



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



Mariana Citta

**Estabilidade mecânica e atividade proteolítica de interfaces produzidas com a
técnica de adesão seca à dentina biomodificada**

Araraquara

2019



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



Mariana Citta

Estabilidade mecânica e atividade proteolítica de interfaces produzidas com a técnica de adesão seca à dentina biomodificada

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral, na Área de Prótese.

Orientadora: Profa. Dra. Josimeri Hebling

Araraquara

2019

Citta, Mariana

Estabilidade mecânica e atividade proteolítica de interfaces produzidas com a técnica de adesão seca à dentina biomodificada / Mariana Citta. -- Araraquara: [s.n.], 2019 70 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) –
Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientadora: Profa. Dra. Josimeri Hebling

1. Adesivos dentinários 2. Envelhecimento 3. Dentina
4. Inibidores de proteases 5. Reagentes para ligação
cruzada 6. Resistência à tração I. Título

Mariana Citta

Estabilidade mecânica e atividade proteolítica de interfaces produzidas com a técnica de adesão seca à dentina biomodificada

Comissão julgadora

**Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em
Reabilitação Oral**

Presidente e orientador(a): Profa. Dra. Josimeri Hebling

2º Examinador(a): Profa. Dra. Ana Flávia Sanches Borges

3º Examinador(a): Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso

Araraquara, 01 de Março de 2019.

DADOS CURRICULARES

Mariana Citta

NASCIMENTO:	15 de Julho de 1993, Ribeirão Preto/SP
FILIAÇÃO:	Pai: José Carlos Citta Mãe: Angela Baliardo Citta
2012/2016	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2017/2019	Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, área de concentração em Prótese, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedico este trabalho primeiramente à **Deus**, pois sem Ele me abençoando, fortalecendo e protegendo a cada dia, eu não teria chegado até aqui.

Dedico também aos meus pais **José Carlos e Angela**, ao meu noivo **Mauricio**, ao meu irmão **Júnior** e às minhas sobrinhas **Maria Luiza e Malu**, pois o apoio e o carinho de vocês foram fundamentais.

À minha irmã **Fabiane** (in memoriam) pelo exemplo que foi em vida. Por todo carinho que sempre me transmitiu, por ter sido a pessoa mais feliz e empolgada quando entrei na faculdade de odontologia, e principalmente, por ter nos deixado duas pedras preciosas chamadas Maria Luiza e Malu.

Por fim, dedico a todos meus **familiares e amigos** que me ajudaram e torceram por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus**, por Ele, com Sua infinita bondade e misericórdia, sempre guiar e proteger minha vida e minha família. Agradeço porque nos momentos difíceis Ele mostrou a Tua presença e o Teu amor comigo. E agradeço também pelas bênçãos e conquistas.

À minha Mãe **Angela Baliardo Citta**, minha melhor amiga e companheira. Obrigada por todo amor e dedicação que você sempre teve comigo, por sempre tentar fazer o melhor para mim e por ter me educado da melhor maneira possível. Obrigada por sempre torcer e me apoiar nessa jornada durante a graduação e o mestrado, e por me incentivar a buscar meus objetivos. Quero que você saiba que sempre estarei ao seu lado, mesmo que as vezes longe fisicamente, mas perto com o coração. Obrigada por tudo. Te Amo Infinitamente!

Ao meu Pai **José Carlos Citta**, por todo amor e dedicação comigo. Obrigada por sempre me apoiar nas minhas escolhas e fazer de tudo para eu alcançar meus objetivos. Obrigada por sempre ser presente (lembro como se fosse hoje de você me trazendo para fazer a matrícula na faculdade), e por se alegrar com as minhas conquistas. Te amo!

Ao meu noivo e futuro marido **Mauricio Andrés Tinajero Aroni**, por todo amor, carinho, paciência e dedicação comigo. Você chegou no início dessa caminhada e fez com que tudo fosse mais leve e feliz. Obrigada por ter estado ao meu lado todos os dias, até mesmo nos piores, e você estava ali com todo amor, paciência, atenção e cuidado. Obrigada por sempre me motivar a continuar para alcançar meus objetivos, pelos seus conselhos e companhia até nos feriados de experimento na faculdade. Obrigada por ser meu melhor amigo, por ser essa pessoa incrível e de um coração gigante. Te Amo Pra Sempre!

Ao meu irmão **José Carlos Citta Júnior**, por ter compartilhado comigo muitos momentos bons e ruins. Obrigada por sempre torcer por mim e me apoiar, e também por ter paciência comigo. Saiba que tenho muito orgulho de você. Te Amo!

Às minhas sobrinhas **Maria Luiza e Malu**, simplesmente por existirem na minha vida. Obrigada por cada sorriso e cada abraço no final de semana, quando eu chegava de uma semana cansativa. Obrigada pelo amor, carinho e também pelas brincadeiras. Amo vocês!

Aos meus **familiares**, amigas **Laís, Marcela, Marina, Mariely, Camila, Carla, Rafaela e Daniela**, e amigos **Guilherme e João Victor** que sempre torceram por mim e se alegraram com as minhas conquistas durante essa caminhada.

Gostaria de agradecer também à minha querida orientadora **Profª. Drª. Josimeri Hebling**. Obrigada por toda confiança, paciência, apoio e ensinamentos, contribuindo de forma excepcional para o meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada pela oportunidade de poder trabalhar com a senhora, uma mulher admirável, e por compartilhar os seus conhecimentos comigo. Mais uma vez obrigada pela paciência que sempre teve comigo e pelos seus conselhos, acredito que sou uma pessoa mais confiante e a senhora fez parte disso. Muito obrigada!

À minha coorientadora **Drª. Giovana Anovazzi Medeiros**, que ao longo dessa jornada se tornou uma amiga. Obrigada por tudo que fez por mim nesses dois anos de mestrado. Obrigada por sempre se dispor a me ajudar, pela confiança, apoio, ensinamentos e paciência, muita paciência que teve comigo. Obrigada pelos conselhos e por sua amizade!

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, por ser um exemplo de professor, pesquisador e pessoa, e pelos ensinamentos e conselhos durante as apresentações nas reuniões. Obrigada também por ter aberto as portas do seu laboratório e ter permitido que eu fizesse parte da sua equipe ainda durante minha graduação.

À **Profª. Drª. Fernanda Gonçalves Basso Lombardi**, por todo apoio que me deu durante esses anos. Obrigada por me ajudar sempre que precisei, pelo auxílio na pesquisa, pelas sugestões e correções feitas durante minha pré-qualificação e qualificação e por ter aceitado compor minha banca de defesa. Obrigada pelos seus conselhos e amizade Fer.

À **Dr^a. Débora Lopes Salles Scheffel**, por ter me auxiliado no início do mestrado, demonstrando os protocolos para os experimentos, tirando minhas dúvidas e compartilhando seu conhecimento para a minha pesquisa. Obrigada!

Aos **Prof. Dr. José Maurício dos Santos Nunes Reis** e **Prof^a. Dr^a. Ligia Antunes Pereira Pinelli**, professores do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pela orientação e ensinamentos durante meu estágio docência nas disciplinas de Prótese Fixa I e II.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, com seu atual reitor **Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini** e vice-reitor **Prof. Dr. Sérgio Roberto Nobre**. Agradeço por fazer parte dessa grande universidade, que me proporcionou grande crescimento pessoal e profissional durante minha vida acadêmica na graduação e pós-graduação.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara**, minha amada **FOAr** onde vivi os melhores últimos 7 anos, com sua atual e querida diretora **Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Sgavioli Massucato** e seu querido vice-diretor **Prof. Dr. Edson Alves de Campos**, pelo acolhimento, atenção e cuidado para com os alunos desta Instituição. Tive a honra de fazer minha graduação nesta casa e de poder realizar o curso de Mestrado em Reabilitação Oral.

Ao **Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral**, representado pela atual coordenadora **Prof^a. Dr^a. Ana Claudia Pavarina** e vice-coordenadora **Prof^a. Dr^a. Daniela Aparecida de Godoi Gonçalves**. Agradeço a todos os professores que me ajudaram a crescer como profissional e como pessoa através dos conhecimentos compartilhados durante as disciplinas ministradas e estágios docência no curso de mestrado.

Ao **Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese**, com seu atual chefe de departamento **Prof. Dr. João Neudenir Arioli Filho** e seu vice-chefe **Prof. Dr. Francisco de Assis Mollo Junior**. Obrigada a todos por compartilharem seus conhecimentos e pela cordialidade no dia a dia.

Ao **Departamento de Clínica Infantil**, com sua atual chefe de departamento **Profª. Drª. Josimeri Hebling Costa** e seu vice-chefe **Prof. Dr. Luiz Gonzaga Gandini Junior**. Obrigada a todos por compartilharem seus conhecimentos e pela cordialidade no dia a dia.

Ao **Departamento de Fisiologia e Patologia**, com seu atual chefe de departamento **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa** e seu vice-chefe **Prof. Dr. Eduardo Colombari**. Obrigada a todos por compartilharem seus conhecimentos e pela cordialidade no dia a dia.

Ao **Laboratório de Pesquisas e Análises de Biomateriais**, no Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, sob a coordenação da **Profª. Drª. Josimeri Hebling**, pelo apoio e infraestrutura para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao **Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais**, no Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, sob a coordenação do **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, pelo apoio e infraestrutura em momentos necessários para o desenvolvimento da pesquisa.

À CAPES:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

À

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2017/03927-9) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Aos **amigos** do Laboratório de Pesquisas e Análises de Biomateriais e do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais, pelo bom convívio, apoio e ajuda no dia a dia, e pelos momentos de descontração vividos.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação **José Alexandre e Cristiano**, por serem sempre simpáticos, pacientes e prestativos.

A **todos os funcionários e colaboradores** da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, pelo bom convívio e dedicação com a qual desenvolvem seus trabalhos.

Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram da minha história, colaboraram para o meu crescimento ou simplesmente torceram e vibraram com cada conquista.

Muito obrigada!

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem
sucedidos.”

Provérbios 13:3.

Citta M. Estabilidade mecânica e atividade proteolítica de interfaces produzidas com a técnica de adesão seca à dentina biomodificada [dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a estabilidade mecânica e a atividade proteolítica de interfaces produzidas pela aplicação de um adesivo convencional simplificado sobre a dentina biomodificada e seca. **Métodos:** Superfícies planas de dentina coronária foram criadas em 64 molares hígidos. Os dentes foram divididos em 4 grupos de acordo com a solução aplicada sobre a dentina condicionada: extrato de semente de uva 5% (GSE), glutaraldeído 5% (GD), Gluma Desensitizer ou água (controle). As soluções foram aplicadas por 60s seguido de lavagem e secagem com papel absorvente. Os dentes foram então subdivididos em dois grupos, nos quais a dentina condicionada foi mantida úmida ou foi seca com ar por 60s. O adesivo Optibond foi aplicado e em seguida foi construído um cilindro de resina. Decorridas 24h, os dentes foram cortados em espécimes ($0,81 \text{ mm}^2$), submetidos ao ensaio de microtração imediatamente ou após 12 meses de envelhecimento. Os mesmos procedimentos adesivos foram realizados em 32 dentes adicionais. Esses dentes foram seccionados em fatias de 0,5 mm de espessura, preparadas para os ensaios de nanoinfiltração e zimografia in situ (EnzChek). Os dados de resistência de união foram submetidos aos testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$), e os ensaios de nanoinfiltração e zimografia in situ foram apresentados descritivamente. **Resultados:** Redução significativa da resistência de união imediata (ca. 65%) e aumento da atividade proteolítica e nanoinfiltração foi observado em interfaces produzidas sobre a dentina seca, sem previa biomodificação. Diferentemente, os valores de resistência de união não diferiram dos obtidos para a dentina úmida quando o colágeno foi biomodificado antes da secagem com ar. Interfaces produzidas sobre a dentina úmida e seca foram estáveis após 12 meses apenas quando a dentina foi biomodificada por GSE, GD ou Gluma. **Conclusão:** Interfaces produzidas pela aplicação de um adesivo convencional simplificado sobre a dentina biomodificada e seca foram mecanicamente estáveis e apresentaram reduzida atividade proteolítica após um ano de envelhecimento.

Palavras-chave: Adesivos dentinários. Envelhecimento. Dentina. Inibidores de proteases. Reagentes para ligação cruzada. Resistência a tração.

Citta M. Mechanical stability and proteolytic activity of resin-dentin bonds produced by the cross-linked dry bonding technique [dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the mechanical stability and the proteolytic activity of bonds created by a one-step, etch-and-rinse adhesive applied to cross-linked and air-dried etched dentin. **Methods:** Flat coronal dentin surfaces were produced in 64 sound molars. The teeth were divided into 4 groups according to the solution applied on the etched dentin: 5% grape seed extract, 5% glutaraldehyde, Gluma Desensitizer or deionized water (control). Solutions were applied for 60s followed by rinse and blot drying. Then, the teeth were separated into two subgroups: the etched dentin was kept moist or air dried for 60s. Optibond was applied followed by a composite resin buildup. After 24h, the teeth were cut into beams (0.81 mm²) which were microtensile tested immediately or after 12mo of storage. Additional teeth (n=32) were bonded as described and cut into 0.5 mm-thick slabs. The slabs were prepared for nanoleakage and in situ zymography analyses (EnzChek). Bond strength data were submitted to ANOVA and Tukey tests (p<0.05) while nanoleakage and zymography data were descriptively reported. **Results:** Significant reduction in bond strength (ca. 65%) and increase of the proteolytic activity was seen when the etched dentin was air-dried without previous biomodification. Conversely, bond strengths did not differ from those produced on wet dentin when collagen was cross-linked before air-drying, irrespective of the solution. For both moist and air-dried etched dentin, collagen cross-linking resulted in mechanically stable bonds and reduced proteolytic activity. **Conclusion:** Bonds produced by the application of a one-step, etch-and-rinse adhesive to cross-linked, air-dried etched dentin became mechanically stable and revealed reduced proteolytic activity after one year of aging.

Keywords: Dentin bonding agents. Aging. Dentin. Protease inhibitors. Cross-linking agents. Bond strength.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 PROPOSIÇÃO.....	17
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1 Visão Geral da Composição da Dentina.....	18
3.2 Estrutura Básica do Colágeno Tipo I.....	19
3.3 Atividade Proteolítica da Dentina.....	20
3.4 Formação da Camada Híbrida.....	21
3.5 Mecanismos de Degradação da Camada Híbrida.....	22
3.6 Estratégias para Melhorar a Estabilidade da Camada Híbrida.....	24
3.7 Biomodificação da Matriz Dentinária por Agentes Promotores de Ligações Cruzadas (<i>cross-linkers</i>).....	25
4 MATERIAL E MÉTODO.....	29
4.1 Aspectos Éticos.....	29
4.2 Delineamento Experimental para o Ensaio Mecânico de Microtração.....	29
4.3 Obtenção da Superfície de Dentina.....	30
4.4 Tratamento da Dentina Prévio a Aplicação do Sistema Adesivo.....	31
4.5 Aplicação do Sistema Adesivo.....	32
4.6 Obtenção dos Espécimes para o Ensaio Mecânico de Microtração.....	33
4.7 Armazenamento dos Espécimes (Envelhecimento).....	34
4.8 Ensaio Mecânico de Microtração.....	34
4.9 Análise de Fraturas.....	35
4.10 Delineamento Experimental para Ensaio de Nanoinfiltração e Zimografia in situ.....	35
4.11 Protocolo de Nanoinfiltração e Avaliação em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	36
4.12 Zimografia in situ.....	37
4.13 Análise Estatística.....	38

5 RESULTADO.....	39
5.1 Resistência de União.....	39
5.2 Distribuição dos Tipos de Fraturas.....	40
5.3 Nanoinfiltração.....	41
5.4 Atividade Proteolítica.....	45
6 DISCUSSÃO.....	48
7 CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXO A.....	67

1 INTRODUÇÃO

A camada híbrida exerce função importante na retenção do material restaurador e no selamento da dentina. A camada híbrida ideal é caracterizada como uma estrutura tridimensional, composta pela mescla de polímero e colágeno, impermeável e capaz de garantir uma ligação contínua e estável entre a dentina e o material adesivo ¹. Entretanto, esse biocomposto contém imperfeições desde o momento de seu estabelecimento, como áreas sem infiltração monomérica ou pobremente infiltradas, áreas de predomínio hidrófilo ², retenção de água e solvente e a presença de fibrilas de colágeno desnudas ³ e, como consequência, tem sido considerado o elo frágil da união resina-dentina ¹. A infiltração incompleta da rede de colágeno desmineralizado por monômeros adesivos ³⁻⁸ é devido, entre outras razões, ao reduzido espaço disponível entre as moléculas de colágeno que compõem as fibrilas ⁹. Essa falta de espaço se deve à dois fatores principais: a presença de moléculas de água livres e também ligadas ao colágeno desmineralizado e ao empacotamento denso do colágeno ¹⁰⁻¹². Assim, devido a sua natureza imperfeita, a camada híbrida é susceptível a degradação, independente do sistema adesivo utilizado, convencional ou autocondicionante ^{10, 13-15}. Os processos de degradação da camada híbrida envolvem a clivagem do colágeno exposto por proteases dentinárias ^{10, 12, 14} e a hidrólise da porção resinosa por esterases, principalmente as produzidas por bactérias ¹⁶.

Após a desmineralização da dentina, a água é importante para a manutenção dos espaços interfibrilares que servirão de via para a infiltração dos monômeros do adesivo ¹⁷. Porém, a água limita a infiltração de monômeros hidrófobos, compromete a conversão monomérica ^{18, 19} e permite a hidrólise do colágeno mediada por enzimas proteolíticas como as metaloproteinases da matriz (MMPs) e as cisteínas catépsinas ^{10, 12}. Revisões que abordam a instabilidade da união resina-dentina têm demonstrado que a degradação do colágeno exposto na camada híbrida é um dos principais responsáveis pela falha de interfaces produzidas sobre a dentina ^{20, 21}. Entretanto, a remoção do conteúdo de água da dentina condicionada por simples evaporação, além de ser impraticável ¹¹, resulta no colapso das fibrilas de colágeno e fechamento das vias de infiltração do adesivo ^{17, 22-24}.

Visando aumentar as propriedades mecânicas do colágeno e torná-lo mais resistente à degradação, tem sido proposto o pré-tratamento da dentina condicionada com agentes promotores de ligações cruzadas (cross-linkers) ²⁵⁻²⁸,

como a carbodiimida (EDC), o glutaraldeído e as proantocianidinas (PAs). Esses agentes melhoram as propriedades mecânicas do colágeno, efeito esse evidenciado pelo aumento da resistência máxima à tração e módulo de elasticidade ²⁸⁻³¹. Adicionalmente, esses agentes são potentes inibidores de MMPs e cisteínas catepsinas ³²⁻³⁴. O mecanismo básico por meio do qual esses agentes são capazes de melhorar as propriedades mecânicas do colágeno é a promoção de ligações cruzadas secundárias ou induzidas entre as cadeias polipeptídicas que formam a molécula de colágeno (intramoleculares), entre moléculas de colágeno (intermoleculares) e entre fibrilas vizinhas (interfibrilares) ^{35, 36}.

Recentemente, Zhou et al.²² (2016) demonstraram ser possível desidratar a dentina condicionada sem consequências negativas à resistência de união imediata, desde que essa dentina tenha sido previamente biomodificada com um extrato rico em proantocianidinas (GSE). Sem a biomodificação do colágeno, a resistência de união imediata foi significativamente reduzida quando da secagem prolongada da dentina, ratificando que, sem reforçar as moléculas e fibrilas de colágeno, a técnica úmida de adesão ainda é necessária para a manutenção dos espaços interfibrilares. Essa nova técnica adesiva foi denominada de adesão à dentina biomodificada e seca (*cross-linked dry bonding*). Entretanto, os autores avaliaram apenas o efeito imediato da técnica. É importante a sua validação a longo prazo, uma vez que o grande desafio da adesão a dentina é a produção de camadas híbridas estáveis e, portanto, resistentes ou menos susceptíveis aos mecanismos de degradação hidrolítica e enzimática.

2 PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral

Avaliar a estabilidade mecânica e a atividade proteolítica de interfaces produzidas pela aplicação de um sistema adesivo convencional simplificado livre de água sobre a dentina biomodificada e seca com jatos de ar.

Objetivos Específicos

- Investigar a resistência da união resina-dentina biomodificada com um extrato de sementes de uva (GSE), glutaraldeído ou Gluma Desensitizer, seguida de secagem com jato de ar, após 24 horas e 12 meses de envelhecimento;
- Analisar a nanoinfiltração imediata e após 12 meses de envelhecimento de interfaces formadas sobre a dentina biomodificada com GSE, glutaraldeído ou Gluma Desensitizer, e seca com ar;
- Avaliar a atividade proteolítica da união resina-dentina biomodificada e seca, 24 horas ou 12 meses após sua formação, por meio da zimografia in situ.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Visão Geral da Composição da Dentina

A dentina é um tecido conjuntivo avascular e mineralizado, de origem mesenquimal, que constitui a maior parte da estrutura dentária. Esse tecido apresenta característica orgânica e úmida, e sua composição corresponde em peso a, aproximadamente, 70% de minerais, 20% de proteínas e 10% de água ^{37, 38}. Embora a fração proteica seja formada principalmente por colágeno do tipo I (~90%), esse substrato também possui proteínas não colagenosas, as quais podem ser agrupadas em proteoglicanas, glicoproteínas, proteínas séricas, fatores de crescimento, proteínas de ligação de cálcio e proteases ³⁹⁻⁴³. Em conjunto, as proteínas dentinárias formam uma rede tridimensional, denominada de matriz extracelular (MEC), a qual é reforçada por cristais de apatita ^{39, 44}.

Os cristais de apatita da dentina apresentam-se no formato de placas, com espessura entre 2,6 nm e 3,2 nm. Apenas 20% desses cristais apresenta uma orientação preferencial, paralela à junção amelo-dentinária, enquanto que os demais estão orientados aleatoriamente ⁴². Esses minerais estão localizados nos espaços interfibrilares e também intrafibrilares ^{42, 45}. Minerais ligados a superfície das fibrilas de colágeno, denominados interfibrilares ou extrafibrilares, representam aproximadamente 67% do conteúdo mineral da dentina e são esses minerais que mantêm as fibrilas separadas entre si. Os minerais localizados no interior das fibrilas (~25-30%) ⁴⁶, preenchendo os espaços entre as moléculas de colágeno, apresentam a importante função de conferir resistência mecânica a essas estruturas ⁴⁷⁻⁴⁹.

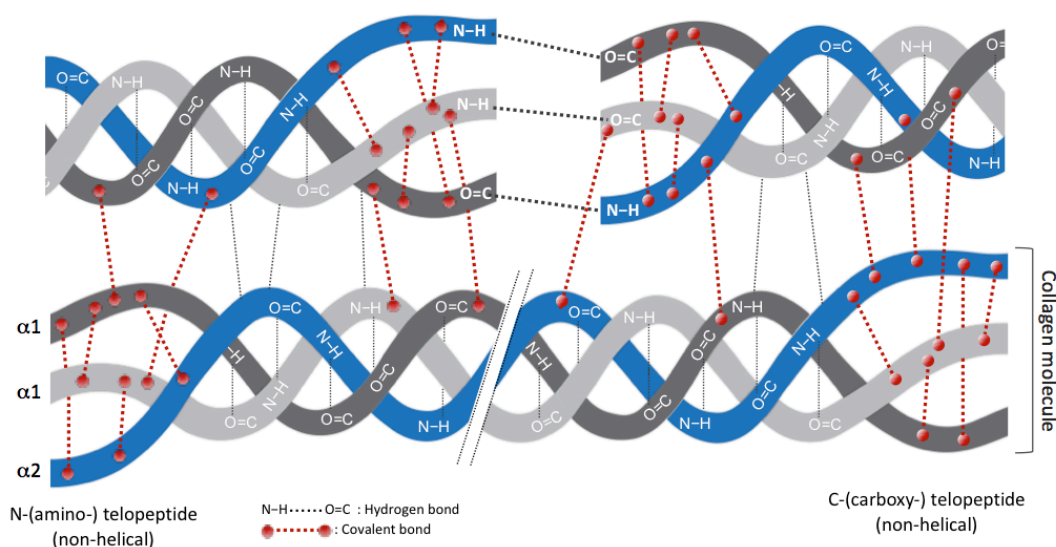
Outra característica importante da dentina é a sua umidade intrínseca, proveniente do tecido pulpar ^{38, 50}. Esse fluido circula no interior dos túbulos dentinários sob uma pressão equivalente a 15 cm de água. Segundo Agee et al.¹¹ (2015), a maior parte da água presente na matriz dentinária (~75-79%) está na forma livre, enquanto o restante (~21-25%) está ligado ao colágeno. O conteúdo aquoso da dentina (10% em peso e 20% em volume) interfere diretamente nos procedimentos adesivos realizados sobre esse substrato.

3.2 Estrutura Básica do Colágeno Tipo I

Como mencionado, colágeno é a principal proteína da dentina. Colágeno do tipo I é o predominante, e apenas traços de colágeno tipo III e V podem ser encontrados na dentina do manto³⁸. Cada molécula de colágeno tipo I é constituída pelo entrelaçamento em tripla hélice de três cadeias polipeptídicas, duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$ ⁵¹⁻⁵³, com predomínio da repetição do trio de aminoácidos Gly-Xxx-Yyy, onde normalmente Xxx é uma prolina e Yyy uma hidroxiprolina⁵⁴.

Uma molécula de colágeno tem cerca de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro⁵⁵. A conformação em tripla hélice é estabilizada por ligações entre as cadeias polipeptídicas (Figura 1), as quais são estabelecidas durante a collagenogênese⁵⁶. Além dessas, ligações endógenas também são estabelecidas entre moléculas de colágeno (intermoleculares) (Figura 1) e entre fibrilas de colágeno (interfibrilares). Em conjunto, além de manterem a configuração da molécula de colágeno, essas ligações cruzadas endógenas são responsáveis pelas essenciais propriedades mecânicas dos tecidos conjuntivos mineralizados, dentina e ossos, em decorrência da carga que recebem^{42, 57}.

Figura 1 – Representação esquemática das ligações cruzadas formadas durante a collagenogênese e o desenvolvimento dos tecidos ricos em colágeno. Ligações de hidrogênio são formadas entre as cadeias polipeptídicas que formam a molécula de colágeno (ligações intramoleculares) e entre moléculas (ligações intermoleculares). Ligações covalentes prevalecem nas extremidades das moléculas, denominadas de telopeptídeos.



Fonte: Elaborado por Josimeri Hebling.

3.3 Atividade Proteolítica da Dentina

A presença de atividade proteolítica no tecido dentinário foi demonstrada pela primeira vez por Dayan et al.⁵⁸ (1983). Áreas de atividade proteolítica estão presentes em todo o tecido, entretanto, os maiores níveis de atividade são observados na pré-dentina e ao longo dos túbulos dentinários em comparação a dentina intertubular⁵⁹. Duas famílias de endopeptidases são responsáveis pela atividade proteolítica da dentina, as metaloproteinases da matriz (MMPs) ou matrixinas e as cisteínas catepsinas (CATs). MMPs são enzimas cálcio e zinco dependentes com potencial para degradar os componentes da matriz extracelular^{60, 61}. Essas enzimas exercem um papel central em diversos processos fisiológicos como desenvolvimento e remodelação tecidual, e angiogênese⁶²⁻⁶⁴, e podem ser divididas de acordo com a especificidade do substrato em: collagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas e MMP tipo membrana⁶⁴. Na dentina humana já foram identificadas as MMPs -2 e MMP-9 (gelatinases), MMP-8 (colagenase), MMP-3 (estromelina) e MMP-20 (estromelina)⁶⁵⁻⁶⁹. Além dessas, a identificação de MMP-7 (matrilina) na dentina humana foi recentemente demonstrada por Mazzoni et al.¹⁴⁵(2018). Essas MMPs são produzidas por odontoblastos e outras células pulpares como pró-enzimas ou zimógenos.

A dentinogênese é um complexo fenômeno de desenvolvimento que necessita de uma função enzimática extracelular de diferentes proteinases, principalmente da família das MMPs⁷⁰. Entretanto, uma vez degradada a matriz extracelular excedente após a deposição dos cristais de apatita⁷¹, essas proteinases ficam aprisionadas na matriz mineralizada⁴⁰.

Eventos que resultam na desmineralização da dentina, como o processo de cárie e o condicionamento ácido da dentina durante os procedimentos restauradores adesivos, liberam as MMPs do seu envólucro mineral, as quais passam a exercer a sua função de degradação da matriz extracelular^{62, 72}. Portanto, essas proteases estão diretamente implicadas na patogênese e evolução da lesão de cárie^{62, 66} e na degradação do colágeno presente na camada híbrida⁷². O mecanismo proposto para explicar como as MMPs degradam o colágeno é a sua capacidade de desfazer a conformação helicoidal das moléculas de colágeno do tipo I⁷³. Esse mecanismo de degradação será melhor explicado no tópico “Mecanismos de Degradação da Camada Híbrida”.

Cisteínas catepsinas (CATs) representam o segundo grupo de proteases presente na dentina ⁷⁴. Até o presente momento, somente CAT-B e -K foram identificadas na dentina humana ⁷⁵. Essas proteases são, essencialmente, enzimas lisossomais, mas também apresentam ação extracelular e são capazes de degradar o colágeno tipo I ^{75, 76}. As catepsinas, como as MMPs, também agem em processos fisiológicos e patológicos, e estão relacionadas às doenças que abrangem a remodelação tecidual ⁷⁷. O pH ótimo de ativação dessas proteases é ligeiramente ácido, enquanto em pH neutro se tornam instáveis e podem ser inativadas ⁷⁸. Os sítios de atuação das CATs no processo de degradação do colágeno tipo I estão nas extremidades da molécula, amino-terminal e carboxi-terminal, e a ligação das CATs ao colágeno ocorre é dependente da presença de glicosaminoglicanas ⁷⁹.

Ensaio de zimografia, por eletroforese em gel e zimografia in situ, permitem a investigar a presença e a atividade de proteases. A zimografia in situ, entretanto, apresenta a vantagem de possibilitar a localização da atividade proteolítica no tecido ⁸⁰ e tem sido utilizada em pesquisas que avaliam a degradação da camada híbrida, assim como estratégias anti-degradação ^{75, 81-84}.

3.4 Formação da Camada Híbrida

A camada híbrida é a principal estrutura responsável pela retenção do material resinoso ao substrato dentinário e pelo selamento desse substrato. Segundo Spencer et al. ¹ (2010), essa estrutura tridimensional, composta pela mescla de polímero e colágeno, deveria ser impermeável e capaz de garantir uma ligação contínua e estável entre a dentina e o material adesivo. Entretanto, a despeito de sua importância, esse biocomposto é considerado o elo frágil da união resina-dentina ¹.

O processo de hibridização inicia-se com a remoção do conteúdo mineral da superfície da dentina pela aplicação de um agente ácido. O condicionamento realizado com ácido fosfórico à 35% aplicado por 15 segundos, desmineraliza a dentina superficial em aproximadamente 10 µm de profundidade ⁸⁵. A composição da dentina desmineralizada passa a ser, em peso, de 80% de água e 20% de proteínas ¹⁵. A presença de água nesse momento é importante para a manutenção dos espaços interfibrilares, e para prevenir a aproximação das fibrilas de colágeno e a formação espontânea de ligações de hidrogênio entre elas ¹⁷.

Durante a aplicação do sistema adesivo, ao empregar a técnica úmida de adesão, a água deveria ser substituída pelos monômeros solvatados e as fibrilas de colágeno protegidas pelo polímero resinoso ¹⁵. Porém, a impossibilidade de substituição completa da água presente na dentina desmineralizada ¹¹ e o reduzido espaço entre as moléculas de colágeno disponível para a infiltração dos monômeros ⁹, resultam na formação de camadas híbridas imperfeitas, com áreas de colágeno exposto, principalmente em sua base ^{3,7}, porosidades, áreas de predomínio hidrófilo devido ao fenômeno de separação de fases ^{5, 86}, regiões de retenção de água e solventes ⁸⁷ e a presença de monômeros residuais devido a influência negativa da água no processo de polimerização ^{18, 19}.

A presença de imperfeições torna a camada híbrida susceptível aos processos de degradação hidrolítica e enzimática ⁸⁸. Como consequência, a camada híbrida não apresenta estabilidade e compromete a longevidade das restaurações adesivas. Portanto, é necessário desenvolver estratégias que melhorem a qualidade e a durabilidade da união resina-dentina ^{21, 43}.

3.5 Mecanismos de Degradação da Camada Híbrida

A curto prazo, a união resina-dentina apresenta desempenho satisfatório ⁸⁹, porém, sofre deterioração durante a sua função na cavidade bucal ^{90, 91}. A degradação da camada híbrida resulta na redução da resistência de união e ineficiência do selamento dentinário ^{84, 85, 92-95}.

Até o presente momento, os reconhecidos mecanismos de degradação da camada híbrida são dois: (1) hidrólise do componente resinoso mediada por esterases e (2) hidrólise do colágeno por ação direta da água ou mediada por proteases dentinárias, MMPs e CATs ^{14, 21, 43, 94, 96}. Respectivamente, esses mecanismos são referidos como degradação hidrolítica e degradação enzimática.

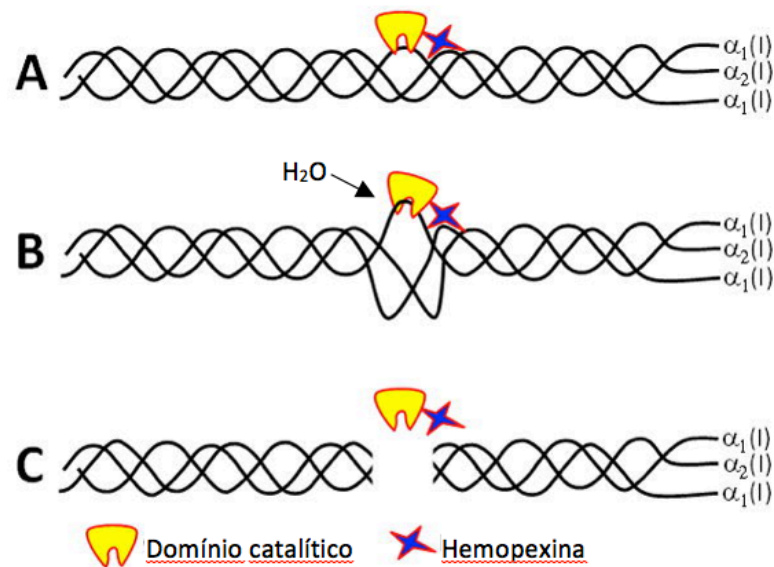
Compósitos resinosos são suscetíveis a hidrólise mediada por esterases devido a presença de grupos éster expostos na matriz monomérica ^{16, 97}. Esterases são classificadas como hidrolases e estão presentes em diversos tecidos humanos, além de serem produzidas por microrganismos ¹⁶. Na cavidade bucal, as fontes produtoras dessas enzimas são as glândulas salivares, o epitélio gengival e os processos inflamatórios ^{97, 98}. A saliva humana contém esterase do tipo colesterol (CE) e pseudocolinesterase (PCE) em níveis suficientes para degradar compósitos e a interface dente-material restaurador ⁹⁸. Bisfenol A-glicidil metacrilato (bisGMA) e

triétilenoglicol dimetacrilato (TEGDMA), principais monômeros presentes em compósitos, são particularmente susceptíveis a ação de esterases^{97, 98}.

Colágeno é o principal componente orgânico da camada híbrida. Idealmente, todo o colágeno exposto pelo condicionamento ácido da superfície da dentina deveria ser protegido pelo polímero formado após a fotoativação do adesivo dentinário. Entretanto, como descrito anteriormente, a completa impregnação da dentina desmineralizada por monômeros resinosos é impraticável e fibrilas de colágeno desprovidas de proteção permanecem expostas no interior da camada híbrida^{3, 7}. Essas fibrilas são susceptíveis a hidrólise, pela ação direta da água, e mediada pelas proteases dentinárias, denominada de degradação enzimática^{10, 14, 15, 72, 81, 99}.

O mecanismo básico de degradação do colágeno por MMPs está representado na Figura 2, modificada por Tjäderhane et al.⁴³ (2013), a partir do trabalho de Nagase e Fushimi¹⁰⁰ (2008). Brevemente, o domínio catalítico das MMPs se liga a sítios específicos do colágeno. Entretanto, essas proteases são incapazes de clivar a molécula de colágeno na forma de tripla hélice, uma vez que o diâmetro dessa molécula é três vezes maior (~ 1,5 nm) do que a pequena abertura do sítio ativo (~ 0,5 nm). Assim, MMPs devem primeiro desenovelar as cadeias alfa para que cada cadeia seja clivada individualmente pela inclusão de uma molécula de água. O produto final da hidrólise mediada por MMPs é a quebra da molécula de colágeno em dois fragmentos que consistem de 1/4 e 3/4 do comprimento da molécula. Portanto, proteases, incluindo as dentinárias, são dependentes da água para exercerem sua função de quebra do colágeno, e por essa razão, são classificadas como hidrolases^{43, 61, 101}.

Figura 2 – Ilustração do mecanismo básico da degradação do colágeno por metaloproteinases da matriz (MMPs).



Fonte: Tjäderhane et al.^{43, p. 27} (2013).

3.6 Estratégias para Melhorar a Estabilidade da Camada Híbrida

A degradação das fibrilas de colágeno e dos componentes resinosos levam à destruição da camada híbrida^{90, 91, 102} e à perda da resistência da união resina-dentina ao longo da vida útil da restauração¹⁰³⁻¹⁰⁵. Segundo Tjäderhane et al.¹⁰ (2015), a durabilidade da camada híbrida depende da resistência individual de seus componentes aos mecanismos de degradação. Portanto, estratégias que visam aumentar a estabilidade desse biocomposto atuam na melhoria das propriedades mecânicas do colágeno e na formação de polímeros de melhor qualidade.

A técnica de adesão à dentina saturada com etanol (*ethanol-wet bonding*), por exemplo, tem por objetivo favorecer a infiltração da dentina condicionada por monômeros hidrófobos, os quais formam cadeias poliméricas mais resistentes a hidrólise^{17, 106, 107}. O mesmo princípio norteia a estratégia denominada adesão à dentina saturada por DMSO (dimetil sulfóxido), um solvente orgânico aprótico e polar que dissolve compostos polares e apolares. Adicionalmente, esse solvente aumenta a umectabilidade da dentina condicionada e, conseqüentemente, favorece a infiltração monomérica^{59, 108}.

Estratégias que visam melhorar a resistência do colágeno aos processos de degradação incluem a utilização de inibidores enzimáticos^{34, 59, 88, 90, 91, 105, 109-111}, de soluções remineralizantes^{112, 113} e de agentes promotores de ligações cruzadas^{29, 35, 88, 110, 114, 115 21, 28, 91, 116}.

O potencial anti-enzimático da clorexidina sobre proteases dentinárias foi demonstrado pela primeira vez por Pashley et al.⁷² (2004). Atualmente, vários estudos realizados in vivo confirmaram que a saturação da dentina condicionada com clorexidina previamente a aplicação do sistema adesivo resulta na formação de camadas híbridas mais estáveis longitudinalmente^{90, 103, 105}. Embora o mecanismo de inativação de MMPs exercido pela clorexidina não seja conhecido, sugere-se que, devido a sua propriedade quelante, esse agente remova cálcio e zinco dessas enzimas, que são metais essenciais para a manutenção da estrutura terciária da proteína e funcionamento do sítio ativo, respectivamente⁴³. A clorexidina também é eficiente na inibição de CATs, e seu mecanismo de ação sobre essas proteases já foi elucidado¹¹⁷. Porém, tem sido demonstrado que os benefícios proporcionados pela utilização da clorexidina não são duradouros¹⁰³, provavelmente devido a ausência de interação química entre as moléculas de clorexidina e as de colágeno. Uma outra limitação da clorexidina é a sua atuação exclusiva como inibidor inespecífico de proteases, não exercendo efeito direto sobre as fibrilas de colágeno e sua resistência aos processos de degradação^{103, 118}.

3.7 Biomodificação da Matriz Dentinária por Agentes Promotores de Ligações Cruzadas (*cross-linkers*)

Agentes promotores de ligações cruzadas (do inglês “cross-linkers”) apresentam potencial de induzir novas ligações no interior das moléculas de colágeno (intramoleculares), entre essas moléculas (intermoleculares) e entre fibrilas de colágeno (interfibrilares)¹¹⁶. Essas novas ligações são denominadas exógenas ou induzidas, para permitir a sua diferenciação das ligações cruzadas endógenas (Figura 1), estabelecidas durante a collagenogênese e a formação dos tecidos a base de colágeno. Esse processo, conhecido como biomodificação ou reticulação do colágeno, resulta em aumento das propriedades mecânicas do colágeno e dos tecidos com alto conteúdo dessa proteína, como módulo de elasticidade, resistência máxima à tração e resistência à desnaturação térmica^{25, 27-30, 34, 115, 116}.

Adicionalmente, agentes promotores de ligações cruzadas também são potentes inibidores de proteases, incluindo MMPs e CATs^{14, 32, 34, 83, 95, 110, 119}. Como mencionado anteriormente (Figura 2), MMPs não são capazes de clivar a molécula de colágeno em sua forma de tripla hélice devido a pequena abertura de seu sítio ativo (~0,5 nm) em comparação ao diâmetro da molécula (~1,5 nm). Para tanto, essas proteases precisam desenovelar cada cadeia alfa e então quebrá-la individualmente pela inclusão de uma molécula de água^{21, 100}. Ademais, precisam apresentar motilidade espacial para que consigam acoplar o sítio ativo presente no domínio catalítico na área específica do substrato. Pois bem, da mesma forma que agentes promotores de ligações cruzadas induzem a formação de ligações adicionais na molécula de colágeno aumentando a sua rigidez^{25, 27-30, 34, 115, 116}, também induzem a formação de ligações em outras proteínas, e dentre elas, as proteases dentinárias. Dessa forma, essas proteases enrijecidas têm dificuldades para o acoplamento do seu sítio ativo e/ou para a separação das cadeias alfa que compõem a molécula de colágeno.

De acordo com a sua natureza, os agentes promotores de ligações cruzadas podem ser de origem sintética ou natural³⁵. EDC [*1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida*] e aldeídos, como o glutaraldeído, são os agentes sintéticos mais investigados, enquanto polifenóis, como as proantocianidinas (PACs), representam os agentes naturais de maior interesse³⁵.

Glutaraldeído é um dialdeído que apresenta grande afinidade por grupos amina livres presentes em aminoácidos, formando ligações do tipo bases de Schiff^{36, 120}. Essa reação ocorre principalmente entre os grupos amina dos resíduos de lisina e hidrolisina das fibrilas de colágeno, tornando essas fibrilas mais resistentes à degradação por proteases endógenas e collagenases de origem bacteriana^{29, 121-123}. A aplicação de soluções de glutaraldeído sobre a dentina condicionada resulta em aumento significativo do módulo de elasticidade da matriz e da sua resistência à degradação^{34, 85, 124}. Ainda, foi demonstrado que o efeito desse agente sobre a rigidez da matriz dentinária não é reversível pela simples hidratação com água¹²⁴. A utilização desse agente como coadjuvante no processo de adesão a dentina, além de não interferir negativamente na resistência de união imediata, produz interfaces mais estáveis longitudinalmente^{84, 85}. De fato, o tratamento da dentina condicionada com uma solução de glutaraldeído a 5% aumentou significativamente a resistência

de união imediata ¹²⁵ e viabilizou a secagem da dentina condicionada sem detrimento a essa resistência ¹²⁶.

Gluma Desensitizer é um dessensibilizante dentinário disponível comercialmente, que contém 5% glutaraldeído, 35% HEMA (hidroxietil metacrilato) e água como principais componentes ³⁶. Seu mecanismo de ação é a coagulação de proteínas presentes no fluído dentinário, principalmente a albumina sérica, resultando no fechamento dos túbulos expostos e no reestabelecimento da hidrodinâmica do tecido dentinário ¹²⁷. Mesmo na presença de HEMA, o potencial de inibição de MMPs endógenas do Gluma Desensitizer é comparável ao potencial de uma solução de 5% glutaraldeído ^{28, 36} e a sua utilização no protocolo de adesão estabiliza a união resina-dentina ²⁷. Entretanto, ainda existe preocupação quanto aos possíveis efeitos biológicos da utilização de glutaraldeído, embora existam evidências de ausência de citotoxicidade transdentinária sobre células do tipo odontoblasto ²⁶.

A biomodificação da matriz de dentina por proantocianidinas melhora sobremaneira a sua resistência mecânica, e contra a degradação promovida por collagenases bacterianas e por proteases endógenas (MMPs) ^{29, 30, 128, 129}. Proantocianidinas são compostos ricos em polifenóis, amplamente disponíveis em frutas, legumes, nozes, sementes e flores ¹³⁰ e a atividade dos extratos obtidos dessas fontes naturais depende da complexidade da estrutura, estereoquímica e conteúdo dos compostos bioativos ¹³¹⁻¹³³.

O extrato produzido a partir da semente da espécie de uva *Vitis vinífera* investigado no presente estudo, contém 95% de proantocianidinas, como epicatequina, galocatequina, epigallocatequina (proantocianidinas monoméricas), procianidinas diméricas e procianidinas triméricas. Quando aplicado sobre a matriz dentinária condicionada, o GSE interage com o colágeno induzindo a formação de ligações covalentes, iônicas e de hidrogênio, estabilizando a matriz ¹³⁴. Além disso, por ocultar os locais de clivagem do colágeno dentinário, o GSE exibe efeito inibitório sobre proteases dentinárias ^{130, 135}, como MMP-2, MMP-8, MMP-9 ^{32, 119}, CTA-K e CAT-B ³².

O aumento da resistência mecânica da matriz de dentina tratada com GSE é tão efetivo a ponto de contrapor os danos causados pela sua secagem excessiva com ar, permitindo um desempenho inicial da união resina-dentina comparável ao da adesão a dentina úmida (*wet bonding technique*) ²². Assim, a técnica de adesão

seca a dentina biomodificada (*cross-linked dry bonding*) deve ser investigada como mais uma estratégia para melhorar a estabilidade da camada híbrida.

4 MATERIAL E MÉTODOS

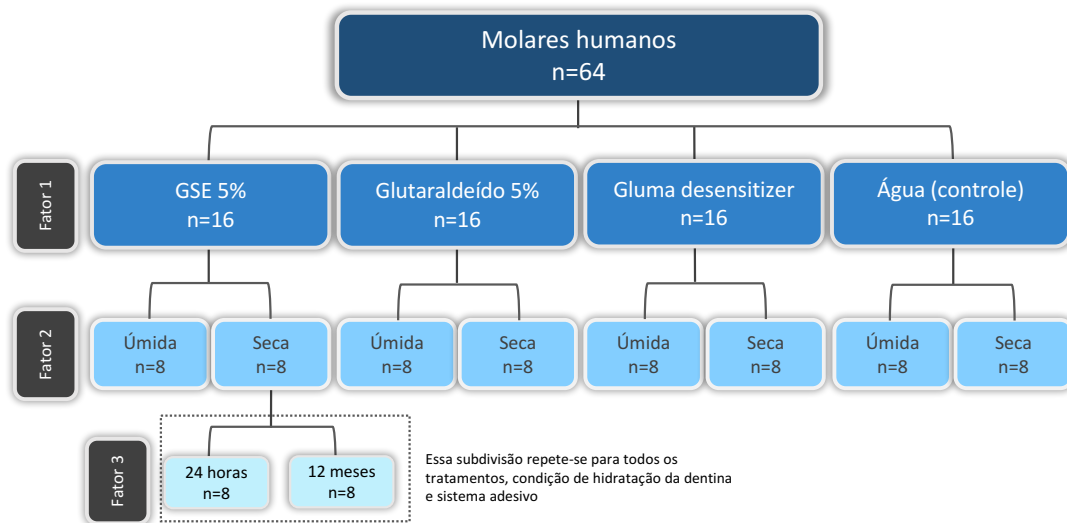
4.1 Aspectos Éticos

Para o desenvolvimento do estudo, uma coleção de 96 molares humanos hígidos foi regularizada junto ao Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr, e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da mesma instituição (ANEXO A). Assim que coletados, os dentes foram lavados abundantemente em água e limpos com gaze para permitir a inspeção visual. Foram selecionados dentes íntegros e sem alteração de cor indicativa de cárie ou hipoplasia/hipomineralização do esmalte. Os dentes selecionados foram submetidos a profilaxia com pedra pomes em água, lavados copiosamente, armazenados em timol 0,1% e mantidos em refrigerador à 4-5 °C até o momento de sua utilização.

4.2 Delineamento Experimental para o Ensaio Mecânico de Microtração

Dos 96 molares humanos hígidos coletados, sessenta e quatro foram utilizados para avaliar a estabilidade mecânica de interfaces produzidas sobre a dentina biomodificada e seca. Esses dentes foram progressivamente distribuídos nos grupos dessa fase do estudo, conforme ilustrado na Figura 3. Foram considerados fatores de variação (variáveis independentes): (Fator 1) tratamento da dentina condicionada (em 4 níveis), (Fator 2) condição de umidade da dentina (em 2 níveis) e (Fator 3) período de envelhecimento (em 2 níveis), sendo que este último será considerado como variável de medidas repetidas. Dessa forma, ao final do experimento, cada grupo foi composto de 8 dentes, uma vez que o dente foi considerado a unidade experimental para o ensaio de microtração (Figura 3). Além da resistência de união, também foi variável resposta (variável dependente) dessa fase do estudo, o tipo de fratura ocorrida após o ensaio mecânico de microtração. Entretanto, essa última variável foi analisada qualitativamente, e o espécime (“palito”) foi a unidade experimental.

Figura 3 – Fluxograma do delineamento experimental para o ensaio mecânico de microtração. Foram fatores de variação do estudo, o tratamento da dentina condicionada (Fator 1), a condição de umidade da dentina (Fator 2) e o período de envelhecimento (Fator 3).



Fonte: Elaboração própria.

4.3 Obtenção da Superfície de Dentina

Com auxílio de um disco diamantado acoplado a uma cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buheler, Lake Bluff, IL, EUA), o terço oclusal da coroa dentária foi removido por meio de um corte no sentido transversal da coroa, resultando em uma superfície plana de dentina, circundada em sua periferia por esmalte. Essa superfície foi examinada em lupa estereoscópica (Modelo SZX7, Olympus, São Paulo, Brasil) para inspecionar a inexistência de restos de esmalte dentário sobre a dentina. Caso o esmalte ainda estivesse presente recobrindo alguma área da dentina, a superfície foi manualmente desgastada com lixa de carbeto de silício de granulação 320 e novamente inspecionada na lupa até que todo esmalte tenha sido removido. Finalmente, todas as superfícies de dentina foram abrasionadas manualmente em lixa de granulometria 320 umedecida com água, por 30 segundos, para que a smear layer fosse produzida pelo mesmo instrumento. Uma vez obtidas as 64 superfícies planas em dentina, os dentes foram aleatoriamente divididos em quatro grupos (n=16) de acordo com o tratamento da dentina condicionada (Figura 3).

4.4 Tratamento da Dentina Prévio a Aplicação do Sistema Adesivo

As superfícies de dentina foram condicionadas com ácido fosfórico 35% (Ultradent Products INC, South Jordan, Utah, EUA), por 15 s, seguido de lavagem abundante com spray ar/água por 10 segundos e secagem com papel absorvente para a manutenção da superfície de dentina úmida. Então, a dentina condicionada foi submetida aos tratamentos apresentados na Figura 3. Detalhes dos agentes utilizados nesses tratamentos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Princípio ativo, fabricante, mistura e pH das formulações utilizadas como cross-linkers.

Grupo	Princípio ativo	Fabricante	Mistura/pH
GD 5%	Glutaraldeído	Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, EUA	- 0,5 mL de GD 50% - 4,5 mL de água deionizada - pH 6,4
GSE 5%	Extrato rico em proantocianidinas (extraído da semente da espécie <i>Vitis vinífera</i>)	Shaanxi Sinuot Biotech Co. Ltd., Shaanxi, China	- 0,25 g GSE - 4,75 mL de água deionizada - 0,25 mL de etanol - pH=5,5
Gluma® Desensitizer	HEMA (25-50%) Glutaral (5-10%)	Heraeus Kulzer GmbH (Hanau, Alemanha)	- Pronto para uso - pH=4,0

* pH da água deionizada = 6,2; HEMA: 2-hidroxietil metacrilato

Fonte: Elaboração própria.

Vinte microlitros (20 µL) de um extrato rico em proantocianidinas a 5%

(GSE, n=16 dentes) ou glutaraldeído 5% (GD, n=16 dentes) foram aplicados sobre a superfície de dentina condicionada, com uma pipeta. A solução foi mantida sobre a superfície por 60 segundos e então foi lavada com 5 mL de água deionizada. Gluma® Desensitizer (Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Alemanha) foi utilizado, segundo as recomendações de seu fabricante, em 16 dentes. Assim, 20 µL do produto foram aplicados sobre a dentina condicionada e mantidos sem agitação por 60 segundos. Em seguida, a dentina foi delicadamente seca com jato de ar por 5 segundos à 10 cm de distância da superfície e então lavada com 5 mL de água deionizada. Por fim, no grupo controle, foram aplicados 20 µL de água deionizada sobre a superfície condicionada com ácido fosfórico, mantidos por 60 segundos. Todos os demais passos realizados nos grupos anteriores foram reproduzidos no grupo controle.

A partir dessa etapa, os dentes pertencentes a cada grupo de tratamento foram subdivididos de acordo com a condição de umidade da dentina. Em metade dos dentes (n=8) a dentina foi mantida úmida pela remoção do excesso da água utilizada para a lavagem dos produtos com papel absorvente. Na outra metade (n=8), a superfície de dentina foi fisicamente desidratada pela aplicação de um constante jato de ar por 60 segundos, com a seringa posicionada à 10 centímetros da superfície da dentina.

4.5 Aplicação do Sistema Adesivo

O sistema adesivo Optibond S (Kerr Corporation; Orange, CA, EUA; Tabela 2) foi utilizado segundo as recomendações do seu fabricante. Com o auxílio de um *microbrush*, o adesivo foi aplicado sobre toda a superfície de dentina, com movimentos contínuos sob leve pressão durante 15 segundos. Em seguida, a superfície foi seca com jato de ar por 3 segundos e o adesivo fotoativado por 20 segundos. Para esse fim, foi utilizado o aparelho de luz LED Radium Plus (SDI Limited, Bayswater, Victoria, Austrália), cuja irradiância foi avaliada com auxílio de um radiômetro (Radium Plus, SDI Limited, Bayswater, Victoria, Austrália, 800 ± 10 mW/cm²) imediatamente antes de seu uso.

Tabela 2 – Informações sobre o sistema adesivo.

Nome comercial	Fabricante	Classificação	Principais componentes	Lote da fabricação
Optibond S®	Kerr Corporation; Orange, CA, EUA	Condiciona e lava de 2 passos*	Condicionador: ácido fosfórico	6032617
			BIS-GMA, HEMA, GDM, GPDM, sílica, vidro de bário, canforoquinona, pH 2,7	
			Solvente: Etanol	

* Também denominado: convencional simplificado, convencional monocomponente e *etch-and-rinse* de 2 passos;

Abreviaturas. **BIS-GMA**: Bisfenol A glicidil metacrilato; **HEMA**: Hidroxietil metacrilato; **GDM**: Glicerol dimetacrilato ; **GPDM**: glicerol fosfato dimetacrilato.

Fonte: Elaboração própria.

Finalizada a aplicação do sistema adesivo, foi confeccionado um bloco de resina composta (Filtek Z350, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) na cor A 3,5. Três incrementos de 1 mm, cada um deles fotoativado por 20 segundos, foram sequencialmente acrescentados e os dentes foram então armazenados por 24 horas imersos em água destilada à 37 °C.

4.6 Obtenção dos Espécimes para o Ensaio Mecânico de Microtração

Cada dente restaurado foi fixado em base de madeira com auxílio de godiva de baixa fusão e levado a cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA) para ser seccionado transversalmente na altura do primeiro terço radicular com disco de diamante de 0,3 mm de espessura (Diamond Wafering Blade, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA), sob constante irrigação. Em seguida, a porção coronária foi posicionada na máquina de tal forma que a interface adesiva

ficou perpendicular a face de corte do disco diamantado. Cortes seriados com 0,9 mm de espessura foram realizados, iniciando-se junto a uma das faces proximais até a face oposta. Após rotação do dente em 90 graus, uma nova série de cortes foi feita, também com 0,9 mm de espessura. Ao final, foram obtidos espécimes em forma de paralelogramos (palitos) com área transversal de secção de aproximadamente $0,81 \text{ mm}^2$.

Todos os espécimes foram inspecionados em lupa estereoscópica com aproximadamente 30 vezes de aumento. Aqueles que apresentaram defeitos como bolhas ou irregularidades nas proximidades da união resina-dentina foram excluídos da amostra. Os espécimes selecionados tiveram sua área adesiva individualmente mensurada com paquímetro digital (Mod. 500- 144b, Mytutoyo Sul Americana Ltda., SP, BR) com resolução de 0,01 mm.

4.7 Armazenamento dos Espécimes (Envelhecimento)

Os espécimes obtidos de cada dente foram aleatoriamente divididos em 2 grupos de acordo com o tempo de armazenamento. Desta forma, um grupo de espécimes foi tracionado imediatamente após a sua obtenção e o outro grupo após 12 meses de armazenamento em solução semelhante à saliva (KCl, KSCN, Na_2SO_4 , HEPES, NH_4Cl , CaCl_2 , NaHCO_3 e ZnCl_2 , pH 7,4), a 37 °C e agitação constante. A saliva não foi trocada durante o período de 12 meses e seu pH foi mensalmente monitorado com auxílio de um micro pH eletrodo (Orion™ 9110DJWP Double Junction pH Electrode, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

4.8 Ensaio Mecânico de Microtração

O ensaio mecânico de microtração foi realizado em máquina de ensaios mecânicos (DL-Digital Line, EMIC, Paraná, Brasil) ajustada para forças de tração com célula de carga de capacidade máxima de 200N. Os espécimes foram individualmente fixados a um dispositivo metálico com adesivo de cianoacrilato associado a um acelerador à base de cianoacrilato (Super Bonder Gel e Ativador 7456, Henkel Loctite Ltda, São Paulo, Brasil). Este dispositivo metálico foi adaptado à máquina de ensaios mecânicos para o teste de microtração, com velocidade de 1,0 mm/min. Os movimentos de tração foram iniciados por meio de um programa computadorizado específico (Tesc-Test Script, EMIC Equipamentos

de ensaio Ltda., São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) até que o espécime fosse rompido, e os valores de carga máxima registrados (N) foram divididos pela área de cada espécime (mm^2) para a obtenção dos valores em megapascal (MPa). Às fraturas prematuras foi atribuído valor 0 (zero) de resistência de união.

4.9 Análise das Fraturas

Após o ensaio mecânico de microtração, as metades obtidas para cada espécime foram analisadas em estereomicroscópio (Mod SZX7, Olympus, São Paulo, Brasil), em aumentos que variaram de 10 a 30 vezes, para a determinação do tipo de fratura. As fraturas foram classificadas em: coesiva da resina ou dentina, quando a fratura ocorreu exclusivamente na resina ou na dentina; adesiva, quando a fratura ocorreu na interface adesiva; ou mista, quando a fratura ocorreu na interface, porém com envolvimento de um ou dos dois substratos (dentina e resina).

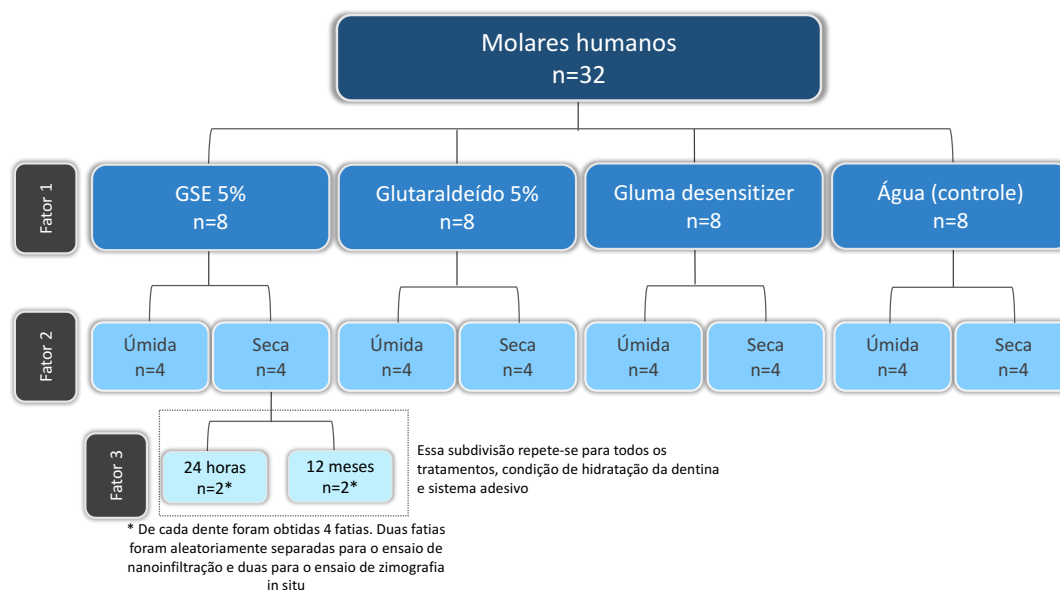
4.10 Delineamento Experimental para os Ensaios de Nanoinfiltração e Zimografia in situ

Trinta e dois dentes foram utilizados para os ensaios de nanoinfiltração e zimografia in situ. Os tratamentos e a divisão dos dentes nos grupos do estudo foram os mesmos, exceção feita ao número de dentes por grupo (Figura 3). Para esses protocolos, ao invés de espécimes na forma de palitos, como os produzidos para o ensaio mecânico de microtração, foram obtidas fatias. Com a mesma cortadeira metalográfica, cortes perpendiculares à união adesiva foram iniciados junto a uma das superfícies proximais e consecutivamente realizados até que a superfície oposta fosse atingida. A distância entre os cortes foi de 0,5 mm adicionados da espessura do disco diamantado (0,3 mm). Das fatias obtidas de cada dente, foram selecionadas apenas as quatro centrais. Duas dessas fatias foram utilizadas para o protocolo de nanoinfiltração e duas para o ensaio de zimografia in situ (Figura 4). Para esses experimentos, a fatia (espécime) foi a unidade experimental, e o número de repetições por grupo, considerando-se a interação tratamento da dentina condicionada vs. umidade da dentina vs. período de envelhecimento, foi de $n=4$ para cada protocolo. Dois espécimes foram avaliados após imediatamente e dois após 12 meses de envelhecimento.

4.11 Protocolo de Nanoinfiltração e Avaliação em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As fatias de 0,5 mm obtidas de cada grupo para o período imediato foram submetidas ao protocolo de nanoinfiltração, como descrito por Tay et al.¹³⁶ (2002). Afim de reidratar os espécimes e evitar artefatos devido a dessecação, de acordo com Agee et al.¹³⁷ (2003), os mesmos foram mantidos em água destilada por 20 minutos e posteriormente imersos em solução marcadora de nitrato de prata amoniacal (pH 9,5) na ausência de luz por 24 horas. Em seguida, foram lavados abundantemente com água deionizada por 5 minutos e imersos em solução reveladora (Revelador Kodak, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) por 8 horas sob luz fluorescente, resultando na redução dos íons prata em grãos de prata metálica dentro dos espaços vazios presentes ao longo da interface. Os espécimes foram lavados em água corrente por 2 min e polidos com sequência de lixa de carbetto de silício (400, 600, 1200, 2000 e 4000). Nas lixas 400 e 600, as fatias foram polidas durante 1 min, e nas lixas 1200, 2000 e 4000 foram polidas por 2 min em cada lixa. Essas lixas estavam constantemente molhadas com água deionizada. Após a lixa 4000, as fatias foram abundantemente enxaguadas por 3 min com jato de água deionizada, com auxílio de uma pisseta. Em seguida foram secas com papel absorvente, montadas em *stubs* metálicos e armazenadas em dessecadora contendo sulfato de cálcio e sílica por 24 horas. Após esse período, foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura e imagens representativas da interface foram obtidas em 1500 vezes de aumento.

Figura 4 – Fluxograma do delineamento experimental para os ensaios de nanoinfiltração e zimografia in situ. Foram fatores de variação do estudo, o tratamento da dentina condicionada (Fator 1), a condição de umidade da dentina (Fator 2) e o período de envelhecimento (Fator 3). A fatia foi considerada a unidade experimental desses protocolos.



Fonte: Elaboração própria.

4.12 Zimografia in situ

O ensaio de zimografia in situ (ISZ) tem por objetivo avaliar a presença de formas ativas e latentes de enzimas proteolíticas em amostras biológicas¹³⁸. Este ensaio é baseado na degradação de um substrato gelatinoso por enzimas gelatinolíticas presentes na amostra de tecido dentinário. Tal degradação é passível de detecção por meio de microscopia ótica ou de fluorescência, dependendo do substrato utilizado¹³⁹. Para tanto, as amostras foram lixadas manualmente com lixas de granulação 1200 e 4000 até atingir a espessura entre 0,3 e 0,4 mm. Em seguida, cada amostra foi aderida em uma lâmina de acrílico utilizando SuperBonder® (Henkel Ltda., São Paulo – SP), de forma a evitar a formação de bolhas entre o espécime e a superfície de acrílico, e então armazenados em água deionizada a 4°C por 24 horas.

A técnica de zimografia in situ foi realizada utilizando o kit EnzCheck® gelatinase/colagenase Assay Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). O substrato gelatinoso (EnzChek) foi diluído em tampão de diluição 1:8 (NaCl 150nM, CaCl₂ 5 mM, Tris-Hcl 50 nM, pH 8). A solução de gelatina para zimografia in situ foi preparada por meio da mistura de 10 µL da solução estoque de gelatina, 80 µL de

tampão de diluição e 10 μ L de anti-fade. A seguir, 50 μ L da solução gelatinosa contendo fluoresceína foram aplicados sobre os espécimes, os quais foram cobertos por uma lamínula de vidro e armazenados em estufa a 37°C, em 100% de umidade, na ausência de luz. Após o período de 24 horas as amostras foram avaliadas em microscópio de fluorescência DM 5500 (ex: 498nm e em: 530nm) (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), para possibilitar a determinação da degradação da gelatina, que promove a liberação de fluoresceína, gerando um substrato fluorescente indicativo da atividade de enzimas gelatinolíticas/colagenolíticas. Imagens foram obtidas utilizando o canal verde, com aumento de $\times 10$ (lente objetiva) e ganho de 1.1, e em seguida analisadas com o programa Image J (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA) em escala de cinza de 8bit, 34 a 2000 de contraste, e valor limite entre 28 a 30.

4.13 Análise Estatística

Uma vez que o conjunto dos dados de resistência de união apresentou distribuição normal (Kolmogorov-Smirnov, $p > 0,05$) e houve homogeneidade de variâncias entre os grupos (Levene, $p > 0,05$), esses dados foram submetidos ao teste de ANOVA a três critérios fixos, complementado pelo teste de ANOVA a dois critérios fixos e, finalmente, por testes de Tukey para a comparação dos grupos aos pares (Programa GraphPad 6.0, GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). As inferências estatísticas foram baseadas no nível de significância de 5%. A distribuição do tipo de fratura, e os resultados dos protocolos de nanoinfiltração e zimografia in situ foram analisados descritivamente.

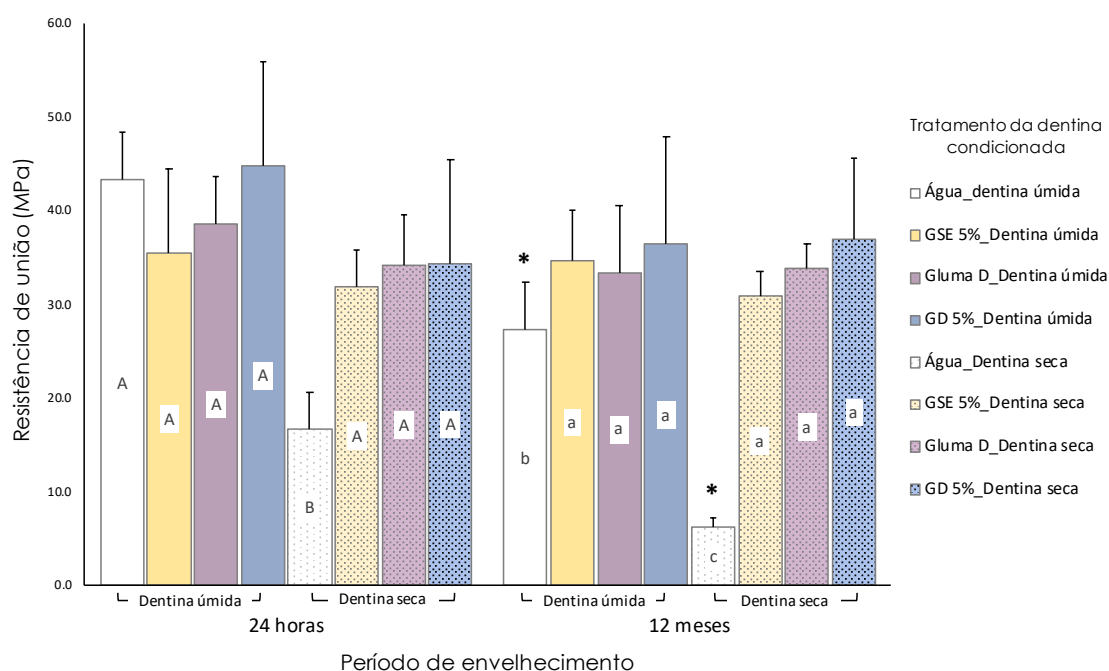
5 RESULTADO

5.1 Resistência de União

Os valores de resistência de união em função dos fatores tratamento da dentina condicionada e período de envelhecimento (24 horas ou 12 meses) estão apresentados na Figura 5. Sem a prévia biomodificação do colágeno, a resistência de união imediata foi significativamente reduzida em 61,7% quando o sistema adesivo foi aplicado sobre a dentina seca com ar ($27,3 \pm 2,5$ MPa) em comparação a dentina úmida (controle, $43,4 \pm 6,4$ MPa). A biomodificação da dentina condicionada com os agentes GSE ($35,5 \pm 8,9$ MPa), GD ($44,7 \pm 11,1$ MPa) e Gluma Desensitizer ($38,5 \pm 5,0$ MPa) não interferiu nos valores de resistência de união imediata quando a dentina foi mantida úmida antes da aplicação do adesivo. Entretanto, aumento da resistência de união foi observado quando o adesivo foi aplicado sobre a dentina seca com ar a qual havia sido previamente biomodificada por GSE ($31,9 \pm 3,9$ MPa), GD ($34,4 \pm 11,1$ MPa) ou Gluma Desensitizer ($34,1 \pm 5,5$ MPa), em comparação a dentina seca não biomodificada. Esses valores passaram a ser estatisticamente semelhantes aos valores obtidos para o grupo controle, ou seja, dentina não biomodificada porém mantida úmida antes da aplicação do adesivo. Assim, a biomodificação da dentina permitiu a sua secagem sem influência negativa na resistência de união imediata.

Após 12 meses de envelhecimento em solução do tipo saliva, redução significativa da resistência de união foi observada para ambos os grupos não biomodificados ($27,3 \pm 2,5$ MPa e $6,2 \pm 1,1$ MPa, para dentina úmida e seca, respectivamente). Essa redução foi de 37,1% quando a dentina foi mantida úmida, e de 37,3% quando a dentina foi seca com ar antes da aplicação do adesivo. Diferentemente, os valores de resistência de união dos grupos tratados com GSE, GD e Gluma Desensitizer mantiveram-se estáveis, ou seja, comparáveis aos valores imediatos tanto para a aplicação do adesivo sobre a dentina úmida quanto sobre a dentina seca com ar. Em nenhum dos períodos de envelhecimento e condição de hidratação da dentina foi identificada diferença de desempenho entre os agentes GSE, GD e Gluma Desensitizer.

Figura 5 – Resistência de união de interfaces produzidas pela aplicação de um adesivo convencional de dois passos (Optibond S) sobre a dentina condicionada com ácido fosfórico sem biomodificação (dentina tratada com água) ou previamente biomodificada por um extrato de sementes de uva a 5% (GSE), glutaraldeído a 5% (GD) ou Gluma Desensitizer. A resistência de união foi avaliada após 24 horas e 12 meses de envelhecimento das interfaces em solução do tipo saliva. Para cada período de envelhecimento, grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey, $p>0,05$). No período de 12 meses, o asterisco no topo da coluna indica redução estatisticamente significativa da resistência de união em comparação ao mesmo grupo no período de 24 horas. Médias e desvios-padrões, $n=8$.



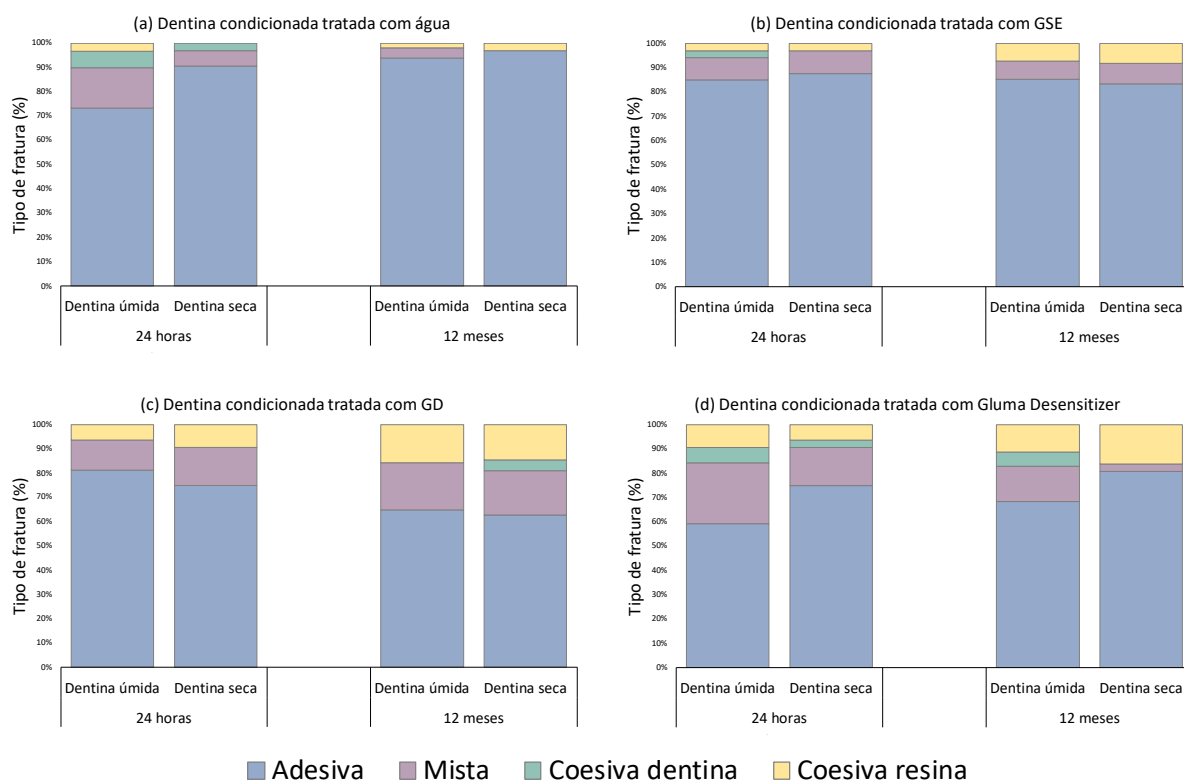
Fonte: Elaboração própria.

5.2 Distribuição dos Tipos de Fratura

As duas metades dos espécimes tracionados foram examinados em estereomicroscópico e a distribuição dos tipos de fratura observados para cada tratamento da dentina condicionada, em função da condição de hidratação da dentina e período de envelhecimento, está apresentada na Figura 6. Na ausência de biomodificação da dentina condicionada, as interfaces produzidas pela aplicação do adesivo sobre a dentina úmida e analisadas em 24 horas fraturaram predominantemente na interface adesiva (73,3%). O mesmo foi observado para interfaces produzidas sobre a dentina seca (90,6%). Após 12 meses de envelhecimento, quase que em sua totalidade, as interfaces falharam adesivamente (94% para a dentina úmida e 97% para a dentina seca) (Figura 6a). Esse padrão

não foi repetido nos grupos onde a dentina condicionada foi biomodificada com 5% GSE (Figura 6b), 5% GD (Figura 6c) ou Gluma Desensitizer (Figura 6d). O envelhecimento das interfaces produzidas sobre a dentina úmida ou seca quando da biomodificação do colágeno teve pouca influência na distribuição das fraturas, com exceção de um aumento do número de fraturas coesivas em resina.

Figura 6 – Distribuição das fraturas ocorrida, após realizado o ensaio mecânico de microtração.



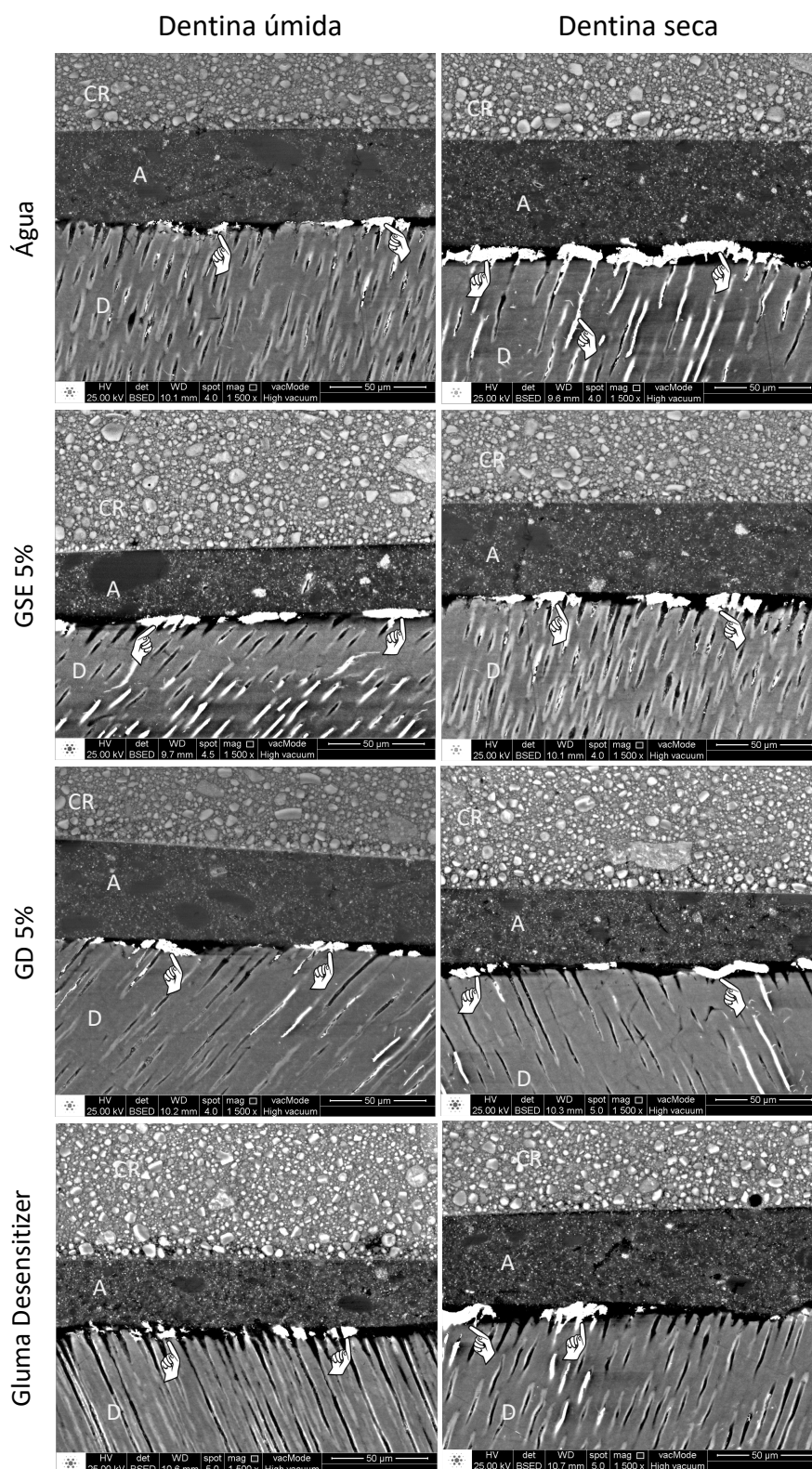
Fonte: Elaboração própria.

5.3 Nano infiltração

Íons prata foram observados em todas as interfaces adesivas, mesmo nas recém-produzidas. No período de 24 horas (Figura 7), a secagem da dentina condicionada com ar antes da aplicação do adesivo resultou em considerável aumento da infiltração de íons prata em comparação ao controle úmido (Figura 7). A biomodificação da dentina condicionada, além de não ter exercido influência na nano infiltração das interfaces produzidas sobre a dentina úmida, também reduziu essa ocorrência nas interfaces criadas pela aplicação do adesivo sobre a dentina

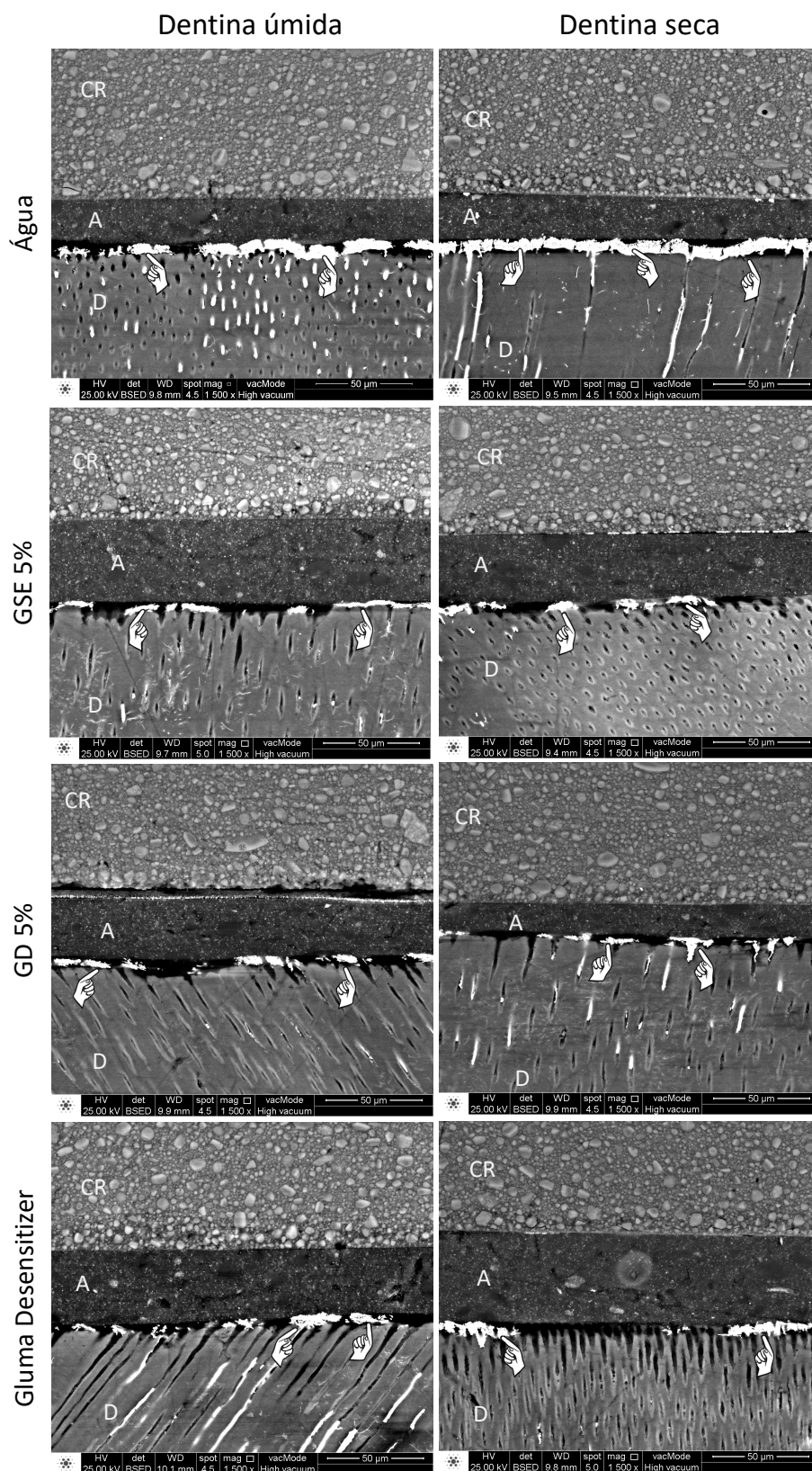
seca (Figura 7). Nessas interfaces, a infiltração de íons prata foi similar àquela observada nas interfaces dos espécimes de dentina úmida. Aumento de acúmulo de íons prata foi observado após 12 meses de envelhecimento das interfaces sem biomodificação da dentina condicionada, especialmente nas produzidas sobre a dentina seca (Figura 8). Por outro lado, o grau de nanoinfiltração nas interfaces produzidas sobre a dentina condicionada e biomodificada por GSE, GD ou Gluma foi semelhante ao observado no período de 24 horas, tanto para a dentina úmida como para a dentina seca com ar.

Figura 7 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de interfaces envelhecidas por 24 horas em solução do tipo saliva. O adesivo convencional de dois passos (Optibond S) foi aplicado sobre a dentina biomodificada por GSE a 5%, glutaraldeído 5% ou Gluma Desensitizer, e seca com ar por 60 segundos ou mantida úmida. CR: resina composta; A: camada de adesivo; D: dentina; Pointers: áreas de acúmulo de nitrato de prata. $\times 1.500$



Fonte: Elaboração própria.

Figura 8 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de interfaces envelhecidas por 12 meses em solução do tipo saliva. O adesivo convencional de dois passos (Optibond S) foi aplicado sobre a dentina biomodificada por GSE a 5%, glutaraldeído 5% ou Gluma Desensitizer, e seca com ar por 60 segundos ou mantida úmida. CR: resina composta; A: camada de adesivo; D: dentina; Pointers: áreas de acúmulo de nitrato de prata. $\times 1.500$

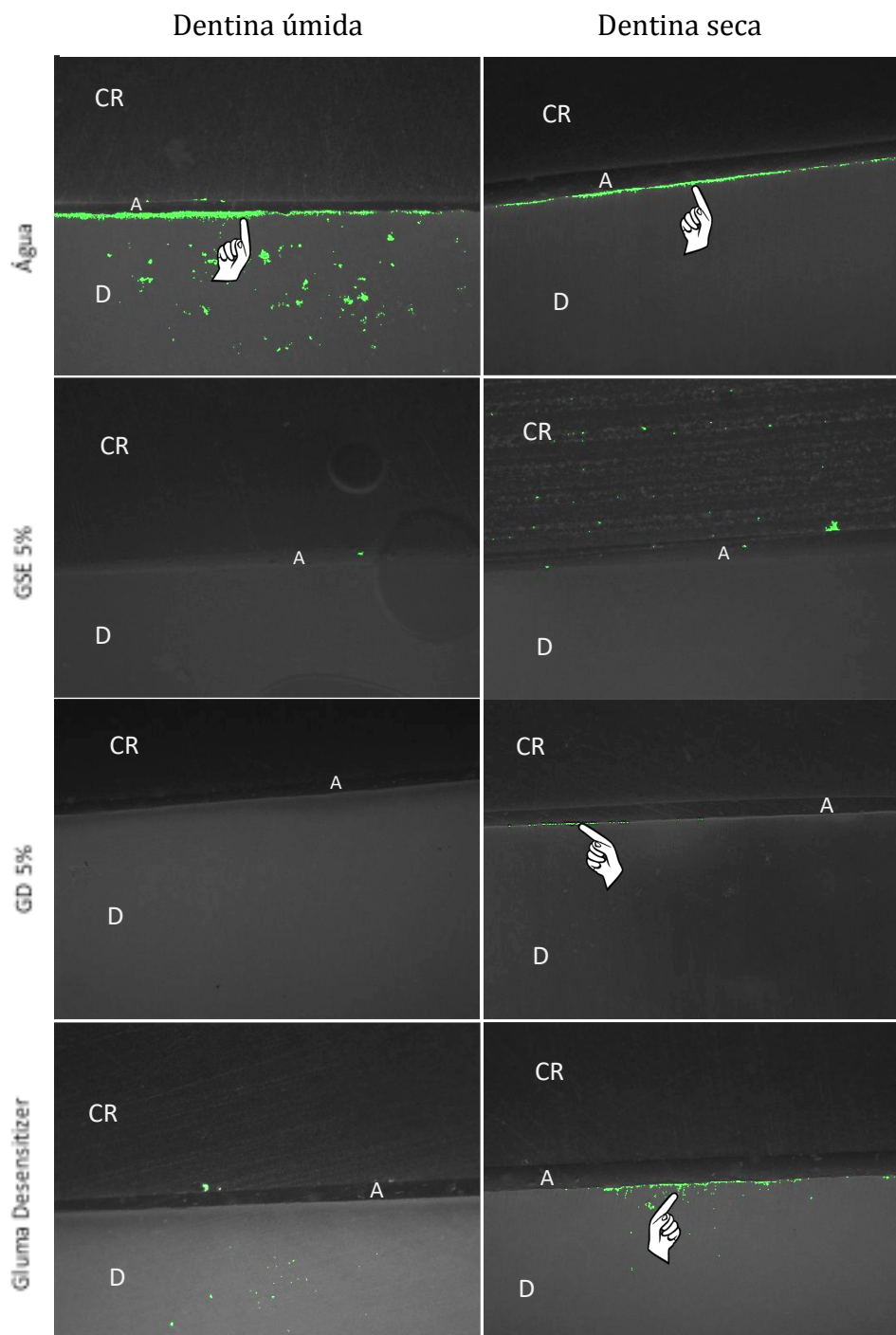


Fonte: Elaboração própria.

5.4 Atividade Proteolítica

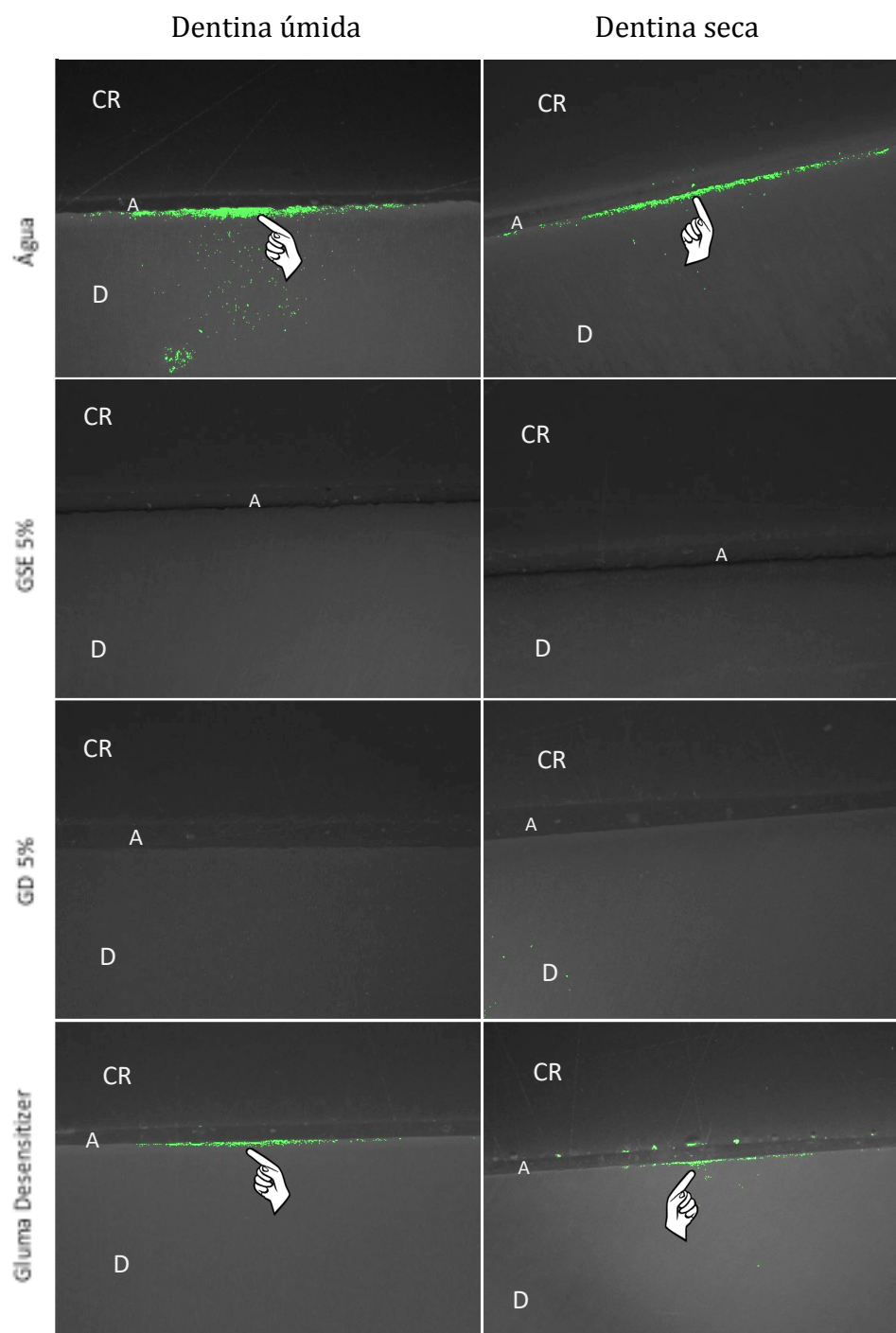
Emissão de fluorescência indicativa de atividade proteolítica foi detectada em todas as interfaces envelhecidas por 24 horas, pertencentes aos grupos onde a dentina condicionada recebeu apenas a aplicação de água (dentina não biomodificada), independente da condição de hidratação da dentina no momento da aplicação do adesivo. Dessa forma, a secagem da dentina condicionada não exerceu efeito inibitório sobre as proteases liberadas após o condicionamento ácido. Após 12 meses de envelhecimento, ainda havia atividade proteolítica nessas interfaces. Ao contrário, foi observada mínima ou nenhuma atividade proteolítica nas interfaces produzidas sobre a dentina biomodificada por GSE, GD ou Gluma Desensitizer, sem interferência quanto a condição de hidratação do substrato. A inibição das proteases dentinárias foi sustentada até o período de 12 meses. Entre os agentes promotores de ligações cruzadas, apenas interfaces produzidas sobre a dentina biomodificada por Gluma Desensitizer apresentaram um certo grau de atividade enzimática, em 24 horas e 12 meses. Entretanto, para os dois períodos de envelhecimento, a atividade foi inferior a observada para as interfaces sem biomodificação do colágeno. Imagens representativas da atividade proteolítica em interfaces produzidas pelos diferentes fatores do estudo, obtidas em microscópio de fluorescência, estão apresentadas nas Figuras 9 e 10, para os períodos de 24 horas e de 12 meses, respectivamente.

Figura 9 – Imagens de interfaces submetidas ao protocolo de zimografia in situ e analisadas em microscópio de fluorescência, após 24 horas de envelhecimento. O adesivo convencional de dois passos (Optibond S) foi aplicado sobre a dentina biomodificada por GSE a 5%, glutaraldeído 5% ou Gluma Desensitizer, e seca com ar por 60 segundos ou mantida úmida. A degradação da gelatina ligada a fluoresceína (FITC) por proteases libera esse cromóforo e possibilita a detecção do sinal de fluorescência. Portanto, a presença de fluorescência indica atividade proteolítica (*pointers*). CR: resina composta; A: camada de adesivo; D: dentina. $\times 10$



Fonte: Elaboração própria.

Figura 10 – Imagens de interfaces submetidas ao protocolo de zimografia in situ e analisadas em microscópio de fluorescência, após 12 meses de envelhecimento. O adesivo convencional de dois passos (Optibond S) foi aplicado sobre a dentina biomodificada por GSE a 5%, glutaraldeído 5% ou Gluma Desensitizer, e seca com ar por 60 segundos ou mantida úmida. A degradação da gelatina ligada a fluoresceína (FITC) por proteases libera esse cromóforo e possibilita a detecção do sinal de fluorescência. Portanto, a presença de fluorescência indica atividade proteolítica (*pointers*). CR: resina composta; A: camada de adesivo; D: dentina. $\times 10$



Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

A técnica de adesão a dentina úmida é a indicada quando sistemas adesivos convencionais de três ou dois passos são utilizados. Apesar do impacto negativo da presença de água na infiltração⁸⁷ e polimerização dos monômeros adesivos^{18, 19} a água é importante para a manutenção dos espaços interfibrilares produzidos pela remoção do conteúdo inorgânico quando do condicionamento com ácido fosfórico¹⁷. A tentativa de remoção da água pela simples evaporação com ar resulta em redução significativa da resistência de união²²⁻²⁴. A mesma interferência negativa da secagem da dentina condicionada sobre a resistência de união imediata foi observada no presente estudo, com redução de 62% do valor médio em comparação a dentina úmida. Adicionalmente, interfaces produzidas sobre a dentina seca apresentaram maior nanoinfiltração, demonstrando que a queda da resistência de união ocorreu devido ao elevado número de imperfeições da camada híbrida.

Após a lavagem do ácido fosfórico utilizado para desmineralizar a superfície da dentina, as fibrilas de colágeno desprovidas de seu reforço mineral são mantidas separadas pela presença da água, o que é fundamental para a infiltração dos monômeros resinosos. Nesse estado, a composição da dentina passa a ser, em peso, de 20% proteínas e 80% água e como o módulo de elasticidade da matriz de dentina é de apenas 3-5 Mpa^{17, 34}, a simples secagem com ar resulta no colapso das fibrilas²². A aproximação espacial das fibrilas de colágeno permite a formação espontânea de ligações de hidrogênio entre peptídeos de fibrilas vizinhas¹⁴⁰. Além do fechamento dos espaços interfibrilares para a infiltração dos monômeros resinosos, nesse momento, a rigidez da matriz dentinária (Young's modulus) aumenta consideravelmente, podendo chegar a 170 Mpa^{124, 141, 142}. Ligações de hidrogênio entre fibrilas de colágeno possuem uma energia coesiva de ligação de $14,8 \text{ (J/cm}^3\text{)}^{1/2}$ e para romper essa ligação, solventes devem apresentar um parâmetro de solubilidade para ligações de hidrogênio (δ_h) superior a esse valor. A água, por exemplo, apresenta $\delta_h=40,4 \text{ (J/cm}^3\text{)}^{1/2}$ (de acordo com os parâmetros de solubilidade de Hoy), fato este que explica porque a água é capaz de expandir em 100% a matriz de colágeno desidratada¹⁷. Em contrapartida, outros solventes presentes nas formulações de sistemas adesivos, como acetona [$11 \text{ (J/cm}^3\text{)}^{1/2}$] e etanol [$20 \text{ (J/cm}^3\text{)}^{1/2}$], apresentam δ_h inferior ou muito próximo de

14,8^{17, 143}.

O adesivo Optibond S utilizado nesse estudo contém etanol como solvente. Um adesivo livre de água foi selecionado para evitar que o solvente pudesse interferir na condição da dentina seca com ar. Entretanto, mesmo a aplicação de um adesivo contendo etanol e água não foi capaz de contrapor os efeitos negativos da secagem com ar da dentina condicionada²². Etanol apresenta parâmetro de solubilidade δ_h próximo ao valor necessário para romper as ligações de hidrogênio estabelecidas entre fibrilas de colágeno^{17, 143} e, portanto, sua capacidade de re-expandir a matriz colapsada é limitada. A matriz de dentina desidratada e subsequentemente saturada com etanol apresenta uma espessura de apenas 30% daquela observada para a matriz mantida saturada com água¹⁴³. Outros componentes do adesivo como BisGMA ($\delta_h=5,8$) e HEMA ($\delta_h=15,2$) não são capazes de re-expandir a matriz colapsada¹⁷. Além de reduzir em cerca de 62% o valor de resistência de união imediata em comparação a adesão a dentina úmida, interfaces produzidas pela aplicação do adesivo sobre a dentina seca com ar foram instáveis longitudinalmente. Após 12 meses de envelhecimento, a resistência de união média dessas interfaces foi 37% inferior a resistência de união imediata e a intensa infiltração de nitrato de prata observada nessas interfaces indica a deterioração da camada híbrida sofrida nesse período.

Agentes promotores de ligações cruzadas induzem a formação exógena de ligações de hidrogênio e ligações covalentes na molécula de colágeno (intramoleculares), entre moléculas (intermoleculares) e entre fibrilas vizinhas (interfibrilares), aumentando as propriedades mecânicas do colágeno e, consequentemente, dos tecidos com alto conteúdo dessa proteína^{25, 27, 28, 30, 85}. O módulo de elasticidade da matriz de dentina foi quase triplicado após a aplicação de uma solução de GD a 10% por 60 segundos²⁸. O aumento da rigidez da matriz dentinária pela aplicação de um extrato rico em proantocianidinas (GSE) foi capaz de contrapor os efeitos negativos promovidos pela secagem excessiva da dentina²². Da mesma forma, GSE, GD e Gluma Desensitizer foram capazes de tornar o colágeno mais resistente ao ponto da secagem da matriz biomodificada não exercer efeitos negativos sobre a resistência de união imediata. Os valores de resistência de união a dentina seca, quando a dentina foi biomodificada previamente com os diferentes agentes, foi comparável aos valores obtidos para a

dentina mantida úmida ²². Para essa condição de hidratação, nenhum dos cross-linkers exerceu efeito sobre a resistência de união imediata, ou seja, os valores de todos os grupos foram comparáveis ao controle úmido sem biomodificação, e semelhantes entre si. Outros estudos também demonstraram que a biomodificação da dentina não influencia os valores de resistência de união imediata ^{27, 82, 84, 85, 95, 126, 144}.

Nanoinfiltração foi detectada em todas as fotomicrografias obtidas em MEV, ratificando as evidências anteriores de que camadas híbridas apresentam imperfeições desde o momento de seu estabelecimento ^{4-8, 90}. Entretanto, uma quantidade evidentemente maior de íons prata foi vista na união formada entre o sistema adesivo e a dentina seca, sem prévia biomodificação do colágeno. Uma vez aplicados os cross-linkers, a secagem da dentina não exerceu efeitos tão deletérios na união, e a quantidade de íons prata detectados passou a ser similar a das interfaces estabelecidas sobre a dentina úmida, independentemente da sua biomodificação ou não.

A despeito dos dados encorajadores observados para a resistência de união e nanoinfiltração imediata, a principal proposta do protocolo de adesão em análise é estabilizar as interfaces adesivas em longo prazo. Na ausência de biomodificação, redução significativa da resistência de união foi observada após 12 meses de envelhecimento. Essa redução foi em torno de 37% independentemente do grau de hidratação da dentina no momento da aplicação do adesivo. Uma vez que a porcentagem de redução da resistência de união foi semelhante entre os grupos de dentina úmida e dentina seca, sem biomodificação, sugerimos que, a despeito da redução significativa da resistência de união imediata em consequência da secagem da dentina, o menor conteúdo de água presente na dentina desmineralizada possa ter favorecido a infiltração de monômeros mais hidrófobos e ter minimizado o fenômeno de separação de fases ¹⁷. Em contrapartida, independente da condição de hidratação da dentina previamente a aplicação do adesivo, a utilização de GSE, GD e Gluma Desensitizer resultou em interfaces mecanicamente estáveis até 12 meses após o seu estabelecimento.

São dois os processos de degradação que afetam a estabilidade da camada híbrida, a degradação do conteúdo resinoso por esterases ¹⁶ e a degradação do colágeno por MMPs e CTAs residentes no próprio tecido ⁷². MMPs e CATs são classificadas como hidrolases por serem dependentes da água para efetivarem a

quebra do colágeno^{43, 61, 101}. Um dos benefícios da secagem da dentina condicionada seria limitar a disponibilidade de água para a ação das proteases dentinárias. Entretanto, os resultados do presente estudo demonstraram atividade proteolítica nas interfaces produzidas sobre a dentina seca, sem prévia biomodificação, refutando essa hipótese. De fato, a maior parte da água presente na dentina desmineralizada (entre 75-79%) está na forma livre, enquanto que 21 a 25% está ligada ao colágeno e, portanto, impossível de ser removida¹¹. Os resultados do presente estudo demonstram que a água residual após a secagem da dentina com ar por 60 segundos foi suficiente para viabilizar a ação das proteases dentinárias.

A biomodificação do colágeno dificulta a sua degradação enzimática. MMPs são incapazes de quebrar a molécula de colágeno na sua configuração de tripla hélice uma vez que o tamanho da abertura do sítio catalítico dessas enzimas (~0,5 nm) é menor do que o diâmetro da molécula de colágeno (~1,5 nm)^{21, 100}. Portanto, cada cadeia polipeptídica deve ser quebrada individualmente, e o aumento do número de ligações intramoleculares promovido pelos cross-linkers dificulta sobremaneira a separação dessas cadeias. Ademais, além de aumentar a rigidez da molécula de colágeno, os cross-linkers também aumentam o número de ligações cruzadas presentes nas MMPs e CTAs. Esse processo, dificulta a exposição do sítio ativo da enzima e o seu acoplamento no sítio receptor do substrato⁴³. Mesmo após 18 meses de envelhecimento, matrizes de dentina biomodificadas com diferentes extratos ricos em proantocianidinas foram mais resistentes à degradação por uma protease exógena (colagenase de *Clostridium histolyticum*) e por proteases endógenas do que matrizes não biomodificadas³⁰. Esses dados demonstram que as novas ligações cruzadas induzidas pela aplicação do cross-linker são estáveis longitudinalmente.

Portanto, além de serem eficientes promotores de ligações cruzadas, proantocianidinas, principais componentes ativos do GSE, e glutaraldeído são potentes inibidores de MMPs e CATs. Quando comparada a clorexidina, um comprovado inibidor de MMPs⁷² e de CATs¹¹⁷, proantocianidinas são mais eficientes na inibição de MMP-2, MMP-8, MMP-9, CAT B e CAT K³². A mesma superioridade foi demonstrada para uma solução de 5% glutaraldeído sobre a atividade total de MMPs³⁴.

Gluma Desensitizer (Kulzer GmbH, Hanau, Alemanha) é um dessensibilizante dentinário disponível comercialmente há mais de 20 anos, que contém 5% glutaraldeído, 35% HEMA (hidroxietil metacrilato) e água como principais componentes ³⁶. Seu mecanismo de ação contra a hipersensibilidade dentinária é a coagulação de proteínas presentes no fluido dentinário, principalmente a albumina sérica, resultando no fechamento dos túbulos expostos e no reestabelecimento da hidrodinâmica do tecido dentinário ¹²⁷. O fato de que a capacidade de inibição de MMPs endógenas do Gluma é comparável a apresentada pela solução de glutaraldeído a 5% ^{34, 36}, indica que a presença de HEMA não afeta sua ação anti-proteolítica. Assim como observado no presente estudo, a sua utilização no protocolo de adesão estabiliza a união resina-dentina ²⁷.

A zimografia *in situ*, associada a microscopia de fluorescência ou confocal a laser, é uma técnica validada para a identificação de atividade gelatinolítica em áreas específicas de tecidos biológicos e tem sido utilizada para evidenciar a atividade proteolítica da dentina mineralizada e desmineralizada ⁸⁰. Da mesma forma, essa técnica vem sendo utilizada para analisar a atividade proteolítica da união resina-dentina e o efeito de agentes e/ou técnicas adesivas sobre essa atividade ⁸²⁻⁸⁴. No presente estudo, este protocolo permitiu observar o efeito do GSE, GD e Gluma Desensitizer na redução da atividade proteolítica das interfaces produzidas sobre a dentina úmida ou seca.

Intensa atividade proteolítica é detectada logo após a desmineralização da dentina e liberação, seguida de ativação, das proteases residentes nesse tecido ^{28, 145}. Após essa intensa atividade inicial ocorre uma redução progressiva na liberação de ICTP (telopectídeo carboxiterminal do colágeno tipo I) e CTX (telopectídeo C-terminal do colágeno tipo I), biomarcadores da degradação do colágeno tipo I por MMPs e CATs, respectivamente ¹⁴⁵. Esses achados sugerem que proteases dentinárias são capazes de degradar apenas o substrato próximo a área limitada por sua mobilidade molecular. Entretanto, a presença de atividade proteolítica nas interfaces produzidas sem a biomodificação da dentina, mesmo após 12 meses de envelhecimento, parece refutar essa hipótese ⁸⁴. Em contrapartida, a ausência de atividade proteolítica na maioria das interfaces produzidas sobre a dentina biomodificada, especialmente com GSE e GD, demonstra que os efeitos promovidos por esses agentes podem ser duradouros ³⁰.

Embora muitas dúvidas sobre o mecanismo de ação das proteases dentinárias ainda não tenham sido completamente elucidadas, é fato que a sua inativação por agentes promotores de ligações cruzadas, associada ao aumento do número de ligações exógenas induzidas por esses agentes, torna a união resina-dentina mais resistente aos processos de degradação, e, conseqüentemente, mais estável longitudinalmente. Adicionalmente, os achados do presente estudo demonstraram que a biomodificação da dentina condicionada elimina a sensibilidade da técnica quanto ao grau de hidratação dessa zona no momento da aplicação do adesivo, mesmo que esse adesivo não contenha água como solvente.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e dentro das limitações desse estudo, foi possível concluir que:

- A resistência de união foi negativamente influenciada pela secagem da dentina condicionada com ar. Entretanto, a prévia biomodificação com GSE, GD ou Gluma Desensitizer foi capaz de contrapor esse efeito prejudicial e as novas interfaces apresentaram resistência mecânica comparável a da dentina úmida, com ou sem biomodificação. Ainda, desde que biomodificada previamente, a secagem da dentina produziu interfaces estáveis mecanicamente após 12 meses de envelhecimento;
- Nanoinfiltração foi observada em todos os espécimes; entretanto, no período de 24 horas, foi mais evidente nas interfaces produzidas sobre a dentina não biomodificada e seca. A biomodificação da dentina com GSE, GD ou Gluma Desensitizer reduziu a infiltração de íons prata, independentemente da condição de hidratação da dentina;
- A biomodificação da dentina com GSE, GD ou Gluma desensitizer reduziu a atividade proteolítica de interfaces produzidas sobre a dentina úmida e seca. Essa redução foi evidenciada até o período de 12 meses.

REFERÊNCIAS*

1. Spencer P, Ye Q, Park J, Topp EM, Misra A, Marangos O, et al. Adhesive/Dentin interface: the weak link in the composite restoration. *Ann Biomed Eng.* 2010; 38(6): 1989-2003.
2. Tay FR, Gwinnett JA, Wei SH. Micromorphological spectrum from overdrying to overwetting acid-conditioned dentin in water-free acetone-based, single-bottle primer/adhesives. *Dent Mater.* 1996; 12(4): 236-44.
3. Ricci HA, Scheffel DL, Mariusso MR, Spolidorio DM, de Souza Costa CA, Hebling J. Exposed collagen in resin bonds to caries-affected dentin after dentin treatment with aqueous and alcoholic chlorhexidine solutions. *J Adhes Dent.* 2014; 16(1): 21-8.
4. 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.
5. Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res.* 2003; 82(2): 141-5.
6. Oliveira SS, Marshall SJ, Habelitz S, Gansky SA, Wilson RS, Marshall GW, Jr. The effect of a self-etching primer on the continuous demineralization of dentin. *Eur J Oral Sci.* 2004; 112(4): 376-83.
7. Spencer P, Wang Y, Katz JL. Identification of collagen encapsulation at the dentin/adhesive interface. *J Adhes Dent.* 2004; 6(2): 91-5.
8. Hashimoto M, Ohno H, Endo K, Kaga M, Sano H, Oguchi H. The effect of hybrid layer thickness on bond strength: demineralized dentin zone of the hybrid layer. *Dent Mater.* 2000; 16(6): 406-11.
9. Bertassoni LE, Orgel JP, Antipova O, Swain MV. The dentin organic matrix - limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale. *Acta Biomater.* 2012; 8(7): 2419-33.
10. Tjaderhane L. Dentin bonding: can we make it last? *Oper Dent.* 2015; 40(1): 4-18.
11. Agee KA, Prakki A, Abu-Haimed T, Naguib GH, Nawareg MA, Tezvergil-Mutluay A, et al. Water distribution in dentin matrices: bound vs. unbound water. *Dent Mater.* 2015; 31(3): 205-16.
12. Pashley DH, Tay FR, Imazato S. How to increase the durability of resin-dentin bonds. *Compend Contin Educ Dent.* 2011; 32(7): 60-4, 66.
13. Anchietà RB, Machado LS, Sundfeld RH, Reis AF, Giannini M, Luersen MA, et al. Effect of partially demineralized dentin beneath the hybrid layer on dentin-adhesive interface micromechanics. *J Biomech.* 2015; 48(4): 701-7.

*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca:

<http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

14. Breschi L, Maravic T, Cunha SR, Comba A, Cadenaro M, Tjaderhane L, et al. Dentin bonding systems: from dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. *Dent Mater*. 2018; 34(1): 78-96.
15. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjaderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*. 2011; 27(1): 1-16.
16. Huang B, Siqueira WL, Cvitkovitch DG, Finer Y. Esterase from a cariogenic bacterium hydrolyzes dental resins. *Acta Biomater*. 2018; 71: 330-8.
17. Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, et al. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *Am J Dent*. 2007; 20(1): 7-20.
18. Jacobsen T, Soderholm KJ. Some effects of water on dentin bonding. *Dent Mater*. 1995; 11(2): 132-6.
19. Abedin F, Ye Q, Parthasarathy R, Misra A, Spencer P. Polymerization behavior of hydrophilic-rich phase of dentin adhesive. *J Dent Res*. 2015; 94(3): 500-7.
20. Frassetto A, Breschi L, Turco G, Marchesi G, Di Lenarda R, Tay FR, et al. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability--a literature review. *Dent Mater*. 2016; 32(2): e41-53.
21. Tjaderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldelli S, et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer-A review. *Dent Mater*. 2013; 29(10): 999-1011.
22. Zhou J, Chiba A, Scheffel DL, Hebling J, Agee K, Tagami J, et al. Cross-linked dry bonding: a new etch-and-rinse technique. *Dent Mater*. 2016; 32(9): 1124-32.
23. Manso AP, Marquezini L Jr., Silva SM, Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM. Stability of wet versus dry bonding with different solvent-based adhesives. *Dent Mater*. 2008; 24(4): 476-82.
24. Takai T, Hosaka K, Kambara K, Thitthaweerat S, Matsui N, Takahashi M, et al. Effect of air-drying dentin surfaces on dentin bond strength of a solvent-free one-step adhesive. *Dent Mater J*. 2012; 31(4): 558-63.
25. Bedran-Russo AK, Vidal CM, Dos Santos PH, Castellan CS. Long-term effect of carbodiimide on dentin matrix and resin-dentin bonds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010; 94(1): 250-5.
26. Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, de Souza Costa CA, Pashley D, Hebling J. Transdental cytotoxicity of glutaraldehyde on odontoblast-like cells. *J Dent*. 2015; 43(8): 997-1006.

27. Lee J, Sabatini C. Glutaraldehyde collagen cross-linking stabilizes resin-dentin interfaces and reduces bond degradation. *Eur J Oral Sci.* 2017; 125(1): 63-71.
28. Scheffel DL, Hebling J, Scheffel RH, Agee KA, Cadenaro M, Turco G, et al. Stabilization of dentin matrix after cross-linking treatments, in vitro. *Dent Mater.* 2014; 30(2): 227-33.
29. Bedran-Russo AK, Pashley DH, Agee K, Drummond JL, Miescke KJ. Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen crosslinkers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008; 86(2): 330-4.
30. Aydin B, Leme-Kraus AA, Vidal CMP, Aguiar TR, Phansalkar RS, Nam JW, et al. Evidence to the role of interflavan linkages and galloylation of proanthocyanidins at sustaining long-term dentin biomodification. *Dent Mater.* 2019; 35(2): 328-34.
31. Ryou H, Turco G, Breschi L, Tay FR, Pashley DH, Arola D. On the stiffness of demineralized dentin matrices. *Dent Mater.* 2016; 32(2): 161-70.
32. Epasinghe DJ, Yiu CK, Burrow MF, Hiraishi N, Tay FR. The inhibitory effect of proanthocyanidin on soluble and collagen-bound proteases. *J Dent.* 2013; 41(9): 832-9.
33. Seseogullari-Dirihan R, Apollonio F, Mazzoni A, Tjaderhane L, Pashley D, Breschi L, et al. Use of crosslinkers to inactivate dentin MMPs. *Dent Mater.* 2016; 32(3): 423-32.
34. Scheffel DL, Hebling J, Scheffel RH, Agee K, Turco G, de Souza Costa CA, et al. Inactivation of matrix-bound matrix metalloproteinases by cross-linking agents in acid-etched dentin. *Oper Dent.* 2014; 39(2): 152-8.
35. Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, McAlpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, et al. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. *Dent Mater.* 2014; 30(1): 62-76.
36. Sabatini C, Scheffel DLS, Agee KA, Pashley DH. Inhibition of MMP activity in acid-etched dentin by Gluma treatment. *Compend Contin Educ Dent.* 2013: 34-46.
37. Embery G, Hall R, Waddington R, Septier D, Goldberg M. Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001; 12(4): 331-49.
38. Tjäderhane L, Carrilho MR, Breschi L, Tay FR, Pashley DH. Dentin basic structure and composition—an overview. *Endod Topics.* 2012; 20(1): 3-29.
39. Marshall GW, Jr., Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent.* 1997; 25(6): 441-58.

40. Mazzoni A, Breschi L, Carrilho M, Nascimento FD, Orsini G, Ruggeri Jr A, et al. A review of the nature, role, and function of dentin non-collagenous proteins. Part II: enzymes, serum proteins, and growth factors. *Endod Topics*. 2009; 21(1): 19-40.
41. Orsini G, Ruggeri Jr A, Mazzoni A, Nato F, Manzoli L, Putignano A, et al. A review of the nature, role, and function of dentin non-collagenous proteins. Part 1: proteoglycans and glycoproteins. *Endod Topics*. 2009; 21(1): 1-18.
42. Bertassoni LE. Dentin on the nanoscale: Hierarchical organization, mechanical behavior and bioinspired engineering. *Dent Mater*. 2017; 33(6): 637-49.
43. Tjaderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater*. 2013; 29(1): 116-35.
44. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011; 3: 711-35.
45. Landis WJ. A study of calcification in the leg tendons from the domestic turkey. *J Ultrastruct Mol Struct Res*. 1986; 94(3): 217-38.
46. Kinney JH, Pople JA, Marshall GW, Marshall SJ. Collagen orientation and crystallite size in human dentin: a small angle X-ray scattering study. *Calcif Tissue Int*. 2001; 69(1): 31-7.
47. Kinney JH, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW. The importance of intrafibrillar mineralization of collagen on the mechanical properties of dentin. *J Dent Res*. 2003; 82(12): 957-61.
48. Balooch M, Habelitz S, Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. Mechanical properties of mineralized collagen fibrils as influenced by demineralization. *J Struct Biol*. 2008; 162(3): 404-10.
49. Li B, Zhu X, Ma L, Wang F, Liu X, Yang X, et al. Selective demineralisation of dentine extrafibrillar minerals-A potential method to eliminate water-wet bonding in the etch-and-rinse technique. *J Dent*. 2016; 52: 55-62.
50. 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.
51. Chapman JA, Tzaphlidou M, Meek KM, Kadler KE. The collagen fibril--a model system for studying the staining and fixation of a protein. *Electron Microsc Rev*. 1990; 3(1): 143-82.
52. Kramer RZ, Bella J, Brodsky B, Berman HM. The crystal and molecular structure of a collagen-like peptide with a biologically relevant sequence. *J Mol Biol*. 2001; 311(1): 131-47.

53. Rainey JK, Goh MC. A statistically derived parameterization for the collagen triple-helix. *Protein Sci.* 2002; 11(11): 2748-54.
54. Panwar P, Du X, Sharma V, Lamour G, Castro M, Li H, et al. Effects of cysteine proteases on the structural and mechanical properties of collagen fibers. *J Biol Chem.* 2013; 288(8): 5940-50.
55. Yamauchi M, Shiiba M. Lysine hydroxylation and cross-linking of collagen. *Methods Mol Biol.* 2008; 446: 95-108.
56. Brodsky B, Ramshaw JA. The collagen triple-helix structure. *Matrix Biol.* 1997; 15(8-9): 545-54.
57. Sabbagh J, Vreven J, Leloup G. Dynamic and static moduli of elasticity of resin-based materials. *Dent Mater.* 2002; 18(1): 64-71.
58. 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.
59. Stape THS, Tjaderhane L, Abuna G, Sinhoreti MAC, Martins LRM, Tezvergil-Mutluay A. Optimization of the etch-and-rinse technique: New perspectives to improve resin-dentin bonding and hybrid layer integrity by reducing residual water using dimethyl sulfoxide pretreatments. *Dent Mater.* 2018; 34(7): 967-77.
60. 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.
61. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003; 92(8): 827-39.
62. Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res.* 1998; 77(8): 1622-9.
63. Nemeth JA, Yousif R, Herzog M, Che M, Upadhyay J, Shekarriz B, et al. Matrix metalloproteinase activity, bone matrix turnover, and tumor cell proliferation in prostate cancer bone metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94(1): 17-25.
64. 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.
65. Boskey AL. The role of extracellular matrix components in dentin mineralization. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991; 2(3): 369-87.
66. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjaderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res.* 2002; 81(9): 603-7.

67. Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GA, Papa S, Mazzotti G, et al. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res*. 2007; 86(5): 436-40.
68. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjaderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol*. 2007; 52(2): 121-7.
69. Mazzoni A, Papa V, Nato F, Carrilho M, Tjaderhane L, Ruggeri A Jr., et al. Immunohistochemical and biochemical assay of MMP-3 in human dentine. *J Dent*. 2011; 39(3): 231-7.
70. Tjaderhane L, Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Salo T. Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). *Adv Dent Res*. 2001; 15: 55-8.
71. 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*. 2004; 112(2): 171-6.
72. 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.
73. Perumal S, Antipova O, Orgel JP. Collagen fibril architecture, domain organization, and triple-helical conformation govern its proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(8): 2824-9.
74. Kafienah W, Bromme D, Buttle DJ, Croucher LJ, Hollander AP. Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *Biochem J*. 1998; 331 (Pt 3): 727-32.
75. 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.
76. Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Paakkonen V, Martins MT, et al. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *J Endod*. 2010; 36(3): 475-81.
77. Orsini G, Ruggeri A, Jr., Mazzoni A, Papa V, Piccirilli M, Falconi M, et al. Immunohistochemical identification of type I and type III collagen and chondroitin sulphate in human pre-dentine: a correlative FEI-SEM/TEM study. *Int Endod J*. 2007; 40(9): 669-78.
78. Turk B, Bieth JG, Bjork I, Dolenc I, Turk D, Cimerman N, et al. Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1995; 376(4): 225-30.

79. Aguda AH, Panwar P, Du X, Nguyen NT, Brayer GD, Bromme D. Structural basis of collagen fiber degradation by cathepsin K. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111(49): 17474-9.
80. Stape THS, Tjaderhane L, Tezvergil-Mutluay A, Da Silva WG, Dos Santos Silva AR, da Silva WJ, et al. In situ analysis of gelatinolytic activity in human dentin. *Acta Histochem*. 2018; 120(2): 136-41.
81. Mazzoni A, Nascimento FD, Carrilho M, Tersariol I, Papa V, Tjaderhane L, et al. MMP activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. *J Dent Res*. 2012; 91(5): 467-72.
82. Mazzoni A, Angeloni V, Apolonio FM, Scotti N, Tjaderhane L, Tezvergil-Mutluay A, et al. Effect of carbodiimide (EDC) on the bond stability of etch-and-rinse adhesive systems. *Dent Mater*. 2013; 29(10): 1040-7.
83. Mazzoni A, Angeloni V, Sartori N, Duarte S, Jr., Maravic T, Tjaderhane L, et al. Substantivity of carbodiimide inhibition on dentinal enzyme activity over time. *J Dent Res*. 2017; 96(8): 902-8.
84. Alonso JRL, Basso FG, Scheffel DLS, de-Souza-Costa CA, Hebling J. Effect of crosslinkers on bond strength stability of fiber posts to root canal dentin and in situ proteolytic activity. *J Prosthet Dent*. 2018; 119(3): 494 e1- e9.
85. Scheffel DL, Delgado CC, Soares DG, Basso FG, de Souza Costa CA, Pashley DH, et al. Increased durability of resin-dentin bonds following cross-linking treatment. *Oper Dent*. 2015; 40(5): 533-9.
86. Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res*. 2002; 62(3): 447-56.
87. Brackett MG, Li N, Brackett WW, Sword RJ, Qi YP, Niu LN, et al. The critical barrier to progress in dentine bonding with the etch-and-rinse technique. *J Dent*. 2011; 39(3): 238-48.
88. Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjaderhane L, et al. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dent Mater*. 2010; 26(6): 571-8.
89. 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.
90. Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res*. 2005; 84(8): 741-6.
91. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipolito V, Geraldeli S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res*. 2007; 86(1): 90-4.

92. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res*. 2005; 84(2): 118-32.
93. 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.
94. Perdigão J, Reis A, Loguercio AD. Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. *J Esthet Restor Dent*. 2013; 25(4): 219-41.
95. Hass V, Luque-Martinez IV, Gutierrez MF, Moreira CG, Gotti VB, Feitosa VP, et al. Collagen cross-linkers on dentin bonding: Stability of the adhesive interfaces, degree of conversion of the adhesive, cytotoxicity and in situ MMP inhibition. *Dent Mater*. 2016; 32(6): 732-41.
96. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater*. 2008; 24(1): 90-101.
97. Shokati B, Tam LE, Santerre JP, Finer Y. Effect of salivary esterase on the integrity and fracture toughness of the dentin-resin interface. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010; 94(1): 230-7.
98. Finer Y, Santerre JP. Salivary esterase activity and its association with the biodegradation of dental composites. *J Dent Res*. 2004; 83(1): 22-6.
99. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjaderhane 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.
100. Nagase H, Fushimi K. Elucidating the function of non catalytic domains of collagenases and aggrecanases. *Connect Tissue Res*. 2008; 49(3): 169-74.
101. Amar S, Smith L, Fields GB. Matrix metalloproteinase collagenolysis in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2017; 1864(11 Pt A): 1940-51.
102. Armstrong SR, Jessop JL, Winn E, Tay FR, Pashley DH. Denaturation temperatures of dentin matrices. I. Effect of demineralization and dehydration. *J Endod*. 2006; 32(7): 638-41.
103. 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.
104. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res*. 2000; 79(6): 1385-91.

105. Carrilho MR, Geraldini S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjaderhane L, et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res.* 2007; 86(6): 529-33.
106. Tay FR, Pashley DH, Kapur RR, Carrilho MR, Hur YB, Garrett LV, et al. Bonding BisGMA to dentin--a proof of concept for hydrophobic dentin bonding. *J Dent Res.* 2007; 86(11): 1034-9.
107. Hosaka K, Nishitani Y, Tagami J, Yoshiyama M, Brackett WW, Agee KA, et al. Durability of resin-dentin bonds to water- vs. ethanol-saturated dentin. *J Dent Res.* 2009; 88(2): 146-51.
108. Stape TH, Tjaderhane L, Tezvergil-Mutluay A, Yanikian CR, Szesz AL, Loguercio AD, et al. Dentin bond optimization using the dimethyl sulfoxide-wet bonding strategy: A 2-year in vitro study. *Dent Mater.* 2016; 32(12): 1472-81.
109. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Uchiyama T, Imazato S, Mutluay MM, Cadenaro M, et al. The inhibitory effects of quaternary ammonium methacrylates on soluble and matrix-bound MMPs. *J Dent Res.* 2011; 90(4): 535-40.
110. Tezvergil-Mutluay A, Mutluay MM, Agee KA, Seseogullari-Dirihan R, Hoshika T, Cadenaro M, et al. Carbodiimide cross-linking inactivates soluble and matrix-bound MMPs, in vitro. *J Dent Res.* 2012; 91(2): 192-6.
111. Liu Y, Chen M, Yao X, Xu C, Zhang Y, Wang Y. Enhancement in dentin collagen's biological stability after proanthocyanidins treatment in clinically relevant time periods. *Dent Mater.* 2013; 29(4): 485-92.
112. Niu LN, Zhang W, Pashley DH, Breschi L, Mao J, Chen JH, et al. Biomimetic remineralization of dentin. *Dent Mater.* 2014; 30(1): 77-96.
113. Tay FR, Pashley DH. Guided tissue remineralisation of partially demineralised human dentine. *Biomaterials.* 2008; 29(8): 1127-37.
114. Zhang SC, 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.
115. Aguiar TR, Vidal CM, Phansalkar RS, Todorova I, Napolitano JG, McAlpine JB, et al. Dentin biomodification potential depends on polyphenol source. *J Dent Res.* 2014; 93(4): 417-22.
116. Cai J, Palamara JEA, Burrow MF. Effects of collagen crosslinkers on dentine: a literature review. *Calcif Tissue Int.* 2018; 102(3): 265-79.
117. Scaffa PM, Vidal CM, Barros N, Gesteira TF, Carmona AK, Breschi L, et al. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. *J Dent Res.* 2012; 91(4): 420-5.

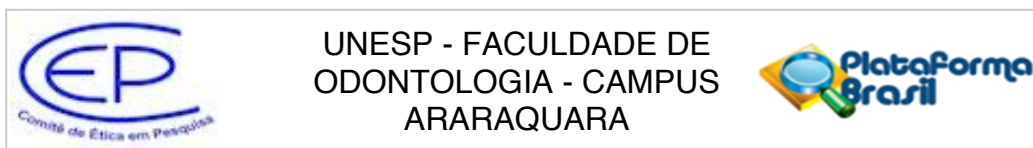
118. Kim J, Uchiyama T, Carrilho M, Agee KA, Mazzoni A, Breschi L, et al. Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. *Dent Mater*. 2010; 26(8): 771-8.
119. Liu RR, Fang M, Zhang L, Tang CF, Dou Q, Chen JH. Anti-proteolytic capacity and bonding durability of proanthocyanidin-biomodified demineralized dentin matrix. *Int J Oral Sci*. 2014; 6(3): 168-74.
120. Cheung DT, Perelman N, Ko EC, Nimni ME. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde III. Reaction with collagen in tissues. *Connect Tissue Res*. 1985; 13(2): 109-15.
121. Cheung DT, Tong D, Perelman N, Ertl D, Nimni ME. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde. IV: In vitro and in vivo stability of a crosslinked collagen matrix. *Connect Tissue Res*. 1990; 25(1): 27-34.
122. Han B, Jaurequi J, Tang BW, Nimni ME. Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 65(1): 118-24.
123. Xu C, Wang Y. Cross-linked demineralized dentin maintains its mechanical stability when challenged by bacterial collagenase. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2011; 96(2): 242-8.
124. Maciel KT, Carvalho RM, Ringle RD, Preston CD, Russell CM, Pashley DH. The effects of acetone, ethanol, HEMA, and air on the stiffness of human decalcified dentin matrix. *J Dent Res*. 1996; 75(11): 1851-8.
125. Al-Ammar A, Drummond JL, Bedran-Russo AK. The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009; 91(1): 419-24.
126. Cilli R, Prakki A, de Araujo PA, Pereira JC. Influence of glutaraldehyde priming on bond strength of an experimental adhesive system applied to wet and dry dentine. *J Dent*. 2009; 37(3): 212-8.
127. Qin C, Xu J, Zhang Y. Spectroscopic investigation of the function of aqueous 2-hydroxyethylmethacrylate/glutaraldehyde solution as a dentin desensitizer. *Eur J Oral Sci*. 2006; 114(4): 354-9.
128. Bedran-Russo AK, Pereira PN, Duarte WR, Drummond JL, Yamauchi M. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007; 80(1): 268-72.
129. Bedran-Russo AK, Castellan CS, Shinohara MS, Hassan L, Antunes A. Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative therapies. *Acta Biomater*. 2011; 7(4): 1735-41.
130. Castellan CS, Pereira PN, Grande RH, Bedran-Russo AK. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. *Dent Mater*. 2010; 26(10): 968-73.

131. Deng M, Dong X, Zhou X, Wang L, Li H, Xu X. Characterization of dentin matrix biomodified by *Galla chinensis* extract. *J Endod*. 2013; 39(4): 542-7.
132. Phansalkar RS, Nam JW, Chen SN, McAlpine JB, Napolitano JG, Leme A, et al. A galloylated dimeric proanthocyanidin from grape seed exhibits dentin biomodification potential. *Fitoterapia*. 2015; 101: 169-78.
133. Vidal CM, Leme AA, Aguiar TR, Phansalkar R, Nam JW, Bisson J, et al. Mimicking the hierarchical functions of dentin collagen cross-links with plant derived phenols and phenolic acids. *Langmuir*. 2014; 30(49): 14887-93.
134. Xie Q, Bedran-Russo AK, Wu CD. In vitro remineralization effects of grape seed extract on artificial root caries. *J Dent*. 2008; 36(11): 900-6.
135. Ekambaram M, Yiu CK, Matinlinna JP. Effect of solvents on dentin collagen cross-linking potential of carbodiimide. *J Adhes Dent*. 2015; 17(3): 219-26.
136. Tay FR, Pashley DH, Yoshiyama M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. *J Dent Res*. 2002; 81(7): 472-6.
137. Agee KL, Pashley EL, Itthagarun A, Sano H, Tay FR, Pashley DH. Submicron hiat in acid-etched dentin are artifacts of desiccation. *Dent Mater*. 2003; 19(1): 60-8.
138. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol*. 2003; 200(4): 448-64.
139. Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjaderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci*. 2003; 111(2): 117-27.
140. Pashley DH, Agee KA, Carvalho RM, Lee KW, Tay FR, Callison TE. Effects of water and water-free polar solvents on the tensile properties of demineralized dentin. *Dent Mater*. 2003; 19(5): 347-52.
141. Bembey AK, Oyen M, Bushby A, Boyde A. Nanoindentation measurements of bone viscoelasticity as a function of hydration state. *MRS Online Proceeding Library Archive*. 2011; 898: 0898-L07-04.
142. Ntim M, Bembey A, Ferguson V, Bushby A. Hydration effects on the viscoelastic properties of collagen. *MRS Online Proceeding Library Archive*. 2011; 898: 0898-L05-02.
143. Pashley DH, Agee KA, Nakajima M, Tay FR, Carvalho RM, Terada RS, et al. Solvent-induced dimensional changes in EDTA-demineralized dentin matrix. *J Biomed Mater Res*. 2001; 56(2): 273-81.
144. Fang M, Liu R, Xiao Y, Li F, Wang D, Hou R, et al. Biomodification to dentin by a natural crosslinker improved the resin-dentin bonds. *J Dent*. 2012; 40(6): 458-66.

145. Turco G, Cadenaro M, Maravic T, Frassetto A, Marsich E, Mazzoni A, et al. Release of ICTP and CTX telopeptides from demineralized dentin matrices: Effect of time, mass and surface area. *Dent Mater*. 2018; 34(3): 452-9.

ANEXO A

Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Seres Humanos.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estabilidade mecânica e atividade proteolítica da união resina-dentina produzida pela técnica de adesão seca à dentina biomodificada por cross-linkers

Pesquisador: JOSIMERI HEBLING COSTA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 67547417.9.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.070.869

Apresentação do Projeto:

O objetivo desse estudo experimental ex vivo será avaliar a estabilidade mecânica e atividade proteolítica da união resina-dentina produzida pela aplicação de sistemas adesivos com diferentes graus de hidrofília sobre a dentina biomodificada por cross-linkers e desprovida de água.

Objetivo da Pesquisa:

A proposta geral do estudo será avaliar o efeito da biomodificação da matriz dentinária com cross-linkers seguida de desidratação no comportamento longitudinal da união resina-dentina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os pesquisadores estarão sujeitos a riscos relacionados a manipulação dos dentes obtidos por meio do Banco de Dentes, após devida aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da mesma Instituição de Ensino Superior. Esses riscos serão minimizados por meio da utilização de EPIs adequados para a manipulação das amostras (luvas, jaleco, gorro, máscara e óculos de proteção).

Benefícios: O pré-tratamento da dentina com agentes formadores de ligações cruzadas (cross-linkers) visa aumentar as propriedades mecânicas do colágeno e torná-lo mais resistente à

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

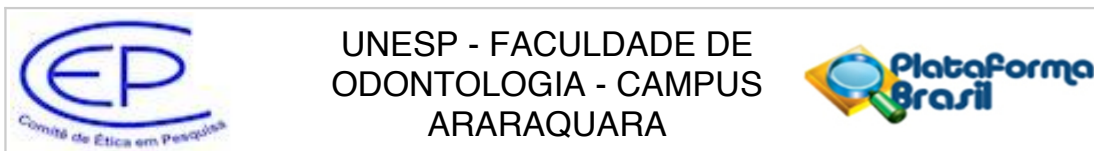
UF: SP

Município: ARARAQUARA

CEP: 14.801-903

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.070.869

desidratação e degradação. Dentre os cross-linkers mais investigados estão a carbodiimida (EDC), o glutaraldeído (GD) e as proantocianidinas (PA). Esses agentes aumentam a rigidez do colágeno e suas propriedades mecânicas de resistência máxima à tração e módulo de elasticidade, além de atuar diretamente sobre o colágeno, esses agentes também são inibidores de proteases como MMPs e cisteínas catépsinas. Espera-se que a comprovação da eficácia dos cross-linkers intensifique as pesquisas, o que, futuramente, beneficiará tanto pacientes quanto cirurgiões dentistas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa encontrava-se com a necessidade de pequenos ajustes sugeridos, prontamente atendido pelo pesquisador.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram apresentados de forma correta, estando agora o projeto em formato mais adequado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo APROVADO em reunião de 18 de Maio de 2017.

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_890323.pdf	04/05/2017 11:55:36		Aceito
Outros	Comprovante_auxilio_Fapesp.pdf	04/05/2017 11:44:40	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_mestrado.pdf	04/05/2017 11:41:06	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	banco_de_dentes.pdf	19/04/2017 10:10:21	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito
Declaração de	autorizacao_lab.pdf	14/04/2017	JOSIMERI HEBLING	Aceito

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CAMPUS
ARARAQUARA



Continuação do Parecer: 2.070.869

Instituição e Infraestrutura	autorizacao_lab.pdf	00:06:45	COSTA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao.pdf	14/04/2017 00:06:08	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensa_tcle.pdf	14/04/2017 00:02:14	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito
Folha de Rosto	CEP.pdf	07/04/2017 08:16:17	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 18 de Maio de 2017

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

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 01 de Março de 2021.

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 01 de Março de 2019

Mariana Citta