para a obtenção dos espécimes e de linhas guias para o corte dos espécimes (Figuras 6b, 6c e 6d, respectivamente). Assim como para os dentes humanos, espécimes com dimensões de 0,5x1,0x4,0 mm foram obtidos e visualmente inspecionados.

As dimensões de todos os espécimes foram mensuradas com paquímetro digital com resolução de 0,01 mm (Mod. 500-144b, Mytutoyo Sul Americana Ltda., SP, Brasil) e os espécimes foram pesados em balança microanalítica de precisão de 0,000001g (Microbalança XP6, Mettler- Toledo International Inc., Columbus, OH, EUA). Após a padronização dos espécimes, estes foram lavados com água deionizada e armazenados em placa de 96 compartimentos, em solução timol 0,1%

e refrigeração à 4 °C, até a sua utilização.

Figura 6- Obtenção de espécimes de dentina a partir de incisivos bovinos. (a) Incisivo bovino; (b) demarcação do limite amelodentinário após obtenção da área plana em dentina; (c) determinação da área de dentina disponível (retângulo) para a obtenção dos espécimes e (d) marcação com grafite para servir como guia durante o corte para a obtenção dos espécimes. (e) Disco de dente humano demarcado para comparação quanto à superfície de dentina exposta nos dois tipos de dentes e número de espécimes obtidos.



Fonte: elaboração própria

4.3 Obtenção das matrizes de colágeno

Os espécimes foram desmineralizados (Figura 7) em ácido fosfórico a 10% por 24 horas sob agitação constante em temperatura de 4°C. Para tanto, os espécimes foram individualmente inseridos em tubos Eppendorf contendo 2 mL de solução de ácido fosfórico à 10%. Os tubos foram posicionados em homogeneizador rotatório de soluções (Phoenix-Luferco, Araraquara, São Paulo, Brasil) e permaneceram sobre agitação por 24 horas em refrigerador à 4°C. Decorrido esse período, o ácido fosfórico foi substituído por 2 mL de água deionizada e os tubos voltaram a ser agitados por 30 min em temperatura de 4°C. Essa lavagem foi repetida 4 vezes, com troca da água deionizada a cada 30 min, totalizando 2 horas de lavagem.

Após a desmineralização, os espécimes (n=30 para cada tipo de dente), foram divididos em dois grupos: 15 para a avaliação da atividade total de MMPs e 15 para

a determinação da massa seca e de liberação de hidroxiprolina.

Figura 7- Espécime de dentina humana após desmineralização em ácido fosfórico 10% por 24 horas. A matriz de dentina remanescente apresenta consistência “borrachoide”, permitindo curvar o espécime para demonstrar seu baixo módulo de elasticidade.



Fonte: elaboração própria

4.4 Determinação da atividade total de MMP

Os espécimes foram individualmente inseridos em compartimentos de uma placa de cultura de 96 poços, contendo 100 μ L de solução tampão (componente C) do kit SensoLyte[®] (AnaSpec Inc., Fremont, CA, EUA; Anexo B). Em seguida, em cada compartimento foram adicionados 200 μ L do substrato (100 μ L do componente A + 4,9 mL do componente C) para determinação da atividade total de MMPs. Três compartimentos adicionais foram preenchidos com essas soluções para servirem como *blank*. Após 60 minutos em temperatura ambiente, os espécimes foram removidos, lavados abundantemente em água deionizada e inseridos em tubos de Eppendorf contendo 300 μ L de solução do tipo saliva (Tabela 1). A placa de 96 poços foi levada para leitura da absorbância em espectrofotômetro (Synergy H1 Hybrid Reader, BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA) no comprimento de onda de 412

nm. Desta forma, a atividade total de MMP foi determinada por meio dos valores de absorvância obtidos para cada poço subtraído do valor do *blank*.

Tabela 1- Componentes para o preparo de 500 mL da solução tipo saliva (10x concentrada – solução estoque).

Composto	Concentração	Peso
HEPES	50 mM	5,96 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	25 mM	1,84 g
ZnCl ₂	0,2 mM	13,63 mg
pH 7.4		

Abreviaturas. HEPES = ácido hidroxil-etil-piperazina-etano-sulfônico; CaCl₂ .2H₂O = cloreto de cálcio diidratado; ZnCl₂ = cloreto de zinco

Fonte: elaboração própria

4.5 Equivalência à atividade de MMP-9

A análise referente a transformação dos dados de atividade total de MMPs em atividade de MMP-9 foi realizada com o simples propósito de quantificar os valores de absorvância em µg/mg de dentina. Trata-se de uma análise coadjuvante, uma vez que na dentina não é encontrada apenas a MMP-9, mas um grupo de metaloproteinases que inclui a MMP-8, MMP-2, MMP-20, entre outras.

Para a equivalência da atividade total de MMPs em atividade de MMP-9, uma curva padrão da absorvância do substrato em relação à atividade de rhMMP-9 (MMP-9 humana recombinante) foi construída. Todos os componentes utilizados para este teste fazem parte do kit SensoLyte[®] (Anexo B), utilizado para a determinação da atividade total de MMPs, exceto a rhMMP-9 (Anaspec Cat #72009), a qual foi adquirida separadamente. Inicialmente, para a ativação da enzima, uma quantidade

suficiente de rhMMP-9 foi incubada juntamente com uma solução de tripsina (Componente E) com concentração final de 10 µg/mL à 37°C por 2h. Após o período de incubação, a tripsina foi inativada pela adição do inibidor de tripsina (Componente F) em concentração final de 100 µg/mL. A enzima ativada foi então mantida em gelo e utilizada o mais rápido possível. Concentrações conhecidas da rhMMP-9 ativa foram colocadas em compartimentos da placa de 96 compartimentos (0, 5, 10 e 15 µg/compartimento), em duplicata. Em seguida, 200 µL do substrato do kit SensoLyte (Componente C + Componente A) foram adicionados aos compartimentos, e após 1 hora, a placa de 96 poços foi levada para leitura da absorbância em espectrofotômetro (Synergy H1 Hybrid Reader, BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA) no comprimento de onda de 412 nm.

4.6 Determinação da massa seca e das frações constituintes da dentina

Antes da mensuração da massa seca, foi inicialmente determinada a massa úmida de cada espécime desmineralizado. Esse dado, juntamente com a massa do espécime mineralizado e do espécime desmineralizado e desidratado foram utilizados para o cálculo das frações orgânica, inorgânica e de água para cada substrato, dentina bovina e dentina humana. A fração inorgânica foi calculada subtraindo-se a massa do espécime mineralizado e desmineralizado úmido; a fração de água foi calculada subtraindo-se a massa do espécime desmineralizado úmido do espécime desmineralizado desidratado e, por fim, a fração orgânica correspondeu a massa do espécime desmineralizado desidratado.

Para a determinação da massa úmida, cada espécime foi removido da água deionizada, seco com papel absorvente e imediatamente pesado em balança microanalítica de precisão de 0,0000001g (Microbalança XP6).

Os espécimes foram então desidratados em dessecador contendo sulfato de cálcio anidro (Drierite, WA Hammond Drierite Company, Ltd., Xenia, OH, EUA) por 72 horas em recipiente fechado. Em seguida, foram novamente pesados em balança microanalítica de precisão para determinação da massa seca inicial. Os mesmos procedimentos de desidratação e pesagem, seguido de rehidratação foram repetidos após cada um dos períodos de armazenamento, ou seja 7, 14 e 21 dias.

4.7 Armazenamento em solução tipo saliva

Uma vez determinada a massa seca inicial e a atividade total inicial de MMPs, os espécimes de ambos os substratos (dentes humanos e bovinos) foram armazenados individualmente em 300 µL de solução tipo saliva (Tabela 1), sob agitação constante à 37°C em banho maria termostático digital (mod. CE-400/RE, CienlaB, Campinas, São Paulo, Brasil), pelos períodos de 7, 14 e 21 dias. Finalizado cada período, os espécimes designados para a análise da massa seca eram desidratados como descrito anteriormente. Também como descrito previamente, uma nova análise da atividade total de MMPs foi realizada para os espécimes designados para essa finalidade. A saliva na qual os espécimes permaneceram armazenados foi coletada (300 µL) e congelada em frizer -80°C para futura análise da liberação de hidroxiprolina (HYP). Após os testes, os espécimes eram novamente armazenados em 300 µL da solução do tipo saliva até a conclusão do próximo período. Todos os testes foram repetidos até o período de 21 dias (Figura 8).

Figura 8- Espécimes de dentina de dentes humanos (n=15) e bovinos (n=15) completamente desmineralizados foram armazenados em solução tipo saliva até 21 dias, à 37° C sob agitação constante. Inicialmente e para todos os períodos de armazenamento, foi avaliada a atividade total de MMPs e a massa seca. Com exceção do período inicial, para os demais períodos (7, 14 e 21 dias) também foi avaliada a liberação de hidroxiprolina (HYP).



Fonte: elaboração própria

4.8 Liberação de hidroxiprolina (HYP)

A hidroxiprolina é um aminoácido resultante da hidroxilação da prolina, o qual é encontrado em poucas proteínas e em elevada quantidade no colágeno (13-14%). Esse aminoácido apresenta a capacidade de estabelecer ligações de hidrogênio entre as moléculas de colágeno, favorecendo sua estabilidade (Gómez-Guillén et al.³⁴, 2002). Dessa maneira, a quantidade de HYP liberada no meio pode ser utilizada como um indicador da degradação dessa proteína.

Após descongelamento em temperatura ambiente, 250 µL de saliva de cada tubo para compartimentos de uma placa de 96 compartimentos, a qual foi armazenada em dessecador com sulfato de cálcio anidro por 48 horas. Decorrido esse período, 70 µL de água ultrapura foram adicionados em cada compartimento

para a ressuspensão do conteúdo remanescente. Os 70 μL foram transferidos para um tubo *Eppendorf* de 2 mL ao qual foram adicionados 70 μL de ácido clorídrico 37%. Os tubos foram mantidos em banho seco por 3 h à 120°C seguido da adição de 2,5 mg de carvão ativado e da centrifugação à 13.000 g por 2 minutos. Duas alíquotas de 40 μL do sobrenadante foram transferidas para placas de cultura de 96 compartimentos. Foram adicionados em cada poço 100 μL da solução de cloramina T + tampão de oxidação, seguido da incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram acrescentados 100 μL da solução de p-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) + isopropanol e a placa foi novamente incubada por 90 minutos, à 60°C. As placas foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 560 nm e os valores de absorvância correlacionados aos valores obtidos a partir de uma curva padrão construída em duplicata com valores conhecidos de HYP. Os resultados foram apresentados como μg HYP/mg dentina.

4.9 Análise estatística

Foram consideradas variáveis independentes (fatores) desse estudo o tipo de dentina e o período de armazenamento; enquanto que a atividade total de MMPs, a perda de massa seca e a liberação de hidroxiprolina foram as variáveis dependentes (resposta). O número de repetições por grupo foi 15, sendo que os mesmos espécimes foram analisados nos diferentes períodos de armazenamento (dados pareados). O conjunto de dados de cada variável resposta foi inicialmente avaliado quanto a sua distribuição. Uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal, foram aplicados os testes de Friedman, Wilcoxon para dados repetidos e Mann-Whitney. O nível de significância de 5% foi selecionado para as inferências

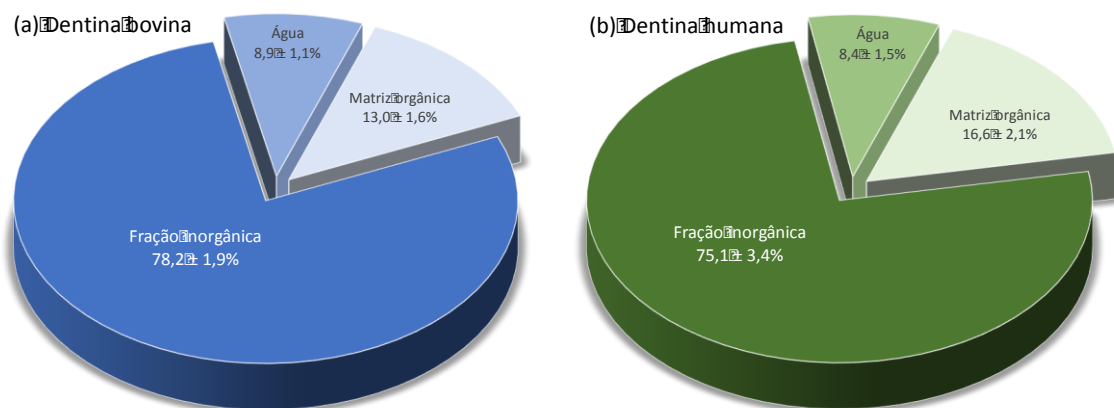
estatísticas, ou seja, grupos foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Composição simplificada da dentina bovina e humana

Na Figura 9 são apresentados os valores, em porcentagem de peso, das frações orgânica, inorgânica e de água da dentina bovina e humana. A composição foi similar para os dois substratos, com predomínio da fração inorgânica, seguida da fração correspondente a matriz orgânica e da quantidade de água.

Figura 9- Composição simplificada da dentina bovina (a) e humana (b), em peso (%).



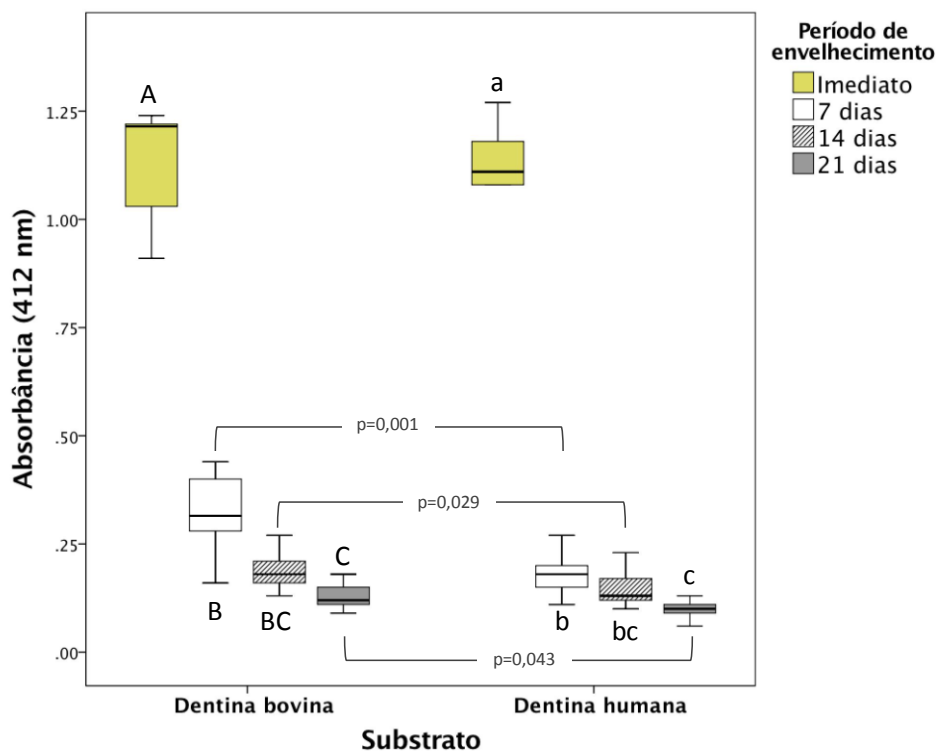
Fonte: Elaboração própria

5.2 Atividade total de MMPs da dentina bovina e humana

A atividade inicial de MMPs foi estatisticamente semelhante para ambos os substratos (Figura 10). Uma queda significativa na atividade dessas proteases foi observada após 7 dias de armazenamento dos espécimes desmineralizados em solução do tipo saliva. A redução da atividade proteolítica da matriz dentinária continuou até o período de 21 dias, entretanto em uma menor intensidade. Esses eventos ocorreram de maneira semelhante para a dentina bovina e humana

(Figura 10). Comparando-se os dois substratos dentro do mesmo período de armazenamento, a intensidade da atividade proteolítica da dentina bovina foi significativamente maior do que a atividade da dentina humana para todos os períodos, exceto no período imediato (Figura 10).

Figura 10- Atividade total de metaloproteinases da matriz (MMPs) detectada na dentina bovina e na dentina humana, desmineralizadas em ácido fosfórico 10% e armazenadas até 21 dias em solução do tipo saliva. Letras permitem comparações dentro de cada substrato, enquanto conectores permitem comparações desses substratos em cada período de envelhecimento. Letras diferentes, assim como a presença de conectores, indicam grupos estatisticamente diferentes entre si (Wilcoxon e Mann-Whitney, respectivamente, $p < 0,05$).



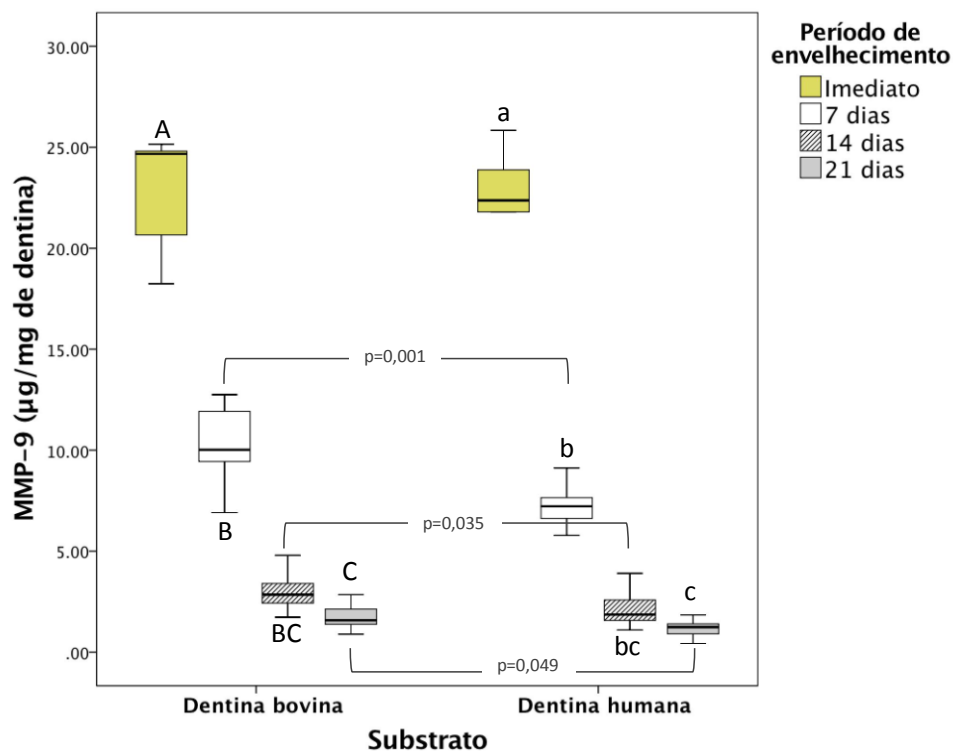
Fonte: Elaboração própria

5.3 Equivalência à MMP-9

A equivalência à MMP-9 (Figura 11) dos valores de atividade total de MMPs registrados em absorbância foi realizada para permitir uma quantificação relativa

dessa atividade. Essa MMP foi selecionada por ser uma das três mais prevalentes na matriz dentinária, juntamente com as MMP-2 e -8. Conseqüentemente, as inferências estatísticas não diferiram das observadas na Figura 10, e as mesmas comparações foram mantidas.

Figura 11- Dados de absorvância da atividade total de MMPs apresentados na Figura 10 transformados em equivalência à MMP-9. Letras permitem comparações dentro de cada substrato, enquanto conectores permitem comparações desses substratos em cada período de envelhecimento. Letras diferentes, assim como a presença de conectores, indicam grupos estatisticamente diferentes entre si (Wilcoxon e Mann-Whitney, respectivamente, $p < 0,05$).



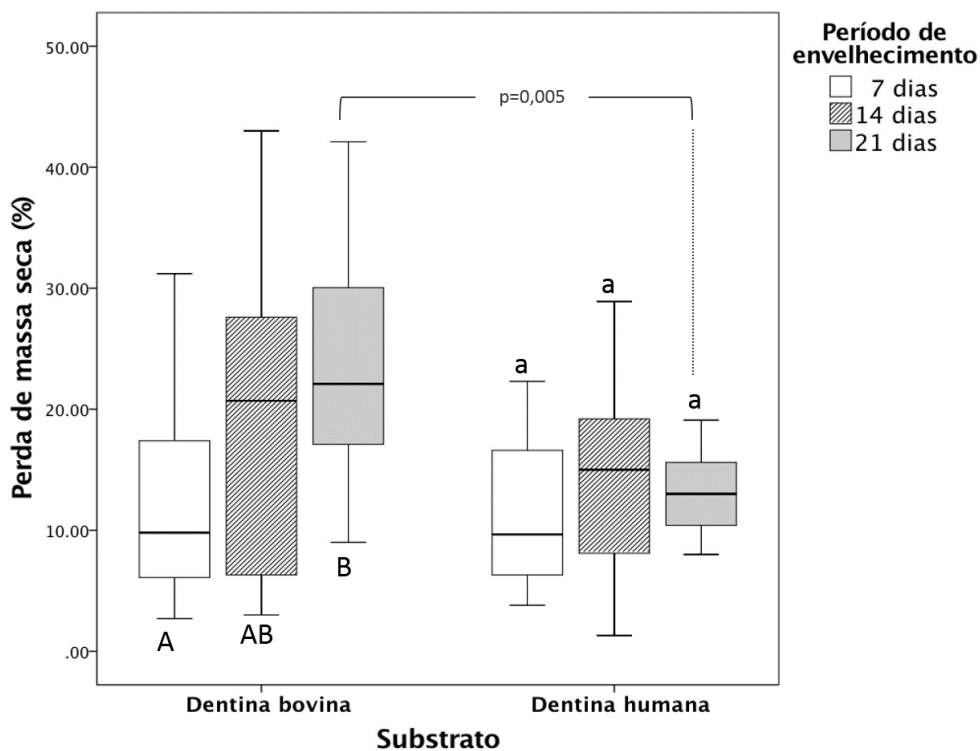
Fonte: Elaboração própria

5.4 Perda de massa seca

Os dados referentes a porcentagem de massa seca dos espécimes armazenados até 21 dias em solução tipo saliva estão apresentados na Figura

12. Apesar da tendência a uma maior perda de massa por parte dos espécimes obtidos da dentina de dentes bovinos, diferença estatisticamente significativa entre os dois substratos foi observada apenas após 21 dias de envelhecimento. Nesse último período, a dentina de dentes bovinos perdeu cerca de 23% de massa, enquanto que a dentina de dentes humanos perdeu em torno de 14%, porém não houve perda de massa para a dentina humana em comparação com o período de 14 dias de envelhecimento da dentina humana.

Figura 12- Perda de massa seca acumulada (%) da matriz da dentina bovina e humana no período de envelhecimento de até 21 dias. A massa seca inicial foi considerada como 100% e utilizada para o cálculo dos demais valores. Letras permitem comparações dentro de cada substrato, enquanto conectores permitem comparações desses substratos em cada período de envelhecimento. Letras diferentes, assim como a presença de conectores, indicam grupos estatisticamente diferentes entre si (Wilcoxon e Mann-Whitney, respectivamente, $p < 0,05$).

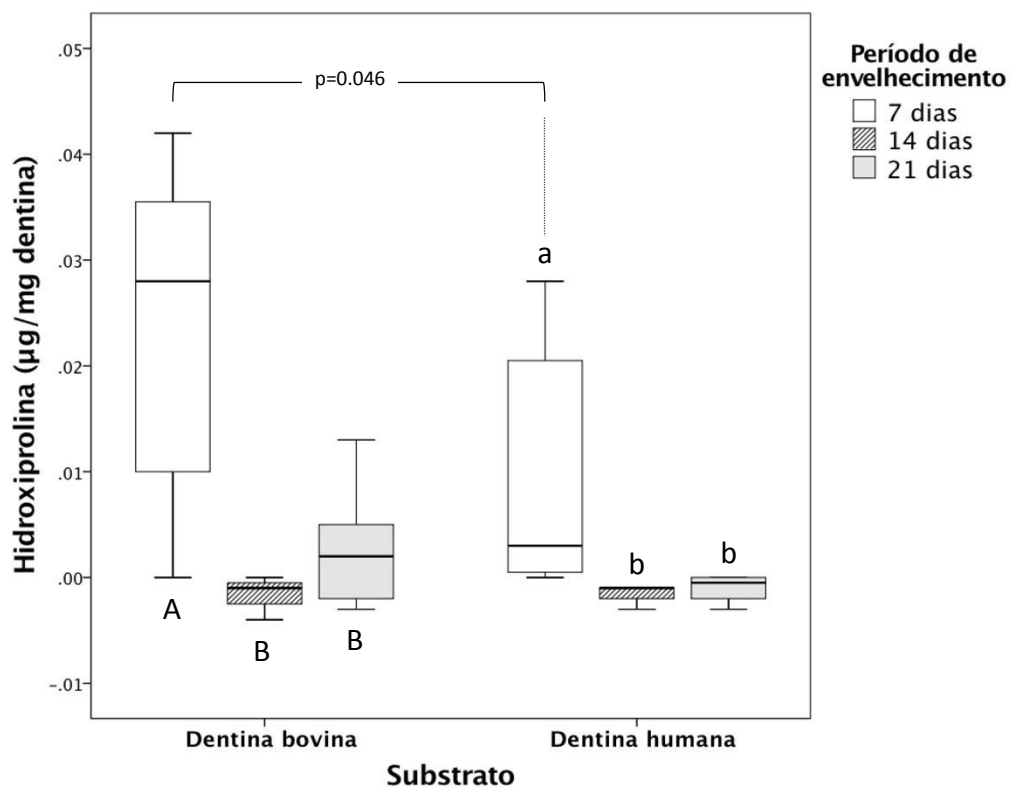


Fonte: Elaboração própria

5.5 Liberação de hidroxiprolina (HYP)

Houve maior liberação de HYP das matrizes da dentina bovina em comparação a dentina humana após 7 dias de armazenamento. No entanto, quantidades similares foram liberadas após 14 e 21 dias, sem diferença estatística entre os dois substratos. Dentro de cada tipo de substrato, o comportamento da liberação de hidroxiprolina foi semelhante, ocorrendo uma acentuada liberação após 7 dias com redução significativa da quantidade liberada após 14 e 21 dias de envelhecimento (Figura 13).

Figura 13- Liberação de hidroxiprolina (HYP) de matrizes de dentina bovina e humana armazenadas em solução tipo saliva por até 21 dias. As letras permitem comparações dentro de cada tipo de matriz de dentina enquanto os conectores indicam comparações entre substratos para cada período de armazenamento. Letras diferentes, assim como, a presença de conectores, indicam que os grupos são estatisticamente diferentes (Wilcoxon e Mann-Whitney, respectivamente, $p < 0,05$).



Fonte: Elaboração própria

6 DISCUSSÃO

A dentina humana contém MMP-2, -3, -8, -9 e -20 (Zhang, Kern¹²¹, 2009; Tersariol et al.¹⁰⁴, 2010; Mazzoni et al.⁶⁰, 2012), entretanto, MMP-2, -8 e -9 são as mais prevalentes e relevantes nos eventos envolvendo a gênese desse tecido. Ambas as MMP-2 e -9 são classificadas como gelatinases, enquanto a MMP-8 é reconhecidamente uma colagenase (Larger et al.⁴⁹, 2016). MMP-8 é considerada a principal colagenase da dentina, e como tal, é capaz de degradar o colágeno na sua forma íntegra ou desnaturada (Sulkala et al.¹⁰⁰, 2007). Existe evidência de que a MMP-2, a despeito de sua classificação como gelatinase, também atua como colagenase (Tjäderhane et al.¹⁰⁸, 2012). Segundo Kato et al.⁴⁶ (2011), a atividade dessa protease na dentina coronária e radicular de dentes humanos chega a ser 30% maior do que nos respectivos tecidos de dentes bovinos, enquanto que a atividade da MMP-9 foi similar. No mesmo estudo, a atividade de MMP-2 e MMP-9 na dentina pulverizada foi avaliada por meio de zimografia, e a ação dessas MMPs sobre a degradação do colágeno não foi investigada.

A atividade proteolítica da dentina, no presente estudo, foi avaliada *in situ*. Foi observado que a atividade inicial total de MMPs foi similar para os dois substratos, dentina coronária bovina e humana, e quando transformada em equivalência de MMP-9, foi de 24 µg/mg e 22 µg/mg de dentina, respectivamente. O kit SensoLyte[®] utilizado tem a capacidade de detectar apenas MMPs, sendo incapaz de identificar a atividade de outras proteases dentinárias como as cisteínas catepsinas. Especificamente, esse ensaio identifica as MMP-1, -2, -3, -7, -8 -9, -10, -12, -13 e -14 (informação do fabricante, Anexo B) e não permite a discriminação entre essas enzimas. Portanto, a transformação dos valores de absorbância obtidos na análise da atividade total de MMPs em equivalência de rhMMP-9 foi meramente

uma forma de transformação dos valores de absorvância em valores objetivos. A decisão de usar a MMP-9 como referência foi puramente de ordem prática. Outras MMPs, como a MMP-2 ou a MMP-8, poderiam ter sido utilizadas, uma vez que são, juntamente com a MMP-9, as mais frequentemente encontradas na dentina humana (Sulkala et al.¹⁰⁰, 2007; Tjäderhane et al.¹⁰⁷, 2015). Uma vez que no estudo de Kato et al.⁴⁶ (2011) a atividade da MMP-2 foi 30% maior para a dentina de dentes humanos, e considerando a similaridade de atividade inicial observada no presente estudo, pode ser implicado que variações também existam entre outras MMPs, exceto para a MMP-9 (Kato et al.⁴⁶, 2011).

Embora a atividade total de MMP tenha sido inicialmente similar para a dentina bovina e humana, essa atividade foi significativamente maior para a dentina bovina em todos os demais períodos de armazenamento, 7, 14 e 21 dias. Outra similaridade observada entre os substratos investigados foi o comportamento da atividade proteolítica em função do tempo. Para ambos os substratos, redução significativa da atividade proteolítica foi observada após 7 dias de armazenamento na solução do tipo saliva, com subsequente manutenção dessa atividade em baixas taxas até o período de 21 dias. Com base nesse comportamento, pode ser sugerido que existe um período agudo de atividade proteolítica, correspondente aos primeiros dias de liberação dessas proteases.

Esse fenômeno também foi relatado por Turco et al.¹¹² (2016) que avaliaram pelo período de trinta dias a concentração de ICTP e CTX (fragmentos do telopeptídeo carboxiterminal crosslinked do colágeno tipo I), resultantes da clivagem do colágeno por MMPs e cisteínas catepsinas, respectivamente. Os autores observaram uma progressiva redução da degradação do colágeno dentinário humano até o 4º dia de armazenamento em saliva artificial à 37°C, com

subsequente estabilização. ICTP e CTX, assim como a hidroxiprolina, são considerados marcadores bioquímicos da degradação do colágeno e da osteoclastogênese (Garnero et al.³³, 2003; Seibel⁸⁹, 2015; Zaitseva et al.¹²⁰, 2015).

A hidroxiprolina (HYP) é resultante da hidroxilação da prolina e poucas proteínas contem esse aminoácido, como a elastina, o primeiro componente do sistema complemento (Clq), a acetilcolinesterase e glicoproteínas pulmonares (Zaitseva et al.¹²⁰, 2015). Enquanto algumas dessas proteínas devem ser levadas em consideração quando se investiga a liberação de HYP como um biomarcador da osteoclastogênese, na dentina, o colágeno tipo I é a principal fonte desse aminoácido. Colágeno do tipo I representa 90% do conteúdo proteico da dentina (Tjäderhane et al.¹⁰⁷, 2015) e 13% do total de aminoácidos que o formam é representado pela HYP (Seibel⁸⁹, 2015). Portanto, como realizado no presente estudo, a quantidade de HYP liberada pode ser usada como indicador da degradação do colágeno dentinário.

A liberação de HYP, assim como para a atividade de MMPs, foi alta nos primeiros 7 dias de armazenamento, seguida de queda brusca e manutenção de baixos níveis nos períodos subsequentes. Apesar da intensa atividade proteolítica da dentina e consequente elevada liberação de HYP nos primeiros 7 dias, a perda de massa seca foi similar para a dentina bovina e humana nesse período, 9,7% e 9,2% respectivamente. Entretanto, ao final do período de armazenamento de 21 dias, a perda acumulada de massa seca foi significativamente maior para a dentina bovina (21,9%) em comparação a dentina humana (13,1%). Para explicar este fenômeno deve-se considerar que outra classe de proteases influencia a taxa de degradação da matriz dentinária e que não foi avaliada no presente estudo, as cisteínas catépsinas (Zhang et al.¹²¹, 2009;

Tersariol et al.¹⁰⁴, 2010; Mazzoni et al.⁶⁰, 2012). Estas enzimas poderiam estar presentes de forma mais significativa na dentina bovina, resultando em maior clivagem do colágeno. Entretanto, essa hipótese não tem respaldo científico e necessita ser futuramente ratificada. Ademais, pode ser sugerido que, apesar da elevada resolução da balança microanalítica utilizada no presente estudo (0,1 µg), o método pode não ter sido capaz de detectar sutis alterações na massa dos espécimes. Vários fatores afetam a determinação da massa de pequenos espécimes desidratados, como os utilizados no presente estudo. Esses fatores são umidade relativa do ar, temperatura, vibrações e velocidade de obtenção do valor da massa e uma forma de minimizar a interferência desses fatores no resultado final seria trabalhar com espécimes maiores. A vantagem desse método é a sua simplicidade de execução e baixo custo, desde que o laboratório já seja equipado com a balança.

Os principais constituintes da dentina são água, minerais (fração inorgânica) e proteínas (fração orgânica). No presente estudo em peso, a dentina humana foram encontrados $8,4 \pm 1,5\%$, $75,1 \pm 3,4\%$ e $16,6 \pm 2,1\%$, respectivamente para água, minerais e proteínas. Valores próximos a esses foram encontrados no trabalho de Tjäderhane et al.¹⁰⁸, 2012, na qual, a dentina humana contém cerca de 10% de água, 70% minerais e 20% proteína. Os valores encontrados para a dentina bovina neste estudo também foram próximos aos reportados para a dentina humana. A porcentagem em peso equivalente à presença de água na dentina bovina foi de $8,9 \pm 1,1\%$, para a fração inorgânica foi de $78,2 \pm 1,9\%$ e para a fração orgânica foi de $13,0 \pm 1,6\%$.

A maioria dos estudos sobre a composição química de dentes bovinos em comparação aos humanos, como revisado por Yassen et al.¹¹⁸ (2011), foram

realizados em esmalte e não em dentina. Na mencionada revisão, os autores concluíram que a composição do esmalte é similar entre essas espécies. Uma forma de avaliar o conteúdo mineral de um substrato é por meio de testes da sua dureza. Poucos estudos compararam a dureza da dentina bovina em relação a humana (Turssi et al.¹¹³, 2010; Castanho et al.¹⁵, 2011). Nesses estudos, foi concluído que a dentina bovina é menos dura do que a dentina humana, 29,9 e 45,3 VHN (Castanho et al.¹⁵, 2011) e 48,0 e 51,0 KHN (Turssi et al.¹¹³, 2010), respectivamente. Em termos de conteúdo mineral, os dados do presente estudo não respaldam os resultados encontrados por Turssi et al.¹¹³ (2010) e Castanho et al.¹⁵ (2011), uma vez que similaridade foi observada para ambos os substratos. Entretanto, a composição mineral não foi investigada em nenhum dos trabalhos. Por outro lado, quando a composição inorgânica e morfológica da dentina de dentes bovinos e humanos foi avaliada por Soares e Santo⁹⁵ (2015), os autores não observaram diferenças significativas.

Quanto à composição orgânica dos tecidos dentais de dentes bovinos, não foram encontrados trabalhos na literatura, mesmo na área médica ou veterinária. Portanto, mais trabalhos são necessários para investigar as semelhanças entre a dentina bovina e a humana. Por exemplo, os autores desconhecem a existência de trabalhos referentes a presença de cisteínas catépsinas em dentina bovina, o que já foi demonstrado para a dentina humana (Tersariol et al.¹⁰⁴, 2010; Scaffa et al.⁸⁵, 2017).

Embora a dentina bovina seja recomendada como um adequado substrato em substituição a dentina humana para testes de resistência de união, nenhum dos trabalhos incluídos na revisão sistemática e meta-análise publicada por Soares et al.⁹³ (2016) avaliaram a longevidade da união resina-dentina e, conseqüentemente,

a influência da degradação dos componentes da camada híbrida na estabilidade dessa interface. É importante considerar o importante papel exercido pelas proteases dentinárias no processo de clivagem do colágeno e consequente degradação da camada híbrida (Pashley et al.⁷², 2011; Mazzoni et al.⁶⁰, 2012; Seseogullari-Dirihan et al.⁹⁰, 2015; Larger et al.⁴⁹, 2016; De Vito Moraes et al.²⁴, 2016). Portanto, estudos longitudinais que objetivem investigar a estabilidade da união resina-dentina utilizando como substrato a dentina bovina, devem levar em consideração que a atividade proteolítica desse substrato pode ser superior em comparação a da dentina humana, e que os fenômenos observados podem ocorrer em menor intensidade quando extrapolados para esse último substrato. Estudos sobre os processos de degradação da camada híbrida produzida em dentina bovina versus a produzida em dentina humana ainda precisam ser conduzidos.

7 CONCLUSÃO

Com base na metodologia aplicada e nos resultados obtidos, foi possível concluir que:

A velocidade da atividade proteolítica e de liberação de hidroxiprolina foi similar para a dentina humana e bovina. Rápida nos primeiros 7 dias com desaceleração subsequente;

A atividade proteolítica da dentina bovina foi mais intensa do que a da dentina humana em todos os períodos de análise, exceto no período imediato;

Maior degradação foi observada para a dentina bovina em comparação a humana. Entretanto, diferença significativa foi detectada apenas após 21 dias de armazenamento em solução do tipo saliva.

REFERÊNCIAS*

1. Almeida KGB, Scheibe KGBA, Oliveira AEF, Alves CMC, Costa JF. Influence of human and bovine substrate on the microleakage of two adhesive systems. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17(2): 92-6.
2. Anchieta RB, Machado LS, Martini AP, Santos PH, Giannini M, Janal M, et al. Effect of long-term storage on nanomechanical and morphological properties of dentin- adhesive interfaces. *Dent Mater.* 2015; 31(2):141-53.
3. 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.
4. Asmussen E, Munksgaard EC. Bonding of restorative resins to dentine promoted by aqueous mixtures of aldehydes and active monomers. *Int Dent J.* 1985; 35(2):160-5.
5. Brackett MG, Tay FR, Brackett MG, Dip A, Dipp FA, Mai S, et al. In vivo chlorhexidine stabilization of an acetone- based dentin adhesives. *Oper Dent.* 2009; 34(4): 381-5.
6. 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.
7. 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.
8. Butler WT. Dentin matrix proteins. *Eur J Oral Sci.* 1998; 106(1): 204-10.
9. 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.

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

10. Camargo MA, Roda MI, Marques MM, De Cara AA. Micro-tensile bond strength to bovine sclerotic dentine: influence of surface treatment. *J Dent.* 2008; 36(11): 922-7.
11. Carrilho M, Geraldeli S, Tay F, De Gois MF, Carvalho RM, Tjäderhane L et al. In vivo preservation of the hybrid layer by Chlorhexidine. *J Dent Res.* 2007; 86(6): 529-33.
12. 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.
13. Carvalho RM, Chersoni S, Frankenberger R, Pashley DH, Prati C, Tay FR. A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. *Biomaterials.* 2005; 26(9): 1035-42.
14. 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.
15. Castanho GM, Marques MM, Marques JB, Camargo MA, Cara AA. Micromorphological and hardness analyses of human and bovine sclerotic dentin: a comparative study. *Braz Oral Res.* 2011; 25(3): 274-9.
16. 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.
17. Chaussain- Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res.* 2006; 85(1): 22-32.
18. Chee B, Rickman L, Satterwaite JD. Adhesives for the restoration of non-carious cervical lesions: a systematic review. *J Dent.* 2012; 40(6): 443-52.
19. Chiba A, Zhou J, Nakajima M, Tan J, Tagami J, Scheffel DLS, et al. The effects of ethanol on the size exclusion characteristics of type I dentin collagen to adhesive resin monomers. *Acta Biomater.* 2016; 33:235- 41.

20. Davidson CL, de Gee AJ, Feilzer A. The competition between the composite-dentin bond strength and the polymerization contraction stress. *J Dent Res.* 1984; 63(12): 1396-9.
21. 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.
22. Demarco FF, Corrêa MB, Cenci MS, Moraes RR, Opdam NJ. Longevity of posterior composite restorations: not only a matter of materials. *Dent Mater.* 2012; 28(1): 87-101.
23. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four Year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res.* 2003; 82(2): 136-40.
24. De Vito Moraes AG, Francci C, Vidal CMP, Scaffa PMC, Nesadal D, Yamasaki LC, et al. Phosphoric acid concentration affects dentinal MMPs activity. *J Dent.* 2016; 53:30-7.
25. Embery G, Hall R, Waddington R, Septier D, Goldberg M. Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001; 12(4): 331-49.
26. Fanchon S, Bourd K, Septier D, Everts V, Beertsen W, Menashi S, et al. Involvement of matrix metalloproteinases in the onset of dentin mineralization. *Eur J Oral Sci.* 2007; 112(2): 171-6.
27. Ferrari M, Tay FR. Technique sensitivity in bonding to vital, acid- etched dentin. *Oper Dent.* 2003; 28(1):3-8.
28. Fonovic M, Turk B. Cysteine cathepsins and their potential in clinical therapy and biomarker discovery. *Proteomics Clin Appl.* 2014; 8(5-6): 416-26.
29. Fonseca RB, Haiter- Neto F, Carlo HL, Soares CJ, Sinhoreti MAC, Puppini-Rontani RM, et al. Radiodensity and hardness of enamel and dentin of human and bovine teeth, varying bovine teeth age. *Arch Oral Biol.* 2008; 53(11): 1023-29.

30. Fonseca RB, Haiter-Neto F, Fernandes-Neto AJ, Barbosa GAS, Soares CJ. Radiodensity of enamel and dentin of human, bovine and swine teeth. *Arch Oral Biol.* 2004; 49(11): 919-22.
31. Franciscone LF, Honório HM, Rios D, Magalhães AC, Machado MA, Buzalaf MA. Effect of erosive pH cycling on different restorative materials enamel restored with these materials. *Oper Dent.* 2008; 33(2): 203-8.
32. 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): 41-53.
33. Garnero P, Ferreras M, Karsdal MA, Nikamhlaobh R, Risteli J, Borel O, et al. The type I collagen fragments ICTP and CTX reveal distinct enzymatic pathways of bone collagen degradation. *J Bone Miner Res.* 2003; 18(5): 859-67.
34. Gómez-Guillén MC, Turnay J, Fernández Diaz MD, Ulmo N, Lizarbe MA, Montero P. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloid.* 2002; 16(1): 25-34.
35. Gordan VV, Riley JL, Geraldini S, Rindal DB, Qvist V, Fellows JL, et al. Repair or replacement of defective restorations by dentists in The Dental Practice-Based Research Network. *J Am Dent Assoc.* 2012; 143(6): 593-601.
36. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand.* 2007; 65(1):1-13.
37. Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. *Caries Res.* 2003; 37(5): 339-44.

38. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin- dentin bonds in human over 1 to 3 years. *J Dent Res.* 2000; 79(6): 1385-91.
39. Hass V, Dobrovolski M, Zander-Grande C, Martins GC, Gordillo LA, Rodrigues Accorinte M de 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.
40. 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.
41. Helvatjouglu-Antoniades M, Koliniotou-Kubia E, Dionyssopoulos P. The effect of thermal cycling on the bovine dentine shear bond strength of current adhesive systems. *J Oral Rehab.* 2004; 31(9): 911-7.
42. Hu L, Xiao YH, Fang M, Gao Y, Huang L, Jia AQ, et al. Effects of type I collagen degradation on the durability of three adhesive systems in the early phase of dentin bonding. *PloS One.* 2015; 10(2): 1-12.
43. Ikemura K, Tay FR, Hironaka T, Endo T, Pashley DH. Bonding mechanism and ultrastructural interfacial analysis of a single-step adhesive to dentin. *Dent Mater.* 2003; 19(8): 707-15.
44. Kafienah W, Bromme D, Buttle DJ, Croucher LJ, Hollander AP. Human cathepsins K cleaves native type I and II collagens at the N- terminal end of the triple helix. *Biochem J.* 1998; 1; 331(Pt3): 727-32.
45. Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral.* 3 ed. São Paulo: Guanabara; 2012.
46. Kato MT, Hannas AR, Leite AL, Bolanho A, Zarella BL, Santos J, et al. Activity of matrix metalloproteinases in bovine versus human dentine. *Caries Res.* 2011; 45(5): 429-34.

47. Kohei O. New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases. *J Biochem.* 2012; 151(1):13–25.
48. Kukacka J, Prusa R, Kotaska K, Pelouch V. Matrix metalloproteinases and their function in myocardium. *Biomed Papers.* 2005; 149(2): 225-36.
49. Langer AH, Hamberg K, Pääkkönen V, Tjäderhane L, Ericson D. Collagen degradation and preservation of MMP 8 activity in human dentine matrix after demineralization. *Arch Oral Biol.* 2016; 68: 66-72.
50. Li Y, Carrera C, Chen R, Li J, Chen Y, Lenton P, et al. Fatigue failure of dentin–composite disks subjected to cyclic diametral compression. *Dent Mater.* 2015; 31(7): 778-88.
51. Li Y, Carrera C, Chen R, Li J, Lenton P, Rudney JD, et al. Degradation in the dentin- composite interface subjected to multi-species biofilm challenges. *Acta Biomater.* 2014; 10(1): 375-83.
52. Li Z, Yasuda Y, Li W, Bogoy M, Katz N, Gordon RE, et al. Regulation of collagenase activities of human cathepsins by glycosaminoglycans. *J Biol Chem.* 2004; 279(7): 5470-9.
53. Linde A. Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification. *Anat Rec.* 1989; 224(2): 154-66.
54. Lippert F, Lynch RJM. Comparison of Knoop and Vickers surface microhardness and transverse microradiography for the study of early caries lesion formation in human and bovine enamel. *Arch Oral Biol.* 2014; 59(7): 704-10.
55. Liu KZ, Hynes A, Man A, Alsagheer A, Singer DL, Scott DA. Increased local matrix metalloproteinase-8 expression in the perio- dental connective tissues of smokers with periodontal disease. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1762(2): 775-80.

56. Lopes MB, Consani S, Gonini Junior A, Moura SK, McCabe JF. Comparison of microleakage in human and bovine substrates using confocal microscopy. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2009; 50(3): 111-6.
57. Lopes MB, Yan Z, Consani S, Junior Gonini A, Aleixo A, McCabe JF. Evaluation of the coefficient of thermal expansion of human and bovine dentin by thermomechanical analysis. *Braz Dent J.* 2012; 23(1):3-7.
58. 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.
59. Marshall Jr. Dentin: microstructure and characterization. *Quintessence Int.* 1993; 24(9): 606-17.
60. Mazzoni A, Nascimento FD, Carrilho M, Tersariol I, Papa V, Tjäderhane L, et al. MMP activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. *J Dent Res.* 2012; 91(5): 467-72.
61. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, 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.
62. Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri Jr A, 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.
63. Mellberg JR. Hard- tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. *J Dent Res.* 1992; 71 Spec N°: 913-9.
64. 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.

65. Nakabayashi N, Watanabe A, Arao T. A tensile test to facilitate identification of defects in dentine bonded specimens. *J Dent*. 1998; 26(4): 379-85.
66. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. 2006; 69(3): 562-73.
67. Nemeth JA, Yousif R, Hersog M, Che M, Upadyhyay J, Shekarriz B, et al. Matrix metalloproteinase activity, bone turnover, and tumor proliferation in prostate cancer bone metastasis. *J Nat Cancer Inst*. 2002; 94(1): 17-25.
68. Novais VR, Soares PB, Guimarães CM, Schliebe LR, Braga SS, Soares CJ. Effect of gamma radiation and endodontic treatment on mechanical properties of human and bovine root dentin. *J Dent Braz*. 2016; 27(6): 670-4.
69. Oliveira SS, Marshall SJ, Habelitz S, Gansky SA, Wilson RS, Marshall Jr GW. The effect of a self-etching primer on the continuous demineralization of dentin. *Eur J Oral Sci*. 2004; 112(4): 376-83.
70. Orsini G, Legitimo A, Failli A, Massei F, Biver P, Consolini R. Enumeration of human peripheral blood dendritic cells throughout the life. *Int Immunol*. 2012; 24(6): 347-56.
71. Orsini G, Ruggeri A Jr, Mazzoni A, Papa V, Piccirilli M, Falconi M, et al. Immunohistochemical identification of type I and III collagen and chondroitin sulphate in human pre- dentine: a correlative FEI-SEM/TEM study. *Int Endod J*. 2007; 40(9): 669-78.
72. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*. 2011; 27(1): 1-16.
73. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host- derived enzymes during aging. *J Dent Res*. 2004; 83(3): 216-21.

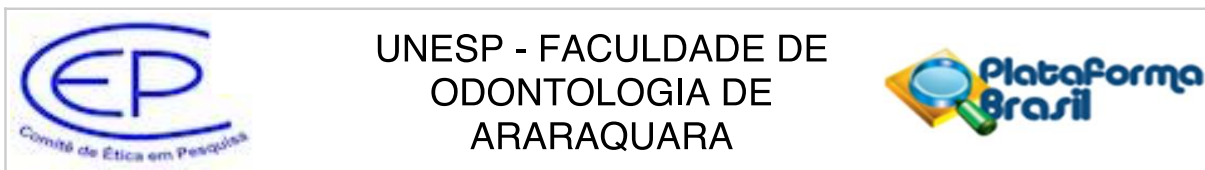
74. Paul SJ, Leach M, Rueggeberg FA, Pashley DH. Effect of water content on the physical properties of model dentine primer and bonding conditions. *J Dent*. 1999; 27(3):209-14.
75. Perdigão J, Reis A, Loguercio AD. Dentin adhesion and MMPs: A comprehensive review. *J Esthet Restor Dent*. 2013; 25(4): 219-41.
76. Peumans M, Kanumilli P, De Munck 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.
77. Prylinska- Czyzewska A, Piotrowski P, Prylinski M, Dorocka- Bobkowska B. Various cements and their effects on bond strength of zirconia ceramic to enamel and dentin. *Int J Prosthodont*. 2015; 28(3): 279-81.
78. Reis AF, Giannini M, Kavaguchi A, Soares CJ, Line SRP. Comparison of microtensile bond strength to enamel and dentin of human, bovine and porcine teeth. *J Adhes Dent*. 2004; 6(2): 117-21.
79. 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.
80. Rueggeberg FA. Substrate for adhesion testing to tooth structure- review of the literature. *Dent Mater*. 1991; 7(1): 2-10.
81. Rüttermann S, Braun A, Janda R. Shear bond strength and fracture analysis of human vs. bovine teeth. *PloS One*. 2013; 8(3): 1-6.
82. Sadek FT, Pashley DH, Nishitani Y, Carrilho MR, Donnelly A, Ferrari M, et al. Application of hydrophobic resin adhesives to acid-etched dentin with an alternative wet bonding technique. *J Biomed Mater Res*. 2008; 84(1): 19-29.
83. Sato M, Miyazaki M. Comparison of depth of dentin etching and resin infiltration with single-step adhesives systems. *J Dent*. 2005; 33(6): 475-84.

84. Sauro S, Pashley DH, Mannocci F, Tay FR, Pilecki P, Sheriff M, et al. Micropermeability of current self-etching and etch-and-rinse adhesives bonded to deep dentine: a comparison study using a double staining/ confocal microscopy technique. *Eur J Sci Oral*. 2008; 116(2): 184-93.
85. Scaffa PM, Breschi L, Mazzoni A, Vidal CM, Curci R, Apolonio F, et al. Co-distribution of cysteine cathepsins and matrix metalloproteases in human dentin. *Arch Oral Biol*. 2017; 74: 101-7.
86. Scheffel DL, Huck C, Soares DG, Basso FG, de Souza Costa CA, Brackett MG, et al. Uninfiltrated collagen in hybrid layers produced after reduced acid-etching time on primary and permanent dentin. *J Contemp Dent Pract*. 2016; 17(10): 861-6.
87. Schilke R, Lisson JA, Baub O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol*. 2000; 45(5): 355-61.
88. Schmalz G, Hiller KA, Nunez LI, Stoll J, Weis K. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *J Endod*. 2001; 27(1): 23-30.
89. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover. Part I: Biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev*. 2005; 26:97-122.
90. Seseogullari-Dirihan R, Mutluay MM, Vallittu P, Pashley DH, Tezvergil-Mutluay A. Effect of pretreatment with collagen crosslinkers on dentin protease activity. *Dent Mater*. 2015; 31(8): 941-7.
91. Shin TP, Yao X, Huenergardt R, Walker MP, Wang Y. Morphological and chemical characterization of bonding hydrophobic adhesive to dentin using ethanol wet bonding technique. *Dent Mater*. 2009; 25(8): 1050-7.
92. Skene L. Ownership of human tissue and the law. *Nat Rev Genet*. 2002; 3(2):145-8.

93. Soares FZM, Follak A, da Rosa LS, Montagner AF, Lenzi TL, Rocha RO. Bovine tooth is substitute for human tooth on bond strength studies: A systematic review and meta- analysis of in vitro studies. *Dent Mater.* 2016; 32(11): 1385-93.
94. Soares LES, Campos ADF, Martin AA. Human and bovine dentin composition and its hybridization mechanism assessed by FT- Raman spectroscopy. *J Spectrosc.* 2013; 2013: ID 210671.
95. Soares LES, Santo AME. Morphological and chemical comparative analysis of the human and bovine dentin- adhesive layer. *Microsc Microanal.* 2015; 21(1): 204-13.
96. Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res.* 2002; 62(3): 447-56.
97. Spencer P, Wang Y, Katz JL. Identification of collagen encapsulation at the dentin/adhesive interface. *J Adhes Dent.* 2004; 6(2): 91-5.
98. Spencer P, Ye Q, Park J, Topp EM, Marangos O, Wang Y, et al. Adhesive/dentin interface: the weak link in the composite restoration. *Ann Biomed Eng.* 2010; 38(6): 1989-2003.
99. 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.
100. 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.
101. 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.
102. Tay FR, Pashley DH. Have dentin adhesives become too hydrophilic? *J Can Dent Assoc.* 2003; 69(11): 726-31.

103. Tay FR, Pashley DH, Kapur RR, Carrilho MR, Hur YB, Garret LV, et al. Bonding BisGMA to dentin- a proof of concept for hydrophobic dentin bonding. *J Dent Res.* 2007; 86(11): 1034-9.
104. 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.
105. Teruel JD, Alcolea A, Hernández A, Ruiz AJO. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Arch Oral Biol.* 2015; 60(5): 768-75.
106. 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.
107. Tjäderhane L, Buzalaf MAR, Carrilho M, Chaussain C. Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: the era of “dentin degradomics”. *Caries Res.* 2015; 49(3):193-208.
108. Tjäderhane L, Carrilho MR, Breschi L, Tay FR, Pashley DH. Dentin basic structure and composition—an overview. *Endod Topics.* 2012; 20(1): 3–29.
109. Tjäderhane L. Dentin bonding: can we make it last? *Oper Dent.* 2015; 40(1): 4-18.
110. 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.
111. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer- a review. *Dent Mater.* 2013; 29(10): 999-1011.
112. 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.

113. Turssi CP, Messias DF, Corona SM, Serra MC. Viability of using enamel and dentin from bovine origin as a substitute for human counterparts in an intraoral erosion model. *Braz Dent J.* 2010; 21(4): 332-6.
114. 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 Mat.* 2010; 26(2): 100-21.
115. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Circ Res.* 2003; 92(8): 827-39.
116. Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res.* 2003; 82(2): 141-5.
117. Wegehaupt F, Gries D, Wiegand A, Attin T. Is bovine dentine an appropriate substitute for human dentine in erosion/abrasion tests? *J Oral Rehabil.* 2008; 35(5): 390-4.
118. Yassen GH, Platt JA, Hara AT. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *J Oral Sci.* 2011; 53(3): 273-82.
119. Young- Laurance P, Bozec L, Gracia L, Rees G, Lippert F, Lynch RJM, et al. A review of the structure of human and bovine dental hard tissues and their physicochemical behavior in relation to erosive challenge and remineralization. *J Dent.* 2011; 39(4): 266- 72.
120. Zaitseva OV, Shandrenko SB, Veliky MM. Biochemmical markers of bone collagen Type I metabolism. *Ukr Biochem J.* 2015; 87(1): 21-32.
121. Zhang S-C, Kern M. The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. *Int J Oral Sci.* 2009; 1(4): 163-76.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Atividade proteolítica e degradação da matriz da dentina bovina e humana

Pesquisador: JOSIMERI HEBLING COSTA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 55962515.6.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.603.950

Apresentação do Projeto:

O projeto visa estudar as causas da deterioração da união resina-dentina por degradação enzimática, usando dentes bovinos em comparação com os humanos. De acordo com o pesquisador, com esse estudo será possível avaliar a validade da extrapolação dos resultados obtidos com dentina bovina para a dentina humana.

Objetivo da Pesquisa:

Este estudo pretende investigar a degradação da matriz de colágeno da dentina de dentes bovinos comparados a da dentina de dentes humanos, em função da atividade total de metaloproteinases da matriz (MMPs), perda de massa seca, liberação de hidroxiprolina e equivalência à MMP-9.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os pesquisadores estarão sujeitos a riscos (remotos) relacionados a manipulação dos dentes. Esses riscos serão minimizados com a utilização de EPIs adequados (luvas, jaleco, gorro, máscara e óculos).

Benefícios: Devido às dificuldades crescentes na obtenção de dentes humanos para pesquisas in vitro, muitos estudos tem utilizado a dentina bovina como substrato para adesão. O nosso estudo busca comparar esses dois substratos, na qualidade de uso para pesquisa. Se nossos resultados forem positivos, muitos pesquisadores se beneficiarão, além de que a utilização de dentes humanos poderá ser evitada.

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

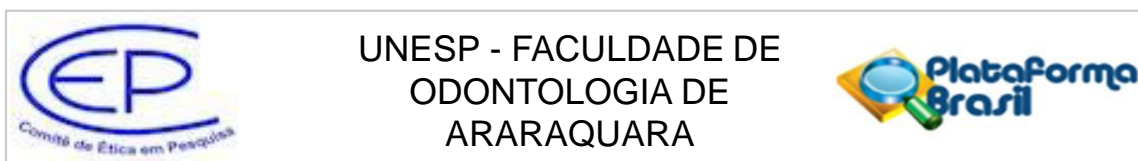
UF: SP

Telefone: (16)3301-6459

CEP: 14.801-903

Município: ARARAQUARA

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.603.950

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto foi bem elaborado, apresentando embasamento científico que justifica a relevância da proposta e a metodologia a ser utilizada está descrita de forma clara e detalhada.

A pesquisa trará importante contribuição para uma possível substituição de dentes humanos por dentes de bovinos em pesquisas in vitro.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi solicitado a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) porque o estudo utilizará dentes oriundos do Banco de Dentes desta mesma instituição.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O estudo demonstra relevância científica e trará contribuições importantes para pesquisas na área Odontológica.

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo APROVADO em reunião de 23 de junho de 2016.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_601547.pdf	09/05/2016 16:37:08		Aceito
Outros	Autorizacao_lab.pdf	09/05/2016 15:32:32	JOSIMERITHEBLING COSTA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	02/05/2016 16:27:31	JOSIMERITHEBLING COSTA	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	02/05/2016 16:22:41	JOSIMERITHEBLING COSTA	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	15/10/2015 15:12:45	JOSIMERITHEBLING COSTA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biobanco.pdf	13/10/2015 15:20:28	JOSIMERITHEBLING COSTA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_compromisso.pdf	13/10/2015 15:10:21	JOSIMERITHEBLING COSTA	Aceito
TCLE / Termos de	justificativa.pdf	13/10/2015	JOSIMERITHEBLING	Aceito

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

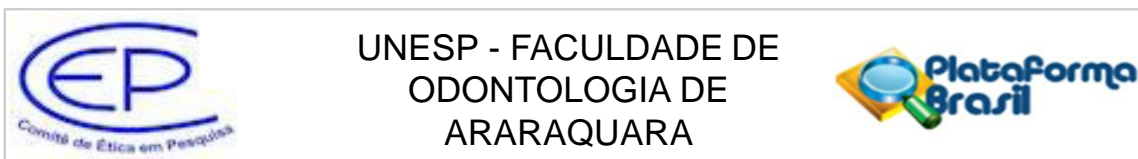
UF: SP

Telefone: (16)3301-6459

Município: ARARAQUARA

CEP: 14.801-903

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.603.950

Assentimento / Justificativa de Ausência	justificativa.pdf	14:59:05	COSTA	Aceito
--	-------------------	----------	-------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 24 de Junho de 2016

Assinado por:
Lígia Antunes Pereira Pinelli
(Coordenador)

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Sensolyte[®] Generic MMP Assay Kit *Colorimetric*

Revision Number: 1.1	Last updated: October 2014
Catalog #	AS-72095
Kit Size	100 Assays (96-well plate)

- ◆ **Optimized Performance:** This kit is optimized to detect MMP activity and screen for MMP inhibitors
- ◆ **Enhanced Value:** It provides enough reagents to perform 100 assays in a 96-well format.
- ◆ **High Speed:** The entire process can be completed in minimal time/
- ◆ **Assured Reliability:** Detailed protocol and references are provided.

Kit Components, Storage and Handling

Component	Description	Quantity
Component A	MMP colorimetric substrate	10 mM, 100 µL
Component B	Reference standard	10 mM, 10 µL
Component C	Assay Buffer	20 mL
Component D	MMP inhibitor	2 mM, 10 µL
Component E	Trypsin	1 mg/mL, 100 µL
Component F	Trypsin inhibitor	10 mg/mL, 100 µL
Component G	Stop Solution	5 mL

Other Materials Required (but not provided)

- **MMPs source:** Enzymes, validated in MMPs assays, can be ordered from AnaSpec: MMP-1 (Cat#72004), MMP-2 (Cat#72005), MMP-3 (Cat#72006), MMP-7 (Cat#72007), MMP-8 (Cat#72008), MMP-9 (Cat#72009), mMMP-9 (Cat#72069), MMP-10 (Cat#72067), MMP-12 (Cat#72010), MMP-13 (Cat#72011), and MMP-14 (Cat#72068).
- **96-well microplate:** Clear microplates provide better signal for absorbance reading.
- **Microplate reader:** Capable of detecting absorbance at 412 nm.

Storage and Handling

- Store all kit components at -20°C.
- Aliquot Components E and F as needed to avoid freeze-thaw cycles.
- Store Component C at 4°C in the dark.
- Component G can be stored at room temperature for convenience.

Introduction

Matrix metalloproteinases (MMPs) belong to a family of secreted or membrane-associated zinc endopeptidases capable of digesting extracellular matrix components and processing bioactive mediators.^{1,2} Based on their role in normal and pathological processes, including embryogenesis, wound healing, inflammation, arthritis,³ and cancer.^{4,5} MMPs have been chosen as therapeutic targets for the treatment of many diseases.

The SensoLyte[®] Generic MMP Assay Kit can be used for the continuous spectrophotometric assay of MMPs activity, including MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13, and 14 and for high throughput screening of MMP inducers and inhibitors. The chromogenic substrate is a thiopeptolide that is cleaved by the MMPs, releasing a sulfhydryl group. The sulfhydryl group reacts with Ellman's Reagent (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). The final product of this reaction, 2-nitro-5-thiobenzoic acid (TNB), can be detected at 412 nm using a microplate reader. The assays are performed in a convenient 96-well microplate format and can detect as low as nanogram level of active MMPs.

Protocol. Screening MMP inhibitors using purified enzymes

Note: For standard curve, please refer to [Appendix II](#) (optional).

1. Activate pro-MMPs

1. Incubate pro-MMPs with 10 μ g/mL trypsin (Component E). Refer to Appendix III for information on incubation time. Activate pro-MMPs immediately before the experiment.
2. Add trypsin inhibitor (Component F) at a final concentration of 100 μ g/mL.

Note 1: Keep activated enzyme on ice. Avoid vigorously vortexing the enzyme. Prolonged storage of activated enzyme will further de-activate the enzyme.

Note 2: APMA, thiol inhibitors, reducing agents (DTT, β -mercaptoethanol) will interfere with the assay. If APMA was used for MMPs activation it should be dialyzed out.

Note 3: It is preferable that the zymogen is activated by trypsin at higher protein concentration. After activation, you may dilute the enzyme for further experiment.

2. Prepare working solutions

Note: Warm all kit components until thawed to room temperature before starting the experiments.

1. **MMP substrate solution:** Dilute MMP substrate (Component A) 1:50 in assay buffer (Component C). For each experiment prepare fresh substrate solution.

Table 1. MMP substrate solution for one 96-well plate (100 assays)

Components	Volume
MMP substrate (50X, Component A)	100 μ L
Assay buffer (Component C)	4.9 mL
Total volume	5 mL

2. **MMP diluent:** Dilute MMPs enzymes to an appropriate concentration in assay buffer (Component C).
3. **MMP inhibitor (GM6001):** Dilute 2 mM inhibitor solution (Component D) to 20 μ M in assay buffer (Component C). Add 10 μ L of the 20 μ M inhibitor solution into each of the inhibitor control well of a 96-well plate.

3. Set up the enzymatic reaction.

- 3.1 Add test compounds and diluted enzyme solution to the microplate wells. For one well of

96-well plate, the suggested volume of enzyme solution is 40 μ L and 10 μ L of test compound.

2. Simultaneously establish the following control wells, as deemed necessary:
 - Positive control contains MMP enzyme without test compound.
 - Inhibitor control contains MMP enzyme and a known MMP inhibitor.
 - Vehicle control contains MMP enzyme and vehicle used in delivering test compound (e.g. DMSO, concentration not to exceed 1%).
 - Test compound control contains assay buffer (Component C) and test compound.
 - Substrate control contains assay buffer (Component C).
3. Using the assay buffer (Component C), bring the total volume of all controls to 50 μ L.
4. Optional: Pre-incubate the plate for 10 min. at assay temperature. Any temperature (the *assay temperature*) from room temperature to 37°C may be used, as long as the subsequent incubations are performed at the same temperature.

4. Run the enzymatic reaction.

1. Add 50 μ L of MMP substrate solution into each well. For best accuracy, it is advisable to have the MMP substrate solution equilibrated to the assay temperature. Mix the reagents completely by shaking the plate gently for 30 sec.
2. Measure absorbance signal:
 - For kinetic reading: Immediately start measuring absorbance reading at 412 nm continuously and record data every 10 min. for 60 min.
 - For end-point reading: Incubate the reaction for 60 min. Optional: Add 50 μ L of stop solution (Component G) to each well. Mix the reagents and measure absorbance at 412 nm.
3. For methods of data analysis: Refer to Appendix I.

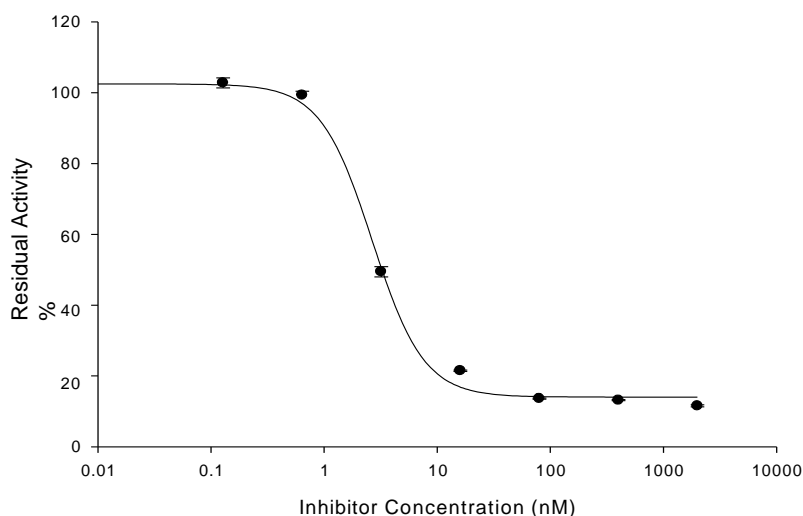


Figure 1. GM6001 inhibition of MMP-9 activity measured with SensoLyte[®] Generic MMP Assay Kit.

Appendix I. Data Analysis

- The absorbance reading from the substrate control well is used as the background absorbance. This background reading should be subtracted from the readings of the other wells containing substrate.
- For kinetics analysis:
 - Plot data as Abs (absorbance units) versus time for each sample. To convert absorbance to the concentration of the product of the enzymatic reaction, please refer to [Appendix II](#) for establishing a reference standard.
 - Determine the range of initial time points during which the reaction is linear. Typically, the first 10-15% of the reaction will be the optimal range.
 - Obtain the initial reaction velocity (V_0) in Abs/min by determining the slope of the linear portion of the data plot.
 - A variety of data analyses can be done, e.g., determining inhibition %, EC_{50} , IC_{50} , K_m , K_i , etc.
- For endpoint analysis:
 - Plot data as Abs (absorbance units) versus concentration of test compounds.
 - A variety of data analyses can be done, e.g., determining inhibition %, EC_{50} , IC_{50} , etc.

Appendix II. Instrument Calibration

- Glutathione reference standard: Dilute 10 mM of reduced glutathione (Component B) to 200 μ M in assay buffer (Component C). Do 2-fold serial dilutions to get concentrations of 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 μ M, include an assay buffer blank. Add 50 μ L/well of these serially diluted reference solutions.
 - Note 1: Store Component B at -20°C . Avoid freeze-thaw.
 - Note 2: Reduced glutathione (GSH) is a tripeptide (g-glutamylcysteinylglycine) with a free thiol group, which reacts with Ellman's reagent and produces a yellow color. GSH can be used as a reference standard to calculate the concentration of SH groups in the sample.
- Add 50 μ L/well of MMP substrate solution (refer to Step 2.1 for preparation).
- Measure absorbance at 412 nm.
- Plot Abs versus concentration as shown in Figure 2.
- The final concentrations of reference standard are 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, and 0 μ M. This reference standard is used to calibrate the variation of different instruments and different experiments. It is also an indicator of final amount of SH groups in the enzymatic reaction.

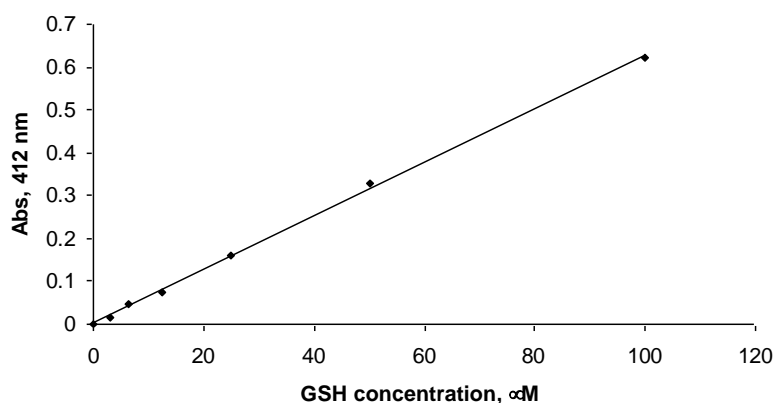


Figure 2. GSH reference standard, GSH was serially diluted in assay buffer, and the absorbance was measured at 412 nm (Ultra Microplate Reader EL808, Bio-Tek Instruments, Inc).

Appendix III.

Table 1. Activation of pro-MMPs

MMPs	Activation
MMP-1 (Interstitial collagenase)	Trypsin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 min at room temperature
MMP-2 (Gelatinase A)	1 mM APMA, 1 hour at 37°C
MMP-3 (Stromelysin-1)	Trypsin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 30 min at 37°C
MMP-7 (Matrilysin)	Trypsin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 hours at 37°C
MMP-8 (Neutrophil collagenase)	Trypsin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, slow activation at 37°C
MMP-9 (Gelatinase B)	Trypsin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 hours at 37°C
MMP-10 (Stromelysin-2)	Trypsin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 30 min at 37°C
MMP-12 (Macrophage elastase)	Autolytic, refolding in assay buffer
MMP-13 (Collagenase-3)	Trypsin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 30 min at 37°C
MMP-14 (MT1-MMP)	Trypsin, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 60 min at room temperature

References

1. Woessner, J.F. Jr. and C.J. Taplin, *J. Biol. Chem.* **263**, 16918 (1988).
2. Woessner, J.F. Jr. *FASEB J.* **5**, 2145 (1991).
3. Gravallesse, E.M. et al. *Arthritis Rheum.* **34**, 1076 (1991).
4. Stetler-Stevenson, W.G. et al. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 541 (1993).
5. Goldberg, G.I. et al. *Ann. NY. Acad. Sci.* **580**, 375 (1990).

Não autorizo a versão final desse trabalho até 12/05/2019

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 12 de maio de 2017

CRISTIANE MAYUMI INAGATI