



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



JULIANA ROSA LUIZ ALONSO

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E RESISTÊNCIA DA UNIÃO CIMENTO
RESINOSO-DENTINA RADICULAR PRODUZIDA NA PRESENÇA DE
AGENTES PROMOTORES DE LIGAÇÕES CRUZADAS**

Araraquara
2016



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



JULIANA ROSA LUIZ ALONSO

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E RESISTÊNCIA DA UNIÃO CIMENTO
RESINOSO-DENTINA RADICULAR PRODUZIDA NA PRESENÇA DE
AGENTES PROMOTORES DE LIGAÇÕES CRUZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral – Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof.^ª Dr.^ª Josimeri Hebling

Alonso, Juliana Rosa Luiz

Atividade proteolítica e resistência da união cimento resinoso-dentina radicular produzida na presença de agentes promotores de ligações cruzadas / Juliana Rosa Luiz Alonso.-- Araraquara: [s.n.], 2016.

78 f. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Josemeri Hebling

1. Raiz dentária 2. Dentina 3. Colágeno 4. Reagentes para ligações cruzadas 5. Metaloproteases 6. Resistência à tração I. Título

JULIANA ROSA LUIZ ALONSO

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E RESISTÊNCIA DA UNIÃO CIMENTO
RESINOSO-DENTINA RADICULAR PRODUZIDA NA PRESENÇA DE
AGENTES PROMOTORES DE LIGAÇÕES CRUZADAS**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Comissão Julgadora

Presidente e Orientador: Prof.^a Dr.^a Josimeri Hebling

2º Examinador: Prof.^a Dr.^a Marcela Rocha de Oliveira Carrilho

3º Examinador: Prof.^a Dr.^a Diana Gabriela de Sousa Soares

Araraquara, 06 de Abril de 2016.

DADOS CURRICULARES

JULIANA ROSA LUIZ ALONSO

Nascimento: 29/11/1991 – Araraquara – São Paulo

Filiação: Fernando Luiz Alonso e Cibele Hernandes Rosa Luiz Alonso

2009 a 2013 Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2014 a 2016 Pós-Graduação – Mestrado pelo programa de Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

DEDICATÓRIA

Dedico este estudo primeiramente a **Deus**! Sem ele para guiar o meu caminho e o iluminar, eu não teria chego onde estou hoje. Obrigada por sempre proteger a mim e minha família. Agradeço pela oportunidade de apreciar uma vida cheia de experiências únicas, onde pude conhecer pessoas especiais com as quais compartilhei todos esses lindos anos.

Aos meus pais **Fernando Luiz Alonso** e **Cibele Hernandes Rosa Luiz Alonso**, por me amarem incondicionalmente! Obrigada por me educarem da melhor maneira possível, abdicando de muitas coisas em suas vidas em prol de meus estudos e pelo bem de nossa família. Sei que esses últimos anos tem sido difíceis e que muitas mudanças vêm acontecendo, mas quero que saibam que jamais, de forma alguma, por quaisquer motivos, eu deixarei de estar ao lado de vocês! Não existem palavras para expressar o quanto vocês são especiais. Obrigada por tudo meus amores, amo vocês eternamente!

Aos meus irmãos **Fernando**, **Giovana** e **Mariana**, por me amarem e por compartilharem todos os momentos de minha vida comigo! Vocês são os meus melhores amigos e sei que nós sempre estaremos um ao lado do outro, nos defendendo e nos apoiando. Obrigada por aguentarem o meu mau humor e estresse quando pensei que não conseguiria finalizar meus compromissos. Desculpem-me por isso! Eu amo vocês demais!

Dedico este estudo também ao meu avô **Agostinho** e minhas avós **Clotilde**

e **Felisa**. Por serem pessoas tão iluminadas e batalhadoras, sempre colocando a família em primeiro lugar! Obrigada por todo o carinho, preocupação, toda a dedicação e ajuda que vocês sempre me deram. Parte de minha criação e educação é dedicada a vocês meus amores. Eu os amo com todas as minhas forças!

Gostaria de dedicar este trabalho também ao meu namorado, **Daniel Ryan**, por todo o apoio, amor, carinho e atenção dados a mim todos os dias, principalmente quando eu mais precisei. Obrigada por estar ao meu lado, compartilhando sonhos e criando novos. Você é mais que o meu namorado, você é o meu melhor amigo! Eu te amo demais!

Por fim, dedico não apenas esse trabalho, mas tudo em minha vida...

Aos meus entes queridos que estão no céu,

Meu avô **Wilson Rosa** e minha Tia Avó **Marina Luiz Alonso Antônio** que são os meus anjos da guarda. Não existe maneira de expressar a falta que vocês fazem em nossas vidas. O único que conhece esse sentimento são os nossos corações. Obrigada por olharem por nós e nos protegerem sempre. O amor que sinto por vocês é eterno e transcende qualquer barreira.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço primeiramente a minha orientadora **Prof.^a Dr.^a Josimeri Hebling**, professora do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. A senhora sempre acreditou em mim e me apoiou, mesmo à distância. Sua confiança em meu trabalho e em meu caráter fez com que as dificuldades fossem mais facilmente superadas durante esse período. Obrigada pela oportunidade de poder trabalhar com a senhora e por compartilhar de seus conhecimentos comigo. Durante esses quatro anos em que fui sua orientada eu aprendi muito como pesquisadora, mas também como pessoa. Serei eternamente grata por tudo o que a senhora fez por mim! Tenho orgulho da pessoa que me tornei. Saiba que a senhora teve grande influência sobre isso. Obrigada!

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, professor do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. O senhor abriu as portas de seu laboratório em meu segundo ano de graduação, para que eu iniciasse meus estudos na área da pesquisa, como aluna de iniciação científica. Completos seis anos neste grupo de pesquisa posso dizer que o que eu aprendi e vivenciei durante este tempo eu levarei para o resto de minha vida comigo. O senhor é um exemplo de pesquisador e de pessoa!

À **Prof.^a Dr.^a Diana Gabriela de Sousa Soares**, aluna de pós-doutorado da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Obrigada por tudo o que você fez por mim, principalmente no meu primeiro ano de mestrado. Você me incentivou a correr atrás das oportunidades e a não temer. Aprendi muito contigo e sei que há muito a ser compartilhado ainda. Desta forma, não poderia ser diferente a escolha,

novamente, de seu nome para minha banca examinadora. Agradeço o seu aceite do meu convite, fiquei muito feliz!

À **Prof.^a Dr.^a Marcela Rocha de Oliveira Carrilho**, docente dos programas de pós-graduação de Biomateriais em Odontologia e de Biotecnologia e Inovação em Saúde, da Universidade Bandeirante Anhanguera (UNIBAN). Gostaria de agradecê-la pelo aceite de meu convite e dizer que para mim é uma honra receber em minha banca de dissertação uma pesquisadora tão renomada na área da adesão. Durante meu período de mestrado tive a oportunidade de ler diversos trabalhos de sua autoria ou coautoria. Tenho certeza de que seus questionamentos serão de suma importância ao nosso trabalho.

À **Prof.^a Dr.^a Fernanda Gonçalves Basso**, aluna de pós-doutorado da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Agradeço imensamente por todo o apoio que você me deu durante esses anos. Obrigada por me ajudar sempre que precisei, pelo auxílio dado em minha pesquisa e, acima de tudo, pela amizade. Você é uma pessoa muito especial. Tenho certeza que alcançará todos os seus objetivos, pois você merece muito!

E por fim à **Dr.^a Débora Lopes Salles Scheffel**, aluna de pós-doutorado da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Obrigada por me ajudar em um momento complicado de transição de linhas de pesquisa, quando entrei no mestrado. Sempre pude contar com você para conversar, sobre qualquer coisa. Mesmo tendo ficado distante durante um período você me ajudou e foi muito importante para a finalização desse projeto. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP**, nas pessoas da diretora Prof.^a Dr.^a Andréia Affonso Barreto Montandon, e vice-diretora Prof.^a Dr.^a Elaine Maria Sgavioli Massucato. Tive a honra de me graduar nesta casa de ensino reconhecida por sua excelência. E de poder continuar meus estudos, por meio do curso de mestrado em Reabilitação Oral, na mesma instituição.

Ao **Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP**, representado pelo chefe de departamento Prof. Dr. Francisco de Assis Molloy Júnior e pela vice-chefe Prof.^a Dr.^a Lígia Antunes Pereira Pinelli. Foi neste departamento que me encontrei como cirurgiã-dentista e pesquisadora. Obrigada a todos por compartilharem de seus conhecimentos comigo, durante as disciplinas cursadas e os estágios docência realizados.

À coordenação do **Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP**, representada pela coordenadora Prof.^a Dr.^a Ana Claudia Pavarina e pela vice-coordenadora Prof.^a Dr.^a Renata Garcia Fonseca. Agradeço a todos aos meus queridos professores que me ajudaram a crescer como profissional e como pessoa.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**, pela bolsa de mestrado concedida no período de abril/2014 a agosto/2014 (bolsa institucional).

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela bolsa de mestrado concedida no período de setembro/2014 a março/2016 (processo nº 2014/10183-8).

Ao **Laboratório de Pesquisa e Análise de Biomateriais** alocado nas dependências do **Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP**, representado pela Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling, no qual maior parte desta pesquisa foi desenvolvida.

Ao **Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP**, representado pelo chefe de departamento Prof. Dr. Eduardo Colombari e pelo vice-chefe Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, departamento no qual parte da pesquisa foi realizada.

Ao **Prof. Dr. Gelson Luis Adabo**, professor do departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Agradeço-o muito pelo aceite do convite para fazer parte da banca examinadora de minha qualificação, suas colocações foram muito importantes para que melhorássemos o trabalho para a defesa. O senhor é um exemplo a ser seguido como pessoa, professor e pesquisador.

À **Silvana Aparecida Malavolta**, secretária do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Obrigada por me ajudar sempre com as questões burocráticas e documentais relacionadas a bolsas e relatórios. Pude aprender muito com você durante esses anos.

À **Sonia Maria Tircailo**, secretária do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Gostaria de agradecê-la por toda a ajuda durante o período em que trabalhei no laboratório do departamento. Você sempre esteve disposta a tirar minhas dúvidas e a solucionar qualquer problema que pudesse aparecer. Agradeço de coração por tudo.

À **Profª. Drª. Lúgia Antunes Pereira Pinelli**, professora do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Obrigada pela sua orientação durante todo o meu estágio docência na disciplina de Prótese Fixa I e II.

Ao **Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho**, professor do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Agradeço muito pela ajuda com a metodologia do meu experimento, ao me liberar o uso do RaioX Digital.

Agradeço também a todos os meus colegas do **Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais** da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, por sempre me ajudarem. A presença de vocês tornou o trabalho mais difícil em algo prazeroso.

A todos os **funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP**, por serem sempre receptivos e educados. Obrigada por realizarem seus ofícios com o maior prazer e dedicação.

“Lembre-se de olhar para as estrelas e não para os seus pés. Tente fazer sentido do que você vê e pergunte-se sobre o que faz o universo existir. Seja curioso. E mesmo que a vida possa parecer difícil, há sempre algo que você pode fazer e ser bem sucedido.”

“É importante que você simplesmente não desista.”

Stephen Hawking

Alonso JRL. Atividade proteolítica e resistência da união cimento resinoso-dentina radicular produzida na presença de agentes promotores de ligações cruzadas [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

RESUMO

A estabilidade da união resina-dentina pode ser melhorada pelo uso de agentes promotores de ligações cruzadas (*cross-linkers*). Todavia, existe pouca informação quanto ao desempenho desses agentes em dentina radicular. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de três *cross-linkers* na atividade proteolítica e na resistência da união cimento resinoso-dentina radicular. Raízes unirradiculares foram obtidas de pré-molares humanos (n=48). Após tratamento endodôntico, essas raízes foram distribuídas em 4 grupos (n=12): água deionizada (controle), carbodiimida (EDC) 0,5 mol/L, proantocianidina (PA) 5% ou glutaraldeído (GD) 5%. Decorridas 24h do tratamento com esses agentes e da cimentação de pinos de fibra de vidro com cimento resinoso, as raízes foram seccionadas transversalmente para a obtenção de espécimes com 1 mm de espessura, das regiões cervical, média e apical. Nove raízes por grupo foram utilizadas para o ensaio mecânico de extrusão e três para determinação da atividade proteolítica dentinária, por meio de zimografia in situ. Os dados de resistência de união (RU) foram submetidos aos testes de ANOVA e Tukey e a existência de associação entre o tipo de fratura e as variáveis independentes do estudo foi determinada pelo teste de qui-quadrado (χ^2) ($\alpha=0,05$). Nenhum dos *cross-linkers* afetou a RU imediata. GD aumentou esses valores significativamente em comparação à PA, mas não ao controle. Houve redução significativa da RU do terço cervical para o apical, exceto para o grupo PA. Aumento na porcentagem de fraturas adesivas entre o pino de fibra de vidro e o cimento resinoso foi observado para os grupos EDC e GD, em relação ao grupo controle, enquanto, para PA, houve aumento de fraturas adesivas entre o cimento resinoso e a dentina. Foi observada grande atividade gelatinolítica no grupo controle, a qual foi reduzida por todos os *cross-linkers*. Em conclusão,

além de não interferirem negativamente na RU imediata, os *cross-linkers* reduziram a atividade proteolítica na camada híbrida da união cimento resinoso-dentina radicular.

Palavras-chave: Raiz dentária. Dentina. Colágeno. Reagentes para ligações cruzadas. Metaloproteases. Resistência à tração.

Alonso JRL. Proteolytic activity and bond strength of the resin cement-root dentin interface produced in the presence of cross-linkers [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

ABSTRACT

The resin-dentin bond stability can be improved by the use of cross-linkers. However, only scarce information is available as to the performance of these agents on root dentin. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of three cross-linkers on the proteolytic activity of root dentin and on the bond strength of resin-based cement-root dentin interfaces. Single canal roots were obtained from human premolars (n=48). After endodontic treatment, they were randomly divided into four groups: deionized water (control), 0.5 mol/L carbodiimide (EDC), 5% proanthocyanidin (PA) or 5% glutaraldehyde (GD). After 24h from dentin treatment with the cross-linkers and the cementation of a fiber post with a resin-based cement, the roots were transversally sectioned to obtain 1 mm-thick specimens, from the cervical, mid and apical areas. Nine roots *per* group were used for the push-out test and three for determining the proteolytic activity of the root dentin by in situ zymography. Bond strength data were submitted to ANOVA and Tukey tests and the existence of an association between the type of fracture and the independent variables of the study was determined by chi-square test ($\alpha=0.05$). None of the cross-linkers affected the bond strength. GD increased bond strength compared to PA, but both were similar to the control. Significant reduction in bond strength was observed between the cervical and the apical root thirds. Increase in the percentage of adhesive fractures between the glass fiber post and resin cement was observed for EDC and GD groups, in comparison with the control group, while for PA, an increase of adhesive fractures between the resin cement and dentin was observed. Intense gelatinolytic activity was seen in the control group which was remarkably reduced in the cross-linker-treated groups. In conclusion, besides not interfering with

bond strength, the cross-linkers reduced the proteolytic activity in the hybrid layers of the resin cement-root dentin bond.

Key-word: Tooth root. Dentin. Collagen. Cross-linking reagents. Metalloproteases. Tensile strength.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
3 PROPOSIÇÃO	39
4 MATERIAL E MÉTODO	40
5 RESULTADO	52
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67
ANEXO	76

1 INTRODUÇÃO

A principal causa de falhas adesivas é a degradação da camada híbrida (Spencer et al⁶⁰., 2010), formada pela impregnação monomérica dos espaços interfibrilares obtidos após a desmineralização da dentina (Nakabayashi et al³⁸., 1982; Van Noort et al⁶⁸., 1989; Van Noort et al⁶⁹., 1991; Reis et al⁴⁹., 2013). Essa estrutura é responsável pela retenção mecânica do material resinoso e pelo selamento da dentina (Nakabayashi et al³⁸., 1982). A presença de água residual na zona de dentina desmineralizada e a ação de proteases dentinárias (Carrilho et al⁷., 2009; Pashley et al⁴³., 2004; Tjäderhane et al⁶⁷., 2013; De Munck et al¹²., 2003; Mazzoni et al³³., 2012) são dois dos fatores que contribuem para a degradação da camada híbrida, comprometendo a estabilidade longitudinal da união resina-dentina.

O tecido dentinário é composto, em volume, por aproximadamente 45% de conteúdo mineral, 33% de conteúdo orgânico (em sua grande maioria, colágeno tipo I) e 22% de água (Tjäderhane et al⁶⁵., 2012). Após o condicionamento ácido, em torno de 10 µm de dentina superficial são desmineralizados (Scheffel et al⁵²., 2014). A composição dessa zona de dentina desmineralizada passa então a ser, em volume, de 30% de conteúdo orgânico e 70% de água (Pashley et al⁴⁵., 2011), uma vez que a fase mineral removida é substituída por água. A presença de água nessa matriz é importante para que a rede de fibrilas de colágeno expostas permaneçam expandidas, mantendo as vias para a difusão do sistema adesivo e formação da camada híbrida (Kanca²², 1992; Pashley et al⁴⁴., 2007) e impedindo a formação de novas ligações de hidrogênio entre cadeias peptídicas adjacentes (Pashley et al⁴⁴., 2007). Entretanto, a água possibilita a degradação do colágeno por hidrolases dentinárias endógenas como metaloproteinases da matriz (MMPs) e cisteína

catepsinas, e a degradação do componente resinoso (Carrilho et al⁷., 2009; Tjäderhane et al⁶⁷., 2013). Adicionalmente, a presença de água no momento da infiltração monomérica, viabiliza a separação entre monômeros hidrófilos e hidrófobos (Wang, Spencer⁷¹, 2003; Spencer et al⁵⁹., 2004), e influencia negativamente a conversão monomérica (Jacobsen, Söderholm²⁰, 1995), o que resulta na formação de camadas híbridas imperfeitas (Wang, Spencer⁷¹, 2003; Carvalho et al⁸., 2012).

A durabilidade da camada híbrida depende da resistência intrínseca dos seus constituintes aos processos de degradação (Tjäderhane et al⁶⁶., 2013). Entretanto, esses constituintes são susceptíveis aos fenômenos de degradação, hidrolítica, mediada unicamente pela ação da água, e enzimática, da qual a água também participa via hidrolases dentinárias (Frassetto et al¹⁴., 2016).

Algumas substâncias naturais e sintéticas vêm sendo utilizadas com o intuito de aumentar o número de ligações cruzadas (*cross-links*), que já existem naturalmente entre as moléculas e fibrilas de colágeno, e tornar o colágeno dentinário mais resistente a degradação (Han et al¹⁶., 2003; Charulatha, Rajaram¹⁰, 2003; Bedran-Russo et al²., 2007; Bedran-Russo et al³., 2008; Al-Ammar et al¹., 2009; Green et al¹⁵., 2010; Scheffel et al⁵³., 2014; Mazzoni et al³⁴., 2013; Mazzoni et al³⁵., 2014). Essas substâncias são conhecidas como agentes promotores de ligações cruzadas ou *cross-linkers*, sendo os mais amplamente investigados a carbodiimida (1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil] hidroclorito de carbodiimida) ou EDC, a proantocianidina (PA) e o glutaraldeído (GD) (Bedran-Russo et al³., 2008; Al-Ammar et al¹., 2009).

Além de promotores de ligações cruzadas, tem sido demonstrado que esses agentes são inibidores de MMPs e catepsinas dentinárias (Epasinghe et al¹³., 2013; Scheffel et al⁵²., 2014; Mazzoni et al³⁵., 2014; Tezvergüç-Mutluay et al⁶⁴., 2012). Esse

efeito anti-enzimático é exercido via silenciamento alostérico ou via alteração do sítio de ligação na molécula de colágeno (Scheffel et al⁵²., 2014; Tezvergil-Mutluay et al⁶⁴., 2012; Mazzoni et al³⁵., 2014). Como resultado, camadas híbridas produzidas na presença desses agentes são mais resistentes à degradação e apresentam maior estabilidade longitudinal (Han et al¹⁶., 2003; Charulatha, Rajaram¹⁰, 2003; Bedran-Russo et al²., 2007; Bedran-Russo et al³., 2008; Al-Ammar et al¹., 2009; Green et al¹⁵., 2010; Scheffel et al⁵³., 2014; Mazzoni et al³⁴., 2013; Mazzoni et al³⁵., 2014). Contudo, a maioria dos estudos demonstra esses resultados para dentina coronária, sendo escassas as informações quanto ao desempenho desses *cross-linkers* nas camadas híbridas formadas na dentina radicular (Shafiei et al⁵⁷., 2016; Cecchin et al⁹., 2015; Kalra et al²¹., 2013).

Pinos intrarradiculares são frequentemente utilizados para a reconstrução de dentes tratados endodonticamente com grande perda de estrutura coronária. A utilização de materiais adesivos para a cimentação desses pinos à dentina radicular baseia-se na premissa de que, além de minimizar a necessidade de preparo do conduto radicular resultando em perda adicional de tecido, a cimentação adesiva reforça a estrutura dentária remanescente e melhora a retenção de ambos, pino e restauração (Bouillaguet et al⁴., 2003). Entretanto, são várias as condições desfavoráveis no momento do estabelecimento da união material resinoso-dentina radicular. Entre elas, podem ser citadas, o uso de agentes químicos durante o tratamento endodôntico, o elevado fator de configuração cavitária (fator C) do conduto radicular, dificuldades no momento de evaporação do solvente, acesso limitado da luz nas porções mais profundas do canal para a adequada fotoativação do material resinoso e contaminação das paredes do conduto radicular pelo material obturador (Bouillaguet et al⁴., 2003).

Alternativas para melhorar a resistência e estabilidade da união resina-dentina radicular devem ser investigadas. Uma vez que dentina coronária e radicular diferem quanto à presença e concentração de MMPs (Santos et al⁵¹., 2009; Lee et al²⁷., 2013), além de possuírem diferentes propriedades mecânicas (Inoue et al¹⁹., 2009), é importante pesquisar se os efeitos positivos obtidos quando da utilização de *cross-linkers* no processo de adesão à dentina coronária também ocorrem quando da adesão à dentina radicular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Este capítulo contempla os artigos utilizados como fonte científica para respaldar a realização do presente trabalho, e abrange uma breve revisão dos temas: (2.1) composição do tecido dentinário, (2.2) colágeno tipo I, (2.3) metaloproteinases da matriz dentinária (MMPs), (2.4) estabelecimento da união resina-dentina, (2.5) agentes promotores de ligações cruzadas, e (2.6) união cimento resinoso-dentina radicular.

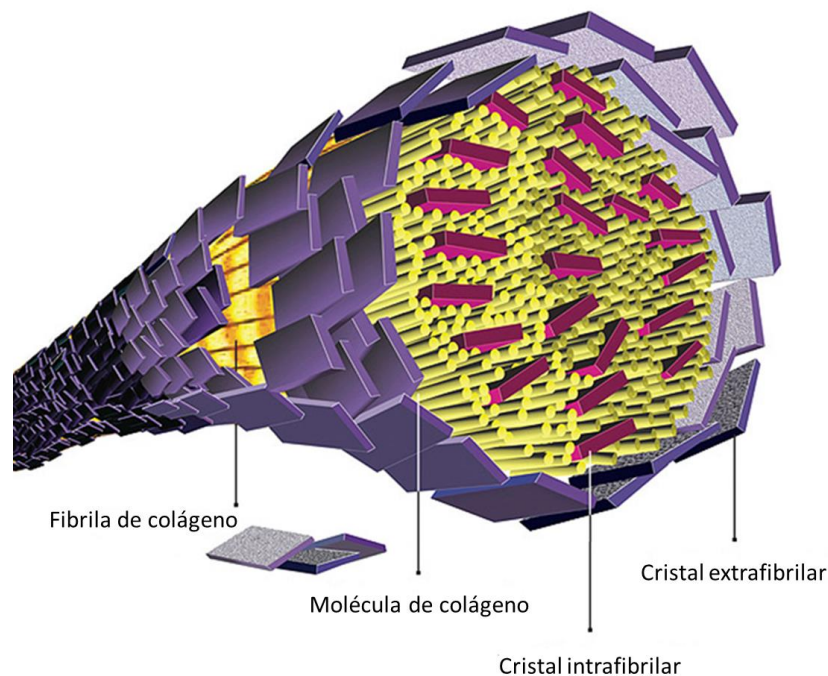
2.1 Composição do Tecido Dentinário

O tecido dentinário, ou simplesmente dentina, ocupa a maior parte do elemento dental. Esse tecido mineralizado e de morfologia heterogênea é composto, em volume, por 45% de conteúdo mineral, 33% de conteúdo orgânico e 22% de água. Em peso, esses valores são, 70%, 20% e 10%, respectivamente (Tjäderhane et al⁶⁵., 2012). A maior parte do conteúdo inorgânico do tecido está associado ao colágeno. Cristais de apatita formam partículas irregulares, semelhantes a placas, com espessura que varia entre 2,6 nm e 3,2 nm. A maioria dessas partículas estão orientadas aleatoriamente e apenas 20% delas apresentam uma orientação preferencial que é paralela à junção amelo-dentinária (Märten et al³⁰., 2010). Essas partículas estão localizadas dentro das fibrilas de colágeno (intrafibrilares) e entre essas fibrilas (interfibrilares) (Figura 1). Quando localizadas dentro das fibrilas de colágeno, o longo eixo dessas partículas acompanha as cadeias poliméricas que compõem as fibrilas e moléculas de colágeno (Märten et al³⁰., 2010). A mineralização intrafibrilar é importante para as propriedades mecânicas da dentina

(Kinney et al²⁴., 2003).

Noventa por cento do conteúdo orgânico da dentina é representado por colágeno tipo I, enquanto os demais 10% são representados por proteínas não-colagenosas e outras biomoléculas, as quais são expressas durante a síntese da matriz extracelular e aprisionadas no tecido dentinário após a finalização do processo de mineralização (Boskey et al⁵., 1991; Mazzoni et al³³., 2012).

Figura 1 - Representação esquemática de uma fibra de colágeno, formada pelo empacotamento de várias fibrilas. Localização intrafibrilar e extrafibrilar de cristais de apatita.



Fonte: Imagem reproduzida de Liu et al²⁸., 2011.

Dentre as proteínas não colagenosas da dentina encontram-se as metaloproteinases da matriz e as cisteínas catepsinas, responsáveis pela atividade proteolítica do tecido e diretamente envolvidas no processo de degradação do colágeno dentinário.

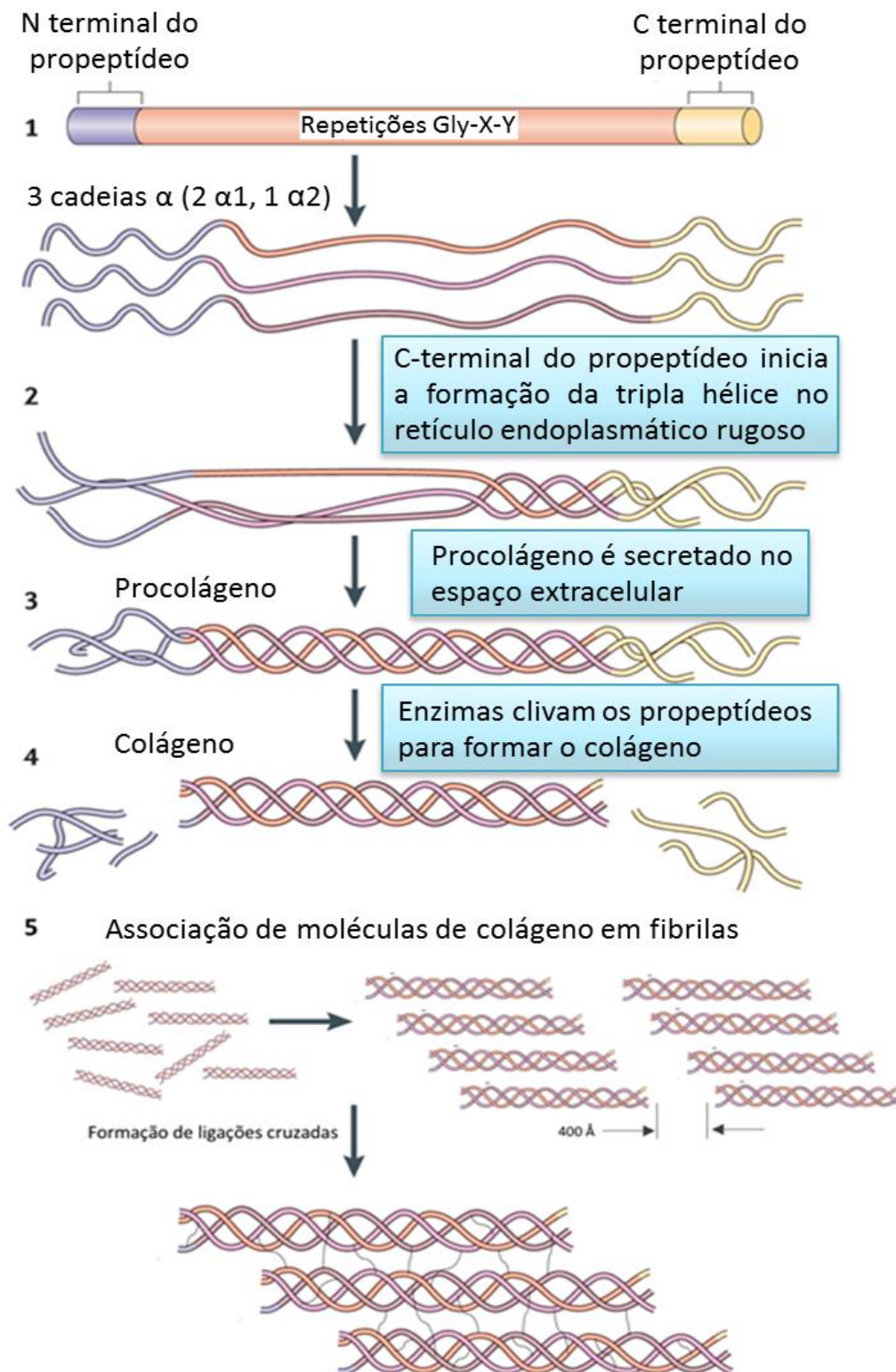
2.2 Colágeno Tipo I

Entre os nove tipos de colágeno existentes, o do tipo I é o que predomina nos tecidos do corpo humano, apresentando repetidas sequências de aminoácidos Gly-X-Y, onde comumente X é uma prolina e Y é uma hidroxiprolina (Panwar et al⁴²., 2013). Cada molécula de colágeno do tipo I é um bastão pequeno e rígido, podendo alcançar 300 nm de comprimento por 1,5 nm de largura, formada pelo entrelaçamento em tripla hélice de três cadeias polipeptídicas chamadas cadeias alfa, sendo elas: duas cadeias $\alpha 1$ e uma $\alpha 2$ (Figura 2) (Brodsky, Ramshaw⁶, 1997). Essas moléculas são secretadas por células como fibroblastos e odontoblastos, na forma de procolágeno solúvel, que possui em sua extremidade estruturas peptídicas contendo um terminal nitrogênio (N-) e um terminal carbono (C-) (Brodsky, Ramshaw⁶, 1997). Posteriormente esses terminais são clivados por N- e C-peptidases, dando início ao processo de fibrilogênese, por meio da formação do tropocolágeno (Figura 2) (Mouw et al³⁷., 2014).

Naturalmente, as moléculas de colágeno, na forma de tropocolágeno, se unem interna e externamente, por meio de ligações cruzadas (*cross-links*), para formar as fibrilas de colágeno (Figura 2) (Mouw et al³⁷., 2014). Esses *cross-links* são ligações peptídicas covalentes (C-N) entre os grupos aldeído e amino livres (Mouw et al³⁷., 2014). A presença de *cross-links* endógenos, inter e intra-moleculares, são responsáveis pela estabilidade, viscoelasticidade e resistência destas estruturas fibrilares (Charulatha, Rajaram¹⁰, 2003).

O colágeno dentinário é um componente importante no processo de união de materiais resinosos à dentina, e a combinação dessa proteína dentinária com monômeros do sistema adesivo resulta na formação da camada híbrida (Nakabayashi et al³⁸., 1982; Van Noort et al⁶⁸., 1989; Van Noort et al⁶⁹., 1991; Reis

Figura 2 - Processo de formação e organização das fibrilas de colágeno.

Molécula de colágeno padrãoFonte: Adaptado de Mouw et al³⁷, 2014.

et al⁴⁹., 2013), principal estrutura responsável pela microretenção mecânica a esse substrato. Entretanto, o colágeno dentinário está sujeito a degradação deflagrada pela ação da água e mediada por proteases do próprio tecido (Carrilho et al⁷., 2009).

2.3 Metaloproteinases da matriz dentinária (MMPs)

A atividade proteolítica da dentina foi descrita pela primeira vez por Dayan et al. em 1983 (apud Tjäderhane et al⁶⁶., 2013). As proteases dentinárias que atuam na degradação do colágeno são classificadas como hidrolases, ou seja, enzimas que degradam por meio da adição de água, gerando a quebra de ligações peptídicas ou de éster (Hannas et al¹⁷., 2007; Frassetto et al¹⁴., 2016). São elas as metaloproteinases da matriz (MMP) e cisteínas catépsinas.

Metaloproteinases da matriz são uma família de mais de 20 proteases derivadas do hospedeiro, dependentes de Zn^{2+} e Ca^{2+} , capazes de degradar praticamente todos os componentes da matriz extracelular (Page-McCaw et al⁴¹., 2007). Estas são sintetizadas e secretadas como pró-enzimas inativas, onde a presença de um pró-domínio inibe a atividade funcional do domínio catalítico, por meio da formação de uma ponte entre uma cisteína presente no pró-domínio com o zinco do domínio catalítico (Van Wart et al⁷⁰., 1990). Sua ativação ocorre quando esta ligação é interrompida por meio de clivagem proteolítica por outras MMPs, cisteínas catépsinas ou outras proteases (Page-McCaw et al⁴¹., 2007). Na dentina humana já foram identificadas as MMPs -2, -3, -8, -9, -13 e -20 (Boskey⁵, 1991; Sulkala et al⁶²., 2002; Mazzoni et al³¹., 2007; Sulkala et al⁶³., 2007; Mazzoni et al³²., 2011).

Um dos mecanismos propostos para explicar como as MMPs degradam o

colágeno é que estas proteases possuem a capacidade de desfazer a conformação helicoidal das moléculas de colágeno do tipo I. Assim, o sítio ativo das collagenases (MMP-1, -8, -13) e MMP-2 (gelatinase) catalisam a reação de quebra do colágeno em fragmentos de $\frac{1}{4}$ e $\frac{3}{4}$ especificamente na ligação peptídica glicina-isoleucina. Os fragmentos sofrem desnaturação a temperatura corporal, e são então degradados por gelatinases (MMP-2 e -9) e outras proteases não-específicas (Perumal et al⁴⁶, 2008).

2.4 Estabelecimento da união resina-dentina

A principal responsável pela retenção micromecânica das restaurações resinosas e também pelo selamento dentinário é a camada híbrida, resultante da impregnação monomérica dos espaços interfibrilares produzidos pela remoção dos minerais, quando submetida ao condicionamento ácido (Nakabayashi et al³⁸, 1982). Contudo, esta camada é também a estrutura que apresenta a maior porcentagem de falhas e concentração de tensões, causadas por cargas de tração e cisalhamento (Van Noort et al⁶⁸, 1989; Van Noort et al⁶⁹, 1991; Reis et al⁴⁹, 2013) e pelo coeficiente de expansão térmico inerente às resinas compostas (Lee et al²⁶, 2001).

A união material-dentina enfrenta desafios a partir do momento de seu estabelecimento. Esses desafios estão relacionados às características do próprio substrato dentinário, como heterogeneidade estrutural e morfológica, além da presença de umidade proveniente da exsudação do fluído dentinário (De Munck et al¹², 2003). Adicionalmente, também são complicadores, as características inerentes aos materiais restauradores, como a contração de polimerização observada para os compósitos resinosos (Ilie et al¹⁸, 2006). Em longo prazo, essas

interfaces são continuamente desafiadas pelos esforços mastigatórios, alterações de temperatura, umidade e reações químicas diversas impostas pelo ambiente bucal (De Munck et al¹²., 2003).

O encapsulamento total das fibrilas de colágeno expostas, após o condicionamento ácido, por monômeros resinosos promoveria a proteção deste colágeno contra a degradação. Em outras palavras, todo conteúdo mineral removido (cristais de apatita) deveria ser repostado pelo sistema adesivo. No entanto, a capacidade de infiltração monomérica é inferior à profundidade de desmineralização da dentina, resultando na formação de uma zona de dentina desmineralizada não reforçada por resina na base da camada híbrida (Nakabayashi et al³⁸., 1982; Wang, Spencer⁷¹, 2003; Spencer et al⁵⁹., 2004). A presença desta região não mineralizada já foi observada tanto para sistemas convencionais (Wang, Spencer⁷¹, 2003; Spencer et al⁵⁹., 2004) como para sistemas auto-condicionantes (Oliveira et al⁴⁰., 2004).

A discrepância entre a profundidade da desmineralização da dentina e a infiltração de monômeros ocorre devido a um conjunto de fatores: (1) redução gradual dos espaços interfibrilares a partir da superfície da dentina desmineralizada, (2) peso molecular dos monômeros que compõem os sistemas adesivos, (3) grau de hidrofília desses monômeros e (4) conteúdo de água presente na dentina desmineralizada (Spencer, Wang⁵⁸, 2002; Spencer et al⁵⁹., 2004; Pashley et al⁴⁵., 2011; Carvalho et al⁸., 2012). Como consequência da ação conjunta desses fatores, é observado o fenômeno de separação de fases (Spencer, Wang⁵⁸, 2002) e exposição de fibrilas de colágeno. Essas fibrilas desnudas de reforço mineral e/ou monomérico são alvo da ação das proteases dentinárias (MMPs e catepsinas) e inicia-se o processo de degradação enzimática do colágeno (Pashley et al⁴³., 2004).

2.5 Agentes promotores de ligações cruzadas

A engenharia tecidual tem utilizado algumas substâncias, naturais e sintéticas, para aumentar o número de ligações cruzadas (*cross-links*) das moléculas e fibrilas de colágeno (ligações exógenas) (Han et al¹⁶., 2003), visando melhorar suas propriedades mecânicas e a resistência à degradação hidrolítica e enzimática (Bedran-Russo et al²., 2007; Han et al¹⁶., 2003). Dentre estas substâncias, denominadas de agentes promotores de ligação cruzada (*cross-linkers*), estão o glutaraldeído (GD), a proantocianidina (PA) e a carbodiimida (1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil] hidroclorito de carbodiimida ou EDC) (Bedran-Russo et al³., 2008; Al-Ammar et al¹., 2009).

De forma geral, esses *cross-linkers* enrijecem as cadeias polipeptídicas do colágeno, por meio do estabelecimento de novas ligações cruzadas, impedindo que essas cadeias percam sua conformação helicoidal. Além disso, eles também inativam o sítio ativo de proteases por meio da criação de novas ligações peptídicas entre peptídeos adjacentes (Liu et al²⁸., 2011). Embora o efeito final de todos esses agentes sobre o colágeno seja o aumento do número de ligações cruzadas, a forma de reagir quimicamente com essa proteína difere entre eles.

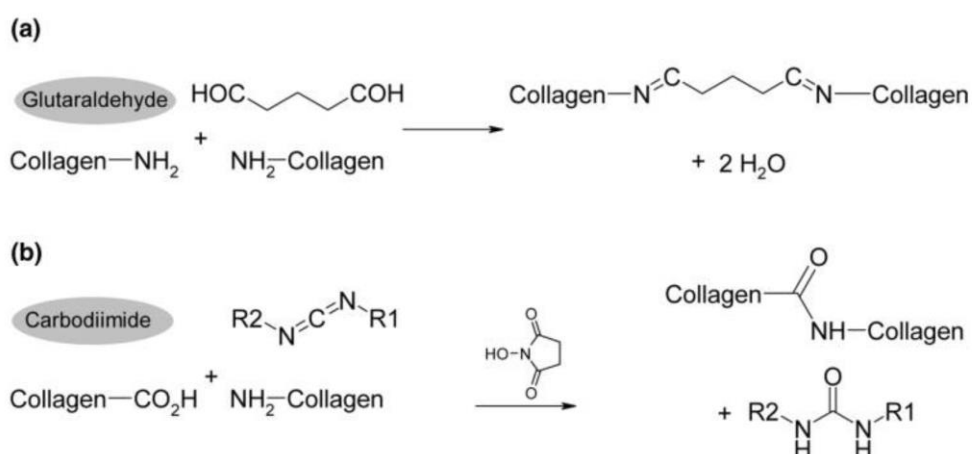
O glutaraldeído é um *cross-linker* sintético utilizado como fixador de tecido biológico que afeta as propriedades mecânicas destes tecidos, por meio da formação de ligações cruzadas do tipo bases de Schiff, ao reagir com o grupo ϵ -amino de lisina e hidroxilisina (Cheung et al¹¹., 1985). Contudo, o seu uso gera muita discussão devido ao seu potencial tóxico em altas concentrações (Ryu et al⁵⁰., 2013). Scheffel et al⁵⁵. (2015) demonstraram que o uso de uma solução que contém 2, 5 ou 10% de GD, aplicada por 60 segundos em discos de dentina de 0,4 mm de espessura, após o condicionamento ácido, não exerce efeitos negativos às células

odontoblastóides MDPC-23.

A carbodiimida ou EDC é um *cross-linker* sintético que se liga inespecificamente a proteínas. Ele possui a capacidade de ativar o grupo carboxila dos ácidos glutâmico e aspártico presentes nas cadeias proteicas (Figura 3), sendo um isômero de cianamida mais estável, capaz de agregar aminoácidos em peptídeos, resultando em *cross-links* sem grupos reativos residuais (Olde Damink et al³⁹, 1996). Recentemente o EDC também foi testado quanto a sua citotoxicidade transdentinária, sendo que os resultados demonstraram que a utilização do mesmo, nas concentrações 0,1, 0,3 e 0,5 M, não alterou a capacidade de resposta de células odontoblastóides (Scheffel et al⁵⁴, 2015).

Mazzoni et al.³⁵ (2014) utilizaram as técnicas de zimografia in situ para avaliar a capacidade do EDC em inibir a atividade de metaloproteinases da matriz (MMP). Os resultados da zimografia in situ demonstraram que as camadas híbridas do controle exibiram intensa atividade gelatinolítica, enquanto quase nenhum sinal de fluorescência foi detectado quando as amostras foram pré-tratadas com EDC 0,3 M.

Figura 3 - Mecanismo de reação da carbodiimida (EDC) e do glutaraldeído com o colágeno.

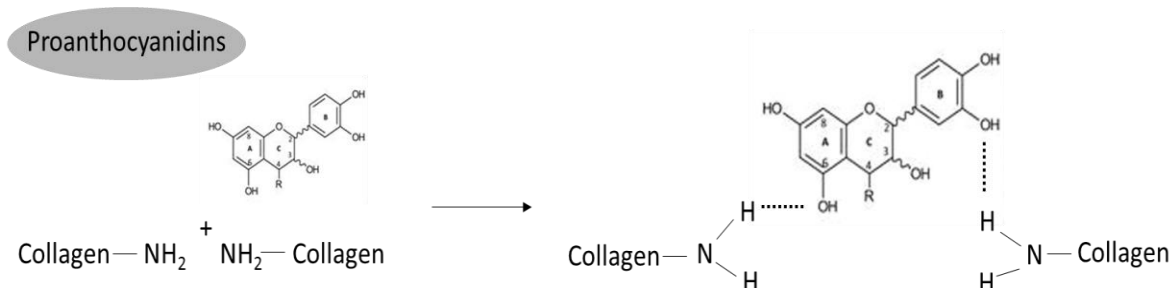


Fonte: Elaboração própria.

Proantocianidinas (PAs) são metabólitos naturais secundários do reino vegetal e são encontradas em frutas, vegetais, castanha, sementes e flores, sendo que o cacau e seus produtos, além de semente de uva, estão entre as mais ricas fontes de PAs (Han et al¹⁶., 2003). Existem quatro diferentes teorias para explicar como a PA interage com as proteínas: formação de ligações covalentes (Pierpoint⁴⁷, 1969), ligações iônicas (Loomis²⁹, 1974), pontes de hidrogênio (Ku et al²⁵., 2007), e interações hidrofóbicas (Han et al¹⁶., 2003) (Figura 4). Sua segurança biológica foi comprovada in vitro sobre células odontoblastóides MDPC-23 nas concentrações de 1, 5 e 10%, quando aplicada sobre discos de dentina com espessura de 0,4 mm (dados não publicados).

Bedran-Russo et al²., em 2007, avaliaram o efeito de três agentes de ligação cruzada [5% de GD, 0,5% de solução de PA, e solução genipina 0,625% (GE)] na resistência máxima à tração da dentina não desmineralizada e desmineralizada. Os autores concluíram que os agentes promotores de ligação cruzada melhoraram significativamente a resistência de união em dentina desmineralizada, o que indicou que seu uso seria promissor na odontologia restauradora.

Figura 4 - Mecanismo de reação da proantocianidina (PA) com o colágeno. Proantocianidinas (PAs) e colágeno formam complexos estabilizados principalmente por ligações de hidrogênio entre o grupo amida do colágeno e a hidroxila fenólica das PAs e, também, por ligações hidrofóbicas e covalentes.



Fonte: Elaboração própria.

Com o objetivo de comparar a diferença de camadas híbridas produzidas na presença de extrato de semente de uva (PA), Green et al¹⁵. (2010) formularam dois adesivos experimentais (com e sem 5% de PA) e os utilizaram em espécimes de dentina desmineralizados. Por meio de imagens de microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão os autores mostraram a presença de fibrilas de colágeno intactas e organizadas para espécimes que utilizaram adesivo contendo PA, enquanto que para os espécimes sem adição de PA, observou-se degradação e desorganização dessas fibrilas.

2.6 União cimento resinoso-dentina radicular

Estudos prévios já demonstraram a eficácia da utilização de *cross-linkers* na inibição da degradação de colágeno da dentina coronária (Han et al¹⁶., 2003; Charulatha, Rajaram¹⁰, 2003; Bedran-Russo et al²., 2007; Bedran-Russo et al³., 2008; Al-Ammar et al¹., 2009; Green et al¹⁵., 2010; Scheffel et al⁵²., 2014; Mazzoni et al³⁴., 2013; Mazzoni et al³⁵., 2014). Todavia, ainda não há evidências científicas na literatura quanto ao seu desempenho na dentina radicular. Dentina coronária e radicular diferem em vários aspectos. A dureza e módulo de elasticidade são menores para a dentina radicular (Inoue et al¹⁹., 2009), enquanto que a expressão de MMP-13 é maior na dentina radicular de dentes com lesões de cárie profundas em dentina (Lee et al²⁷., 2013). Ambas as dentinas, radicular e coronária, apresentam atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 e, colagenolítica de MMP-8, porém, enquanto MMP-8 está distribuída de forma similar para as duas dentinas, a atividade de MMP-2 foi mais intensa na dentina radicular e a de MMP-9 na dentina coronária (Santos et al⁵¹., 2009).

Além de diferenças quanto às propriedades mecânicas e atividade

proteolítica em relação à dentina coronária, a adesão à dentina radicular, como no caso de cimentação de pinos intrarradiculares, sofre grande influência de fatores relacionados ao formato do conduto radicular (fator de configuração cavitária elevado), limitação quanto à transmissão da luz para fotopolimerização, possível incompatibilidade entre cimento e sistema adesivo, possíveis alterações causadas pelos agentes de irrigação durante o procedimento endodôntico e contaminação pelo material de obturação radicular, como cimentos endodônticos à base de eugenol (Bouillaguet et al⁴., 2003).

Kalra et al²¹., 2013 investigaram o efeito da proantocianidina (PA) na resistência à degradação da dentina radicular desmineralizada e na resistência de união entre cimento endodôntico à base de resina e dentina radicular. Pré-molares unirradiculares que foram instrumentados e preenchidos com RealSeal SE, seccionados em fatias de 1 mm de espessura a partir terços médio e coronal e armazenados durante 1 semana ou 3 meses em água destilada. As amostras foram submetidas ao teste de extrusão e o terço apical foi visualizado por microscopia eletrônica de varredura. Raízes não preenchidas com material foram cortadas, desmineralizadas, pré-tratadas ou não e expostas à colagenase por 24h para determinar a liberação de hidroxiprolina. O armazenamento de 3 meses diminuiu a resistência de união em comparação com uma semana, para todos os grupos. No entanto, essa redução foi menor para as amostras tratadas com PA. MEV revelou mais resina intacta nas interfaces com PA, após 3 meses. Além disso, a liberação de hidroxiprolina foi significativamente menor para as amostras tratadas.

Recentemente alguns pesquisadores utilizaram diferentes métodos para aumentar a durabilidade das interfaces cimento resinoso-dentina radicular. Em 2015, Cecchin et al⁹., investigaram os efeitos de um extrato de semente de uva na

resistência de união e estabilidade da adesão de pinos de fibra para a dentina radicular com 2 sistemas adesivos: um de condicionamento total (adesivo convencional) e um sistema adesivo auto condicionante. Os autores testaram duas concentrações de PA, 6,5 e 10%, por 5 minutos para o teste de extrusão que foi realizado imediatamente e após 12 meses. O teste de zimografia foi realizado para avaliar a inibição de metaloproteinases da matriz por meio das concentrações de 0,65%, 0,065%, 0,0065% de PA. Resultados positivos para a resistência de união após 12 meses de envelhecimento foram observados e o teste de zimografia mostrou reduzida atividade de metaloproteinase da matriz para os grupos tratados com PA.

Com o intuito de se investigar a utilização do agente de ligação cruzada carbodiimida (EDC) na estabilidade da união entre pinos de fibra de vidro cimentados com três diferentes cimentos resinosos Shafiei et al⁵⁷., em 2016 utilizaram raízes de incisivos centrais humanos aleatoriamente divididos em seis grupos. Após um ano de armazenamento, as amostras foram submetidas ao teste de resistência de união push-out (RU). O pré-tratamento com EDC não interferiu na união imediata dos três cimentos ($p > 0,05$), enquanto que o envelhecimento reduziu significativamente a RU em todos os grupos ($p \leq 0,001$). Os autores observaram que os grupos tratados com EDC exibiram valores de RU maiores em comparação com os respectivos grupos controle ($p < 0,001$). Assim eles concluíram que o EDC poderia melhorar a estabilidade da união para os três cimentos testados.

Contudo, os dados na literatura são escassos e não é de conhecimento, até o momento do desenvolvimento do presente trabalho, de pesquisas utilizando GD na dentina radicular. Sendo assim, baseado nos resultados positivos obtidos para a dentina coronária (Han et al¹⁶., 2003; Charulatha, Rajaram¹⁰, 2003; Bedran-Russo et

al²., 2007; Bedran-Russo et al³., 2008; Al-Ammar et al¹., 2009; Green et al¹⁵., 2010; Scheffel et al⁵³., 2014; Mazzoni et al³⁴., 2013; Mazzoni et al³⁵., 2014), justifica-se a investigação dos possíveis efeitos da aplicação dos *cross-linkers* sobre a resistência da união cimento resinoso-dentina radicular.

3 PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o efeito de três agentes promotores de ligações cruzadas (*cross-linkers*), carbodiimida, proantocianidina e glutaraldeído, em propriedades da união cimento resinoso-dentina radicular.

Objetivos Específicos

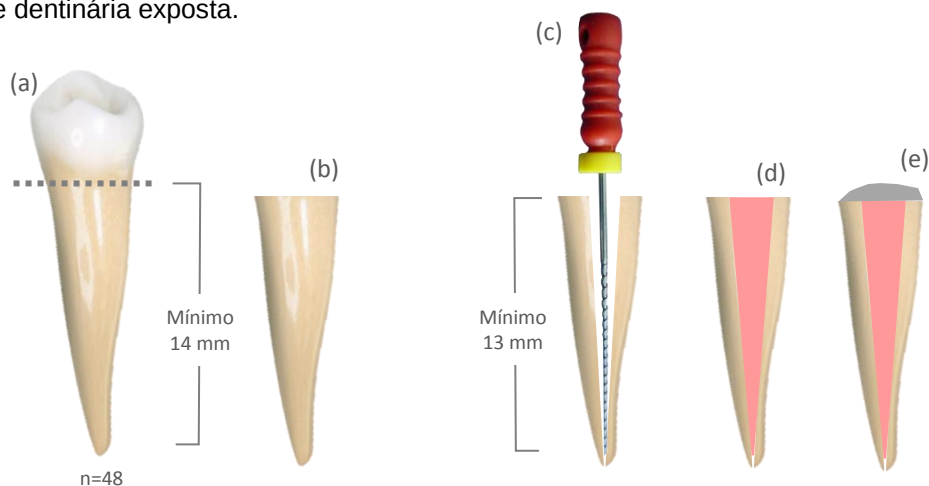
1. Avaliar o efeito da utilização dos *cross-linkers* na resistência de união imediata da interface cimento resinoso-dentina radicular;
2. Avaliar o efeito dos *cross-linkers* na atividade proteolítica, in situ, da dentina radicular.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Obtenção das raízes unirradiculares

Foram obtidas quarenta e oito (n=48) raízes de pré-molares humanos unirradiculares (Figura 5a/b), oriundos do Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr - UNESP, após aprovação deste protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara (CAAE: 34373314.6.0000.5416, Anexo). Os dentes foram individualmente radiografados para confirmação da presença de apenas um canal radicular e para detectar qualquer irregularidade do mesmo, como canal excessivamente curvo ou presença de nódulos mineralizados. O comprimento das raízes foi determinado utilizando um paquímetro digital (Modelo 500-144B, Mitutoyo Sul América Ltda., SP, Brasil), sendo que para o estudo foram selecionadas raízes com no mínimo 14 mm de comprimento.

Figura 5 - Representação esquemática (a) de um dente pré-molar unirradicular, (b) do remanescente radicular após secção da porção coronária e (c) lima endodôntica no interior do conduto radicular. O comprimento de trabalho foi de 1 mm aquém do ápice anatômico. (d) Conduto radicular obturado com guta percha e cimento endodôntico resinoso e (e) material selador provisório aplicado na superfície dentinária exposta.



Fonte: Elaboração própria.

As raízes foram separadas das coroas dentárias por meio de um corte transversal realizado a 1 mm da junção amelo-cementária no sentido do ápice radicular. A secção foi realizada por meio de um disco diamantado com 0,3 mm de espessura, acoplado a uma cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buheler, Lake Bluff, IL, EUA), e refrigerado com água. Trinta e seis (n=36) raízes foram aleatoriamente selecionadas para o ensaio mecânico de extrusão (*push-out*) e doze (n=12) para o teste de zimografia in situ, totalizando 48 raízes.

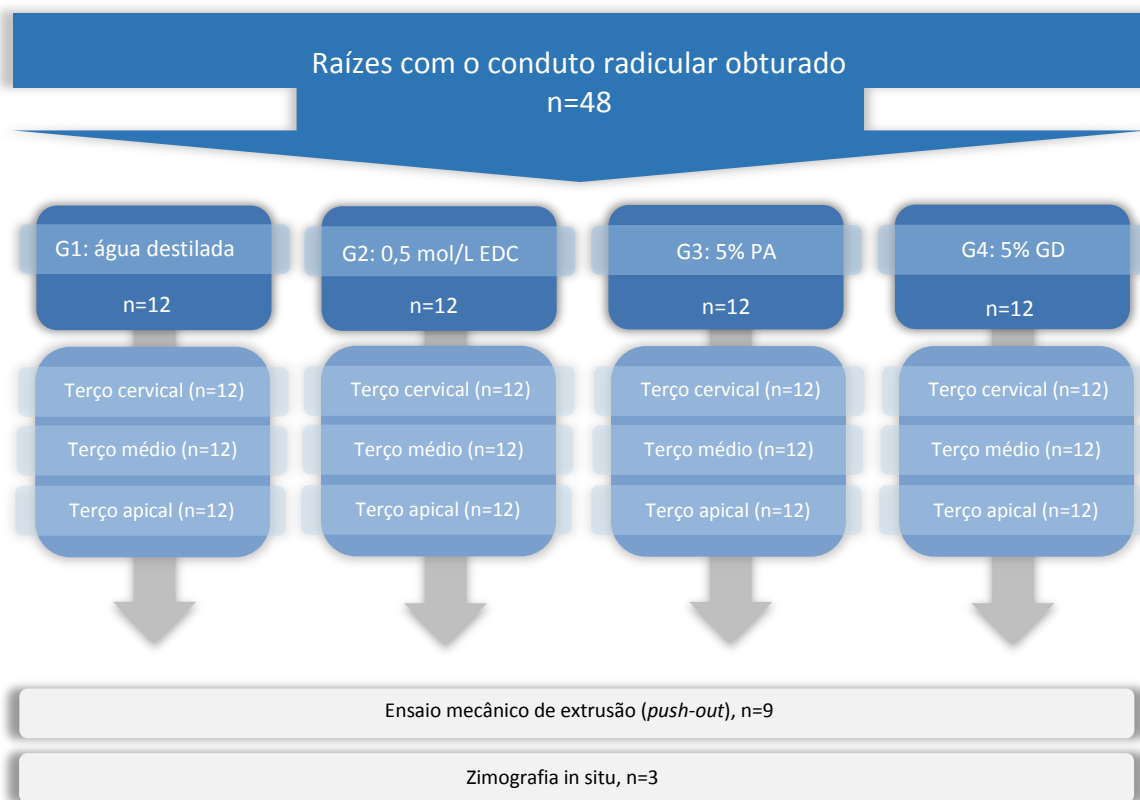
4.2 Tratamento endodôntico

Os canais foram submetidos ao preparo químico-mecânico, realizado por um mesmo operador, utilizando a técnica *step-back*, por meio de instrumentos endodônticos Kerr (Dentsply/Maillefer, Suíça), até o número K35 (Figura 5c). A cada troca de instrumento, o conduto foi abundantemente irrigado com solução de hipoclorito de sódio (NaClO 2,5%). Em seguida, o conduto foi seco com cones de papel nº 35 (Dentsply/Maillefer, Suíça ou Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) e irrigado com solução de EDTA por 3 minutos (sob agitação), seguida de nova irrigação com NaClO, sucção e secagem do conduto. Ao final do preparo químico-mecânico, os canais foram obturados com guta-percha (Figura 5d), combinada com cimento endodôntico resinoso AH Plus™ (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemanha). A seguir, as raízes foram radiografadas novamente para confirmação da qualidade da terapia endodôntica.

Um material selador provisório (Villevie; Dentalville do Brasil Ltda, Joinville, SC, Brasil) foi utilizado para cobrir a superfície dentinária dos espécimes (Figura 5e) e proteger o material obturador. Os dentes foram armazenados em estufa por 1

mês, em 100% de umidade, a 37°C. Após o período de armazenagem, as raízes foram aleatoriamente distribuídas nos 4 grupos (n=12) experimentais do projeto (Figura 6).

Figura 6 - Fluxograma do desenho experimental. Quarenta e oito (n=48) raízes com o conduto radicular obturado foram aleatoriamente divididas em 4 grupos. Cada grupo foi futuramente subdividido em 3 grupos de acordo com o terço do conduto radicular. Nove raízes foram submetidas ao ensaio mecânico de extrusão, enquanto que as 3 raízes restantes foram utilizadas para a zimografia in situ. EDC, carbodiimida; PA, proantocianidina; GD, glutaraldeído.



Fonte: Elaboração própria.

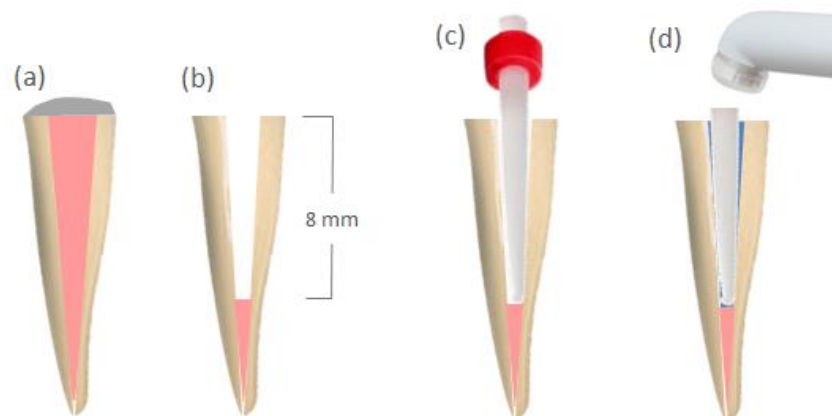
4.3 Adaptação do pino intracanal

Após o período de armazenamento (30 dias), os canais foram preparados para receber o pino de fibra de vidro. A remoção do material obturador foi realizada

com instrumentos para remoção de guta-percha (Gates-Glidden, Dentsply/Maillefer, Suíça) e a profundidade de preparo para cada raiz foi de no mínimo 8 mm (Figura 7a e 7b). Uma vez concluída a remoção do material obturador (Figura 7b), um instrumento rotatório do kit White Post[®] DC1 foi utilizado para ampliar o conduto de tal forma a padronizar a adaptação do pino. Os condutos radiculares foram então irrigados com 5 mL de água destilada para remoção de eventuais resíduos e foram secos com cones de papel (Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil).

Pinos de fibra de vidro White Post[®] DC1 (Figura 7c) foram utilizados, associados ao sistema de cimentação RelyX ARC (3 M ESPE, Seefeld, Alemanha). Antes de sua inserção, cada pino foi submetido a desinfecção com etanol (70% vol.) por 60 segundos e depois completamente seco ao ar. A adaptação do pino ao canal radicular preparado foi verificada por meio de nova tomada radiográfica digital.

Figura 7 - Representação esquemática (a) de um dente pré-molar unirradicular com conduto obturado, (b) porção do conduto radicular que foi desobturada (8 mm), (c) pino de vidro no interior do conduto radicular preparado e (d) fotopolimerizador posicionado para a foto-ativação do cimento resinoso.



Fonte: Elaboração própria.

4.4 Aplicação dos *cross-linkers* e cimentação do pino intracanal

A dentina radicular foi condicionada com ácido fosfórico 35% na forma de gel (Ultra-Etch, Ultradent, TX, EUA) por 15 segundos, seguido de lavagem com 5 mL de água destilada por 10 segundos. O condicionamento e o procedimento de lavagem foram realizados com auxílio de seringas de irrigação intrarradicular (NaviTip®, Ultradent, TX, EUA). Após a remoção do excesso de água com cones de papel absorvente, as raízes foram tratadas por 60 segundos (Scheffel et al⁵²., 2014; Scheffel et al⁵³., 2014) com: água deionizada (controle); solução de EDC 0,5 mol/L (9,6%); solução de PA 5% ou solução de GD 5% (Figura 6)(Tabela 1). Decorridos os 60 segundos, os condutos foram irrigados com água deionizada por 10 segundos e novamente secos com cones de papel absorvente. Em seguida, o sistema adesivo Adper Single Bond 2 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) foi aplicado, com auxílio de um microbrush (Brush Fine, KG Sorensen, Cotia, São Paulo, BR), em duas camadas consecutivas, seguido da evaporação dos solventes com leve jato de ar por 10 segundos (distância de 10 cm). O sistema adesivo foi fotoativado por 20 segundos com uma unidade de polimerização de luz LED (Radii Plus, SDI, Austrália), cuja irradiância foi averiguada imediatamente antes de sua utilização com radiômetro (ca. 1000 mW/cm², L.E.D. Radiometer by Demetron, Kerr Corporation, Middleton, WI, USA).

Logo após a aplicação do adesivo, o cimento de cura dual Rely X ARC (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) foi manipulado numa proporção de 1:1 (v/v), conforme as recomendações do fabricante, inserido no conduto radicular com auxílio de uma sonda exploradora número 5 e aplicado sobre a superfície dos pinos previamente tratados com RelyX Ceramic Primer (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA). Após adaptação no conduto radicular, o material excedente foi removido com auxílio de

sonda exploradora número 5, mantendo um adequado selamento ao redor da porção cervical da raiz. O cimento resinoso foi então fotoativado por 40 segundos. A ponta do fotopolimerizador foi colocada em contato direto com a extremidade coronária do pino (Figura 7d), fazendo com que a luz pudesse ser transmitida para dentro do canal radicular por meio do próprio pino de fibra de vidro (Kim et al²³, 2009). Por fim, os dentes foram armazenados em estufa a 37 °C e 100% de umidade relativa, por 24 horas.

Tabela 1 - Princípio ativo, fabricante, mistura e pH das soluções de tratamento da dentina radicular.

Grupo	Princípio ativo	Fabricante	Mistura/pH
GA 5%	Glutaraldeído	Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, EUA	- 0,5 mL de GA 50% - 4,5 mL de água deionizada* pH 6,4
EDC 0,5 mol/L	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida	Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, EUA	- 0,96 g de EDC - 10 mL de água deionizada pH 6,0
PA 5%	Proantocianidina (extraída da semente da espécie <i>Vitis vinífera</i>)	Shaanxi Sinuot Biotech Co. Ltd., Shaanxi, China	- 0,25 g PA - 5 mL de água deionizada pH=5,5

* pH da água deionizada = 8.7

Fonte: Elaboração própria.

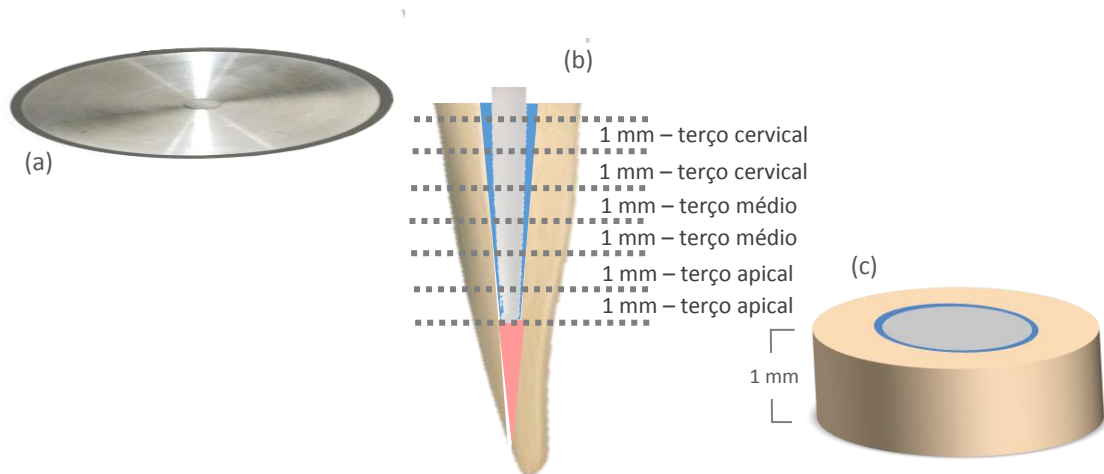
4.5 Ensaio mecânico de extrusão (push-out)

Por meio de um disco diamantado de 0,3 mm de espessura (Figura 8a) acoplado a uma cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), sobre refrigeração com água, duas amostras foram obtidas de cada terço do conduto radicular (cervical, médio e apical), a partir de cortes transversais das

raízes (Figura 8b). Para isso, as raízes foram fixadas com godiva em um suporte de madeira, possibilitando sua estabilidade durante o momento do corte, que deveria ser feito a partir de uma distância de 1 mm da extremidade coronal da raiz (Figura 8b), obtendo assim 6 discos de 1 mm de espessura (Figura 8c).

Um espécime de cada terço radicular foi utilizado no presente estudo e foram submetidos ao ensaio mecânico de extrusão ou *push-out* imediatamente após sua obtenção. Para o teste de *push-out*, foi utilizada uma máquina de ensaios (DL-Digital Line, EMIC, Paraná, Brasil), equipada com célula de carga de 200 N e operando na velocidade de 1,0 mm/min. Os discos de dentina foram posicionados na máquina de tal forma que a superfície contendo o menor diâmetro de conduto radicular ficasse voltada para cima (Figura 9a). Uma ponta metálica de diâmetro de 1 mm (para os discos obtidos dos terços cervical e médio) ou 0,8 mm (terço apical), acoplada à máquina de ensaios, foi posicionada na porção central dessa superfície de tal forma que entrasse em contato apenas com o pino de fibra de vidro (Figura 9b), e, portanto, estivesse livre para deslocá-lo apicalmente (Figura 9c). Os movimentos 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 a amostra fosse extruída, quando o movimento era cessado e os valores de carga máxima registrados em Newtons (N).

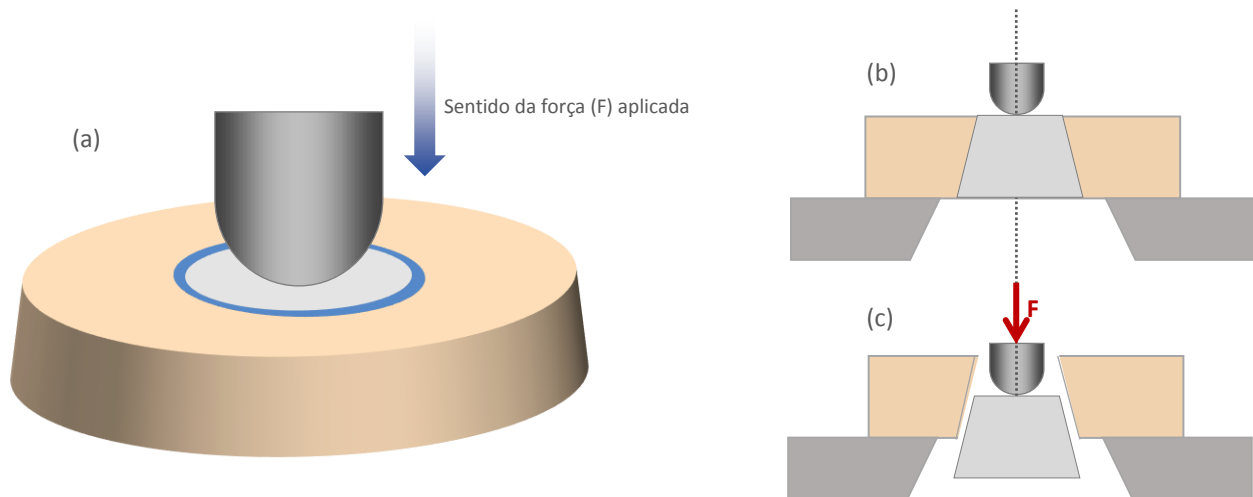
Figura 8 - Representação esquemática (a) de um disco de diamante para a realização dos cortes, (b) dos cortes realizados nas raízes, resultando em 6 fragmentos, sendo um deles em maior detalhe demonstrado na imagem (c). (c) Amostra na forma de disco, com 1 mm de espessura, obtido após a secção do conduto radicular.



Fonte: Elaboração própria.

A resistência de união, em MPa, foi calculada dividindo a carga de ruptura (N) pela área total da união cimento resinoso-dentina radicular. Este cálculo foi realizado utilizando a seguinte fórmula: $A = \pi (r_1 + r_2) \sqrt{(r_1 - r_2)^2 + h^2}$. Nesta fórmula, π é a constante de 3,14, r_1 é o raio do conduto cervical, r_2 é o raio do conduto apical e h é a espessura do disco em milímetros (Mosharraf, Ranjbarian³⁶, 2013). Os diâmetros maior (face cervical) e menor (face apical) de cada secção foram mensurados utilizando estereomicroscópio, com magnificação de 20x (Mod SZX7, Olympus, São Paulo, Brasil) e o programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Maryland, USA).

Figura 9 - Representação esquemática (a) de uma amostra obtida da raiz após cimentação do pino de fibra de vidro e do posicionamento da ponta metálica acoplada à máquina de ensaios mecânico, (b) vista lateral da mesma amostra e (c) extrusão do pino de fibra de vidro que estava cimentado as paredes dentinárias.

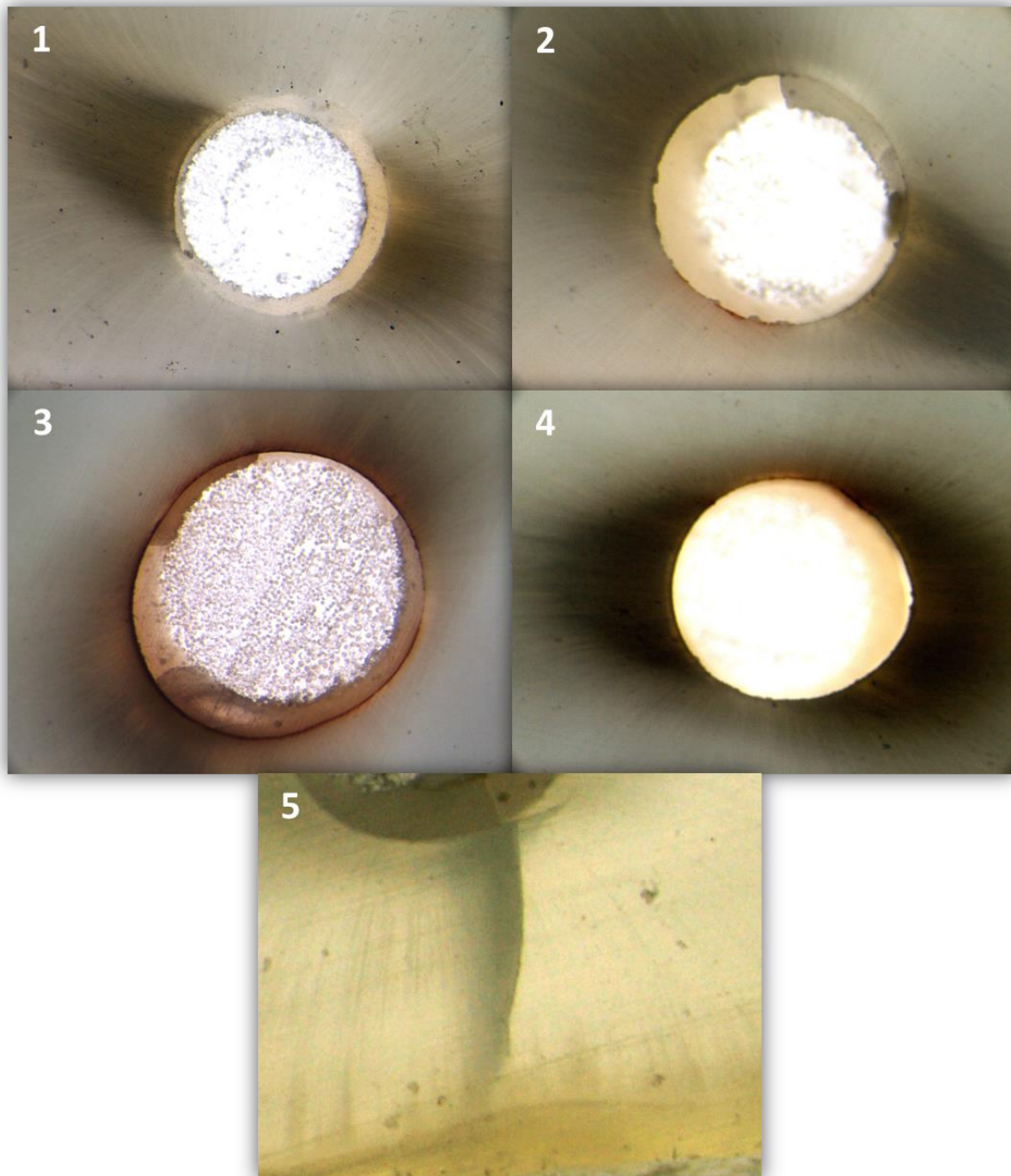


Fonte: Elaboração própria.

4.6 Análise do tipo de fratura

Uma vez concluído o ensaio mecânico de extrusão, os espécimes foram avaliados em lupa estereoscópica para a determinação do tipo de fratura. Em aumentos que variaram de 10 e 30x, as fraturas foram classificadas em: (1) adesiva entre pino e cimento resinoso (sem cimento visível ao redor do pino), (2) mista, com cimento resinoso recobrindo até 50% da circunferência do pino, (3) mista, com cimento resinoso recobrindo mais de 50% da circunferência do pino, (4) adesiva entre cimento resinoso e dentina (pino totalmente recoberto por cimento resinoso), e (5) coesiva em dentina (Figura 10) (Cecchin et al⁹, 2015).

Figura 10 - Representação dos tipos de fratura possíveis de ocorrer nos espécimes submetidos ao teste de extrusão: (1) adesiva entre pino e cimento resinoso, (2) mista, com cimento resinoso recobrindo até 50% da circunferência do pino, (3) mista, com cimento resinoso recobrindo mais de 50% da circunferência do pino, (4) adesiva entre cimento resinoso e dentina, e (5) coesiva em dentina. Aumento de 30x em lupa estereoscópica.



Fonte: Elaboração própria.

4.7 Zimografia in situ

O teste de zimografia in situ (ISZ) tem por objetivo avaliar a presença de formas ativas de enzimas proteolíticas em amostras biológicas (Stamenkovic et al⁶¹, 2003). 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 utilizado (Polassari et al⁴⁸, 2003).

A fim de detectar a atividade de gelatinases em dentina radicular, um protocolo adaptado a partir do estudo de Mazzoni et al³³. (2012) foi aplicado. Para tanto, cada amostra foi colada em uma lâmina de acrílico utilizando SuperBonder® (Henkel Ltda., São Paulo - SP), de forma a evitar a formação de bolhas entre o disco e a superfície de acrílico. As amostras foram então lixadas em politriz (BUEHLER LTD., Lake Bluff, IL, EUA) com lixas de granulação 1200 e 4000 até que a amostra atingisse espessura entre 0,3 e 0,4 mm 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, USA). 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 stock de gelatina, 80 µL de tampão de diluição e 10 µL de anti-fade. A seguir, 50 µL da solução gelatinosa contendo fluoresceína foram aplicados sobre os discos de dentina, que foram cobertos por uma lamínula de vidro e armazenados em estufa a 37°C em 100% de umidade, na ausência de luz.

Após os períodos de 3, 24, 48 e 72 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 e indicando a atividade de enzimas gelatinolíticas/colagenolíticas. Como controle da reação, foi utilizado um grupo tratado com a solução gelatinosa sem fluoresceína.

4.8 Análise estatística

O conjunto de dados de resistência de união apresentou distribuição normal (Kolmogorov-Smirnov, $p=0,191$) e os grupos foram homocedásticos (Levene, $p=0,359$). Portanto, foram utilizados para a análise desses dados, os testes de ANOVA a dois critérios fixos (“cross-linker” e “terço radicular”) com uma medida repetida (“terço radicular”), complementado por testes de Tukey para comparação dos grupos aos pares. A existência de associação entre o tipo de fratura e as variáveis independentes do estudo foi determinada pelo teste de qui-quadrado (χ^2). Todas as inferências estatísticas foram baseadas no nível de significância de 5%, ou seja, grupos foram considerados estatisticamente diferentes quando o valor de p foi menor do que 0,05 ($p<0,05$).

Os dados obtidos a partir da análise das imagens de zimografia in situ foram apenas descritivos.

5 RESULTADO

Resistência de união

Ambos os fatores principais do estudo, “cross-linker” e “terço radicular” exerceram efeito significativo sobre os valores de resistência de união ($p < 0,0001$), enquanto a interação desses fatores não foi significativa ($p = 0,951$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise de variância (ANOVA) a dois critérios fixos aplicada aos dados de resistência de união.

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared	Observed Power
Corrected Model	407.639 ^a	11	37.058	4.581	.000	.344	.999
Cross-linker	229.573	3	76.524	9.459	.000	.228	.996
Terço radicular	165.130	2	82.565	10.206	.000	.175	.984
Cross-linker * Terço radicular	12.936	6	2.156	.267	.951	.016	.119
Error	776.645	96	8.090				
Total	11774.117	108					
Corrected Total	1184.284	107					

^a R Squared = .344 (Adjusted R Squared = .269)

Fonte: Elaboração própria.

Os valores de resistência de união imediata aos diferentes terços da dentina radicular em função dos *cross-linkers* aplicados estão apresentados na Tabela 3. Nenhum dos agentes *cross-linkers* afetou a resistência de união imediata do cimento resinoso à dentina radicular. Todos os valores de resistência de união foram comparáveis ao controle, independentemente do terço radicular (Tabela 3, Figura 11). Entretanto, quando comparados entre si, houve diferença significativa entre os agentes *cross-linkers* considerando-se os terços cervical e médio. Para

ambos, GD resultou em valores de resistência de união estatisticamente maiores aos obtidos para PA, enquanto o EDC resultou em valores intermediários (Tabela 3, Figura 11).

Tabela 3 - Resistência de união imediata (MPa) à dentina radicular biomodificada por diferentes *cross-linkers* após o condicionamento ácido.

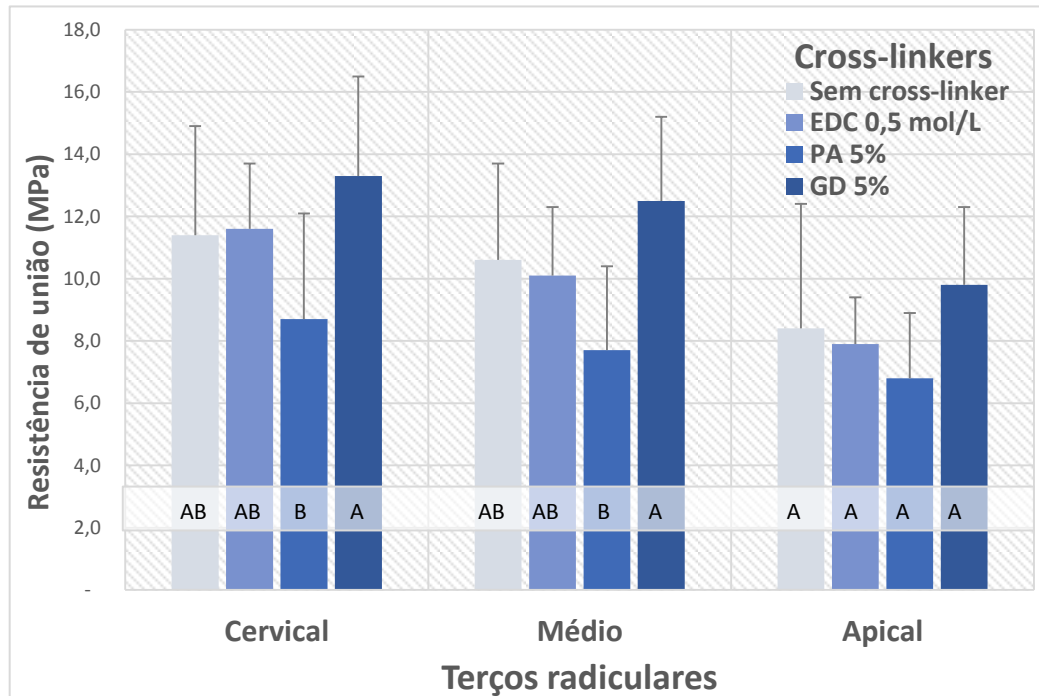
<i>Cross-linker</i>	Terço radicular		
	Cervical	Médio	Apical
Sem <i>cross-linker</i>	11,4±3,5 ^{AB, a}	10,6±3,1 ^{AB, ab}	8,4±4,0 ^{A, b}
0,5 mol/L EDC	11,6±2,1 ^{AB, a}	10,1±2,2 ^{AB, ab}	7,9±1,5 ^{A, b}
PA 5%	8,7±3,4 ^{B, a}	7,7±2,7 ^{B, a}	6,8±2,1 ^{A, a}
GD 5%	13,3±3,2 ^{A, a}	12,5±2,7 ^{A, ab}	9,8±2,5 ^{A, b}

Números representam média±desvio-padrão, n=9. ^A Letras maiúsculas permitem comparações nas colunas, ^a enquanto que letras minúsculas permitem comparações nas linhas. Médias indicadas por letras iguais não diferem estatisticamente (Tukey, p>0,05).

Fonte: Elaboração própria.

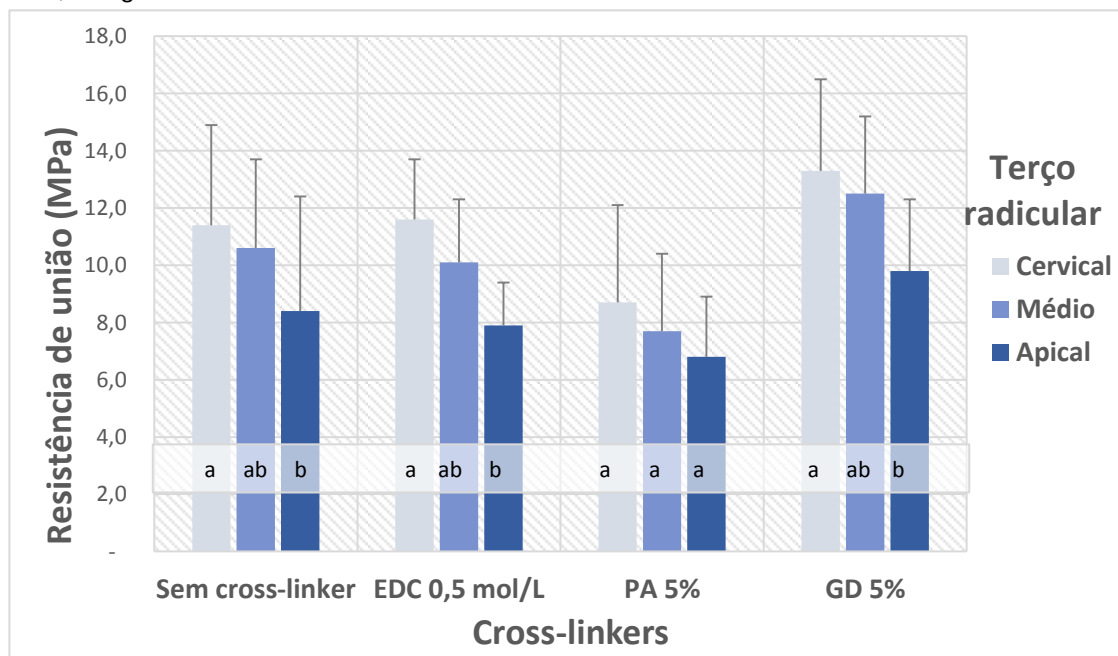
De maneira geral, houve declínio da resistência de união do terço cervical para o terço apical. Os valores de resistência de união foram estatisticamente maiores para o terço cervical quando comparados aos valores obtidos com o terço apical, enquanto que o terço médio apresentou valores intermediários. Isso foi verdadeiro para todos os grupos, com exceção da PA. Para este agente *cross-linker*, nenhuma diferença foi observada entre os terços radiculares (Tabela 3, Figura 12).

Figura 11 - Influência do tratamento da dentina radicular, pós-condicionamento ácido, na resistência de união do conjunto adesivo-cimento resinoso-pino intracanal aos terços cervical, médio e apical da raiz dentária. Colunas representam médias e barras de erro representam desvios-padrões, n=9. MPa = 1,02 Kgf/mm².



Fonte: Elaboração própria.

Figura 12 - Influência do terço da raiz dentária na resistência de união do conjunto adesivo-cimento resinoso-pino intracanal após a biomodificação do colágeno da dentina radicular com diferentes cross-linkers. Colunas representam médias e barras de erro representam desvios-padrões, n=9. MPa = 1,02 Kgf/mm².

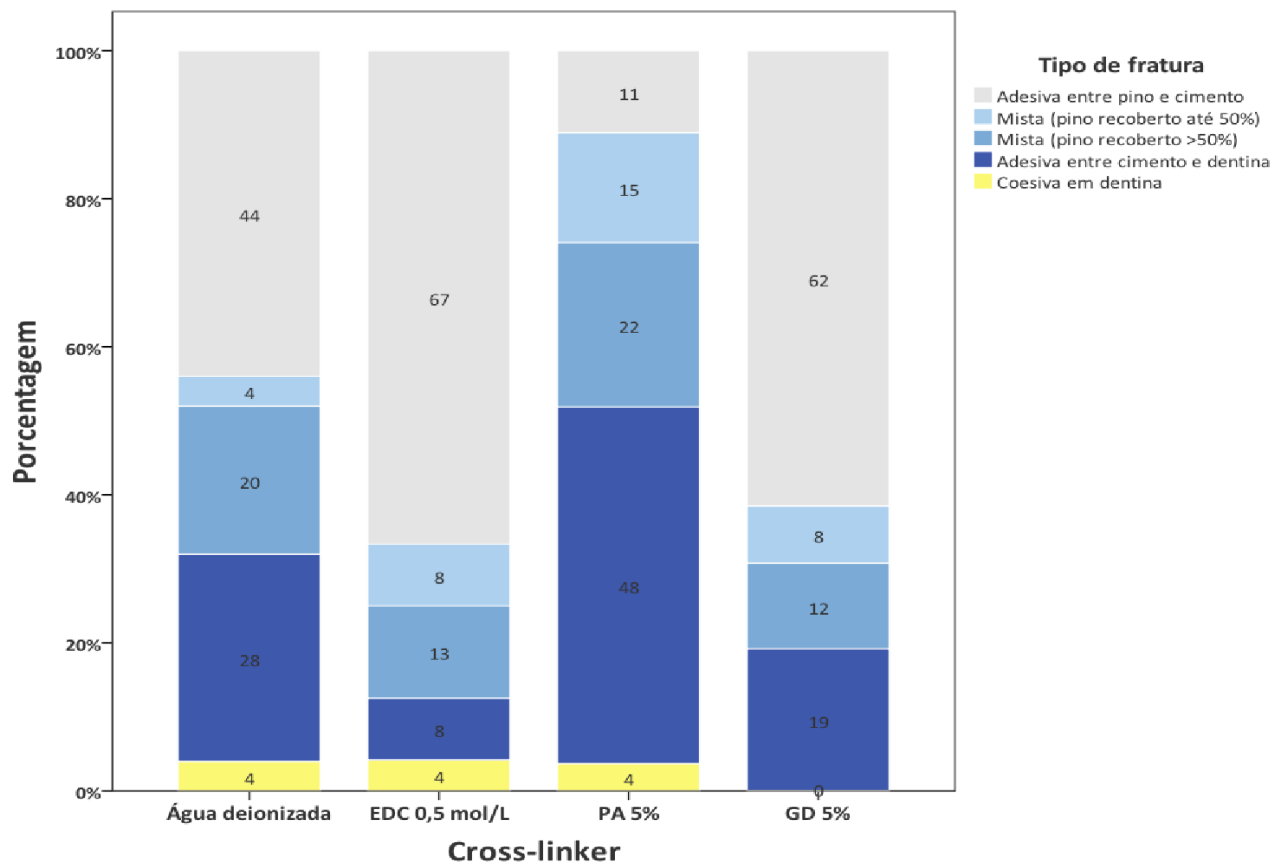


Fonte: Elaboração própria.

Distribuição dos tipos de fraturas

A distribuição dos tipos de fraturas observados após o ensaio mecânico de extrusão está apresentada na Figura 13, para cada um dos *cross-linkers* aplicados na dentina condicionada e para o grupo controle, tratado apenas com água deionizada. O teste de qui-quadrado demonstrou haver uma associação significativa entre o tipo de *cross-linker* e o tipo de fratura ($p=0,024$).

Figura 13 - Distribuição dos tipos de fraturas observadas após o ensaio mecânico de extrusão, para cada um dos *cross-linkers* e para o grupo controle (água deionizada). Os terços radiculares foram compilados ($n=27$).



Fonte: Elaboração própria.

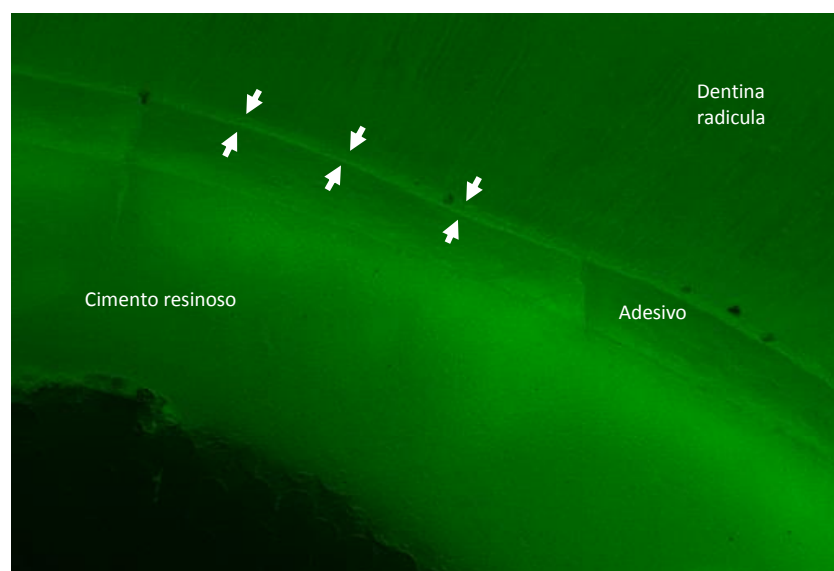
Aumento na porcentagem de fraturas adesivas entre o pino de fibra de vidro e o cimento resinoso foi observado para os grupos EDC e GD, em relação ao grupo controle. Para o grupo PA, houve um grande número de fraturas adesivas entre o

cimento resinoso e a dentina (48%), enquanto apenas 28% foi observado para o grupo controle. Quatro por cento de fratura coesiva da dentina foram observados para os grupos controle, EDC e PA. Esse tipo de fratura não ocorreu no grupo GD.

Atividade proteolítica (zimografia in situ)

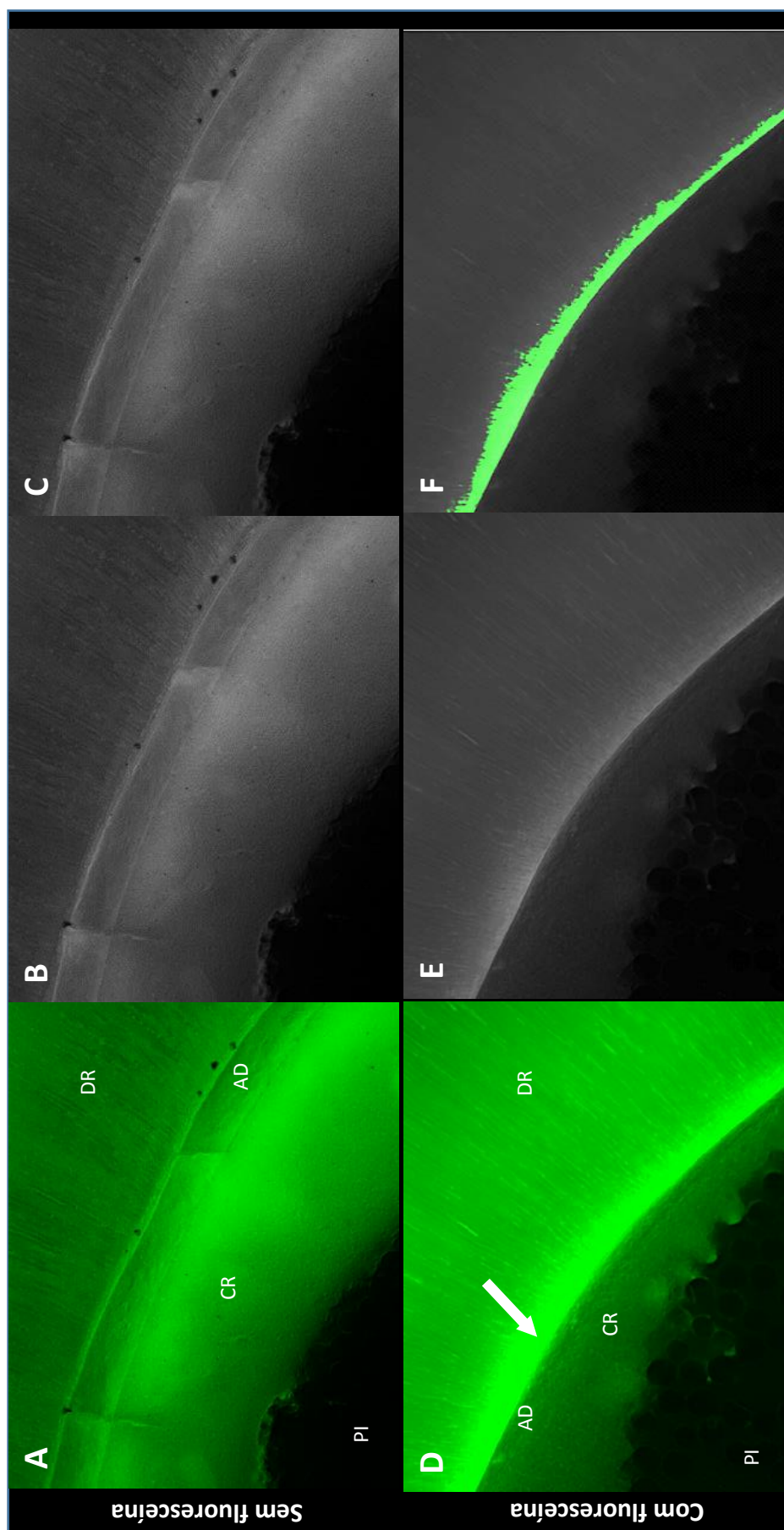
Os componentes da união pino intracanal-cimento resinoso-dentina radicular observada em microscópio de fluorescência podem ser visualizadas na Figura 14. O melhor período para observação da fluorescência foi o de 24 horas, sendo então escolhido para avaliação dos resultados. A validação da zimografia foi realizada em amostras do grupo controle, com e sem a inclusão de fluoresceína na solução gelatinosa. A ausência de fluorescência para o grupo sem fluoresceína e a presença de fluorescência quando do uso da fluoresceína indica a confiabilidade do método (Figura 15).

Figura 14 - Detalhe da união pino intracanal-cimento resinoso-dentina radicular produzida na região cervical. A amostra foi submetida a zimografia in situ após tratamento com solução gelatinosa sem fluoresceína. A região delimitada entre as setas é camada híbrida. Microscópio de fluorescência no aumento de 20x (lente objetiva) e ganho de 1,1.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 15 - Fotomicrografias em microscópio de fluorescência da união pino intracanal-cimento resinoso-dentina radicular, após incubação das amostras por 24 horas. (A-C) Controle negativo da zimografia, tratado com solução gelatinosa sem fluoresceína e (D-F) controle positivo da zimografia, tratado com solução gelatinosa acrescida de fluoresceína. (A) Imagem obtida por canal verde, demonstrando ausência de fluorescência na amostra de controle negativo; (B) contraste de interferência obtido em 8-bit, o qual permite observar a densidade óptica da interface; (C) sobreposição das imagens A e B. (D) Imagem obtida por canal verde, mostrando visível atividade gelatinolítica (fluorescência em verde indicada pela seta) na região de camada híbrida para o controle positivo; (E) contraste de interferência obtido em 8-bit, e (F) sobreposição das imagens D e E, a qual permite visualizar apenas as regiões com atividade gelatinolítica. Microscópio de fluorescência no aumento de 20x (lente objetiva) e ganho de 1.1. PI, pino intracanal; CR, cimento resinoso; AD, camada de adesivo; DR, dentina radicular.

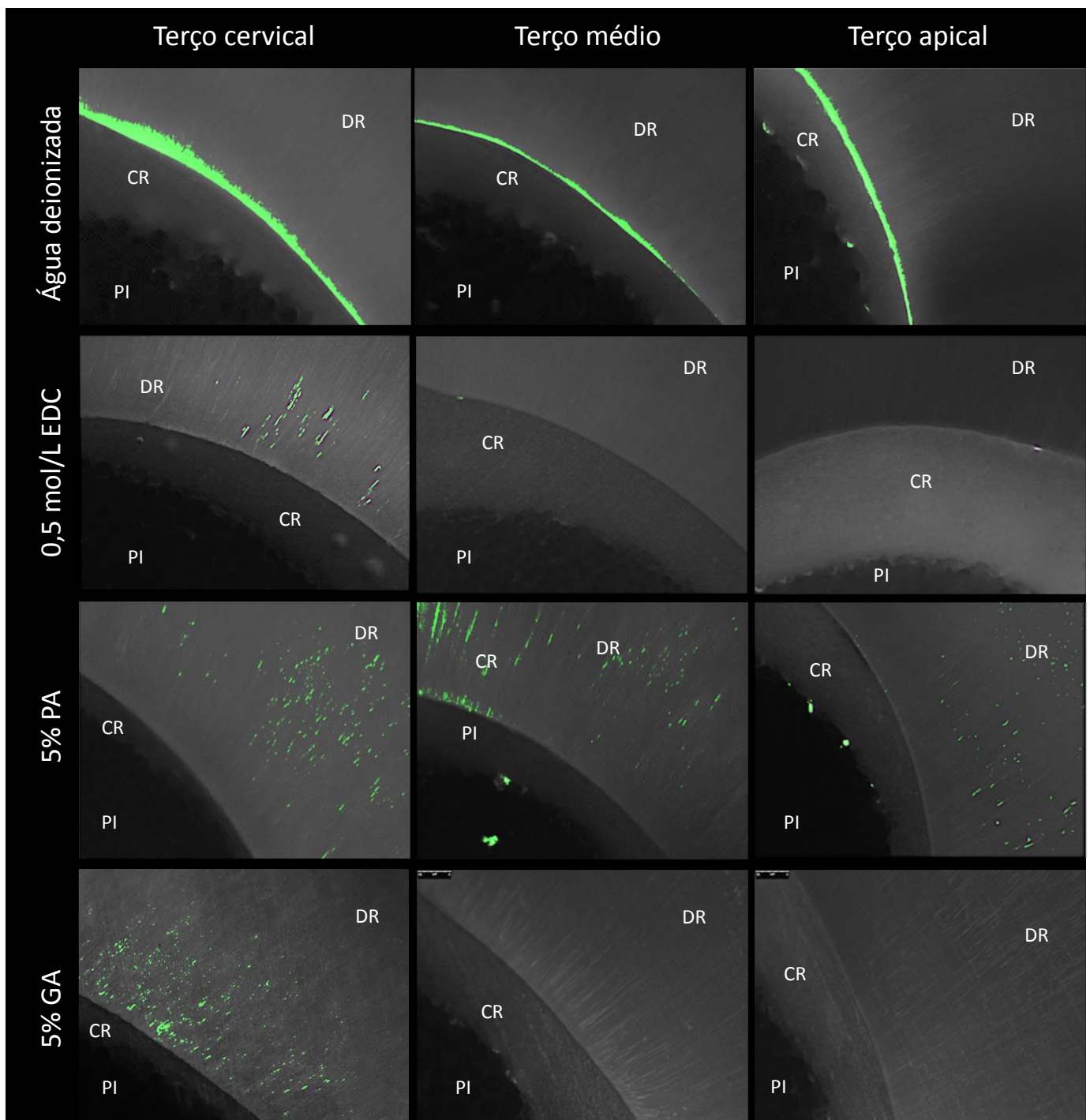


Fonte: Elaboração própria

Na Figura 16 podemos comparar o grupo controle com os grupos tratados com os diferentes agentes de ligação cruzada utilizados no estudo (EDC, PA e GD). As imagens foram obtidas por meio de microscópio de fluorescência em canal verde, aumento de 20x (lente objetiva) e ganho de 1,1. O processamento das mesmas foi realizada utilizando o software ImageJ, escala de cinza em 8-bits, contraste de 34-200 e o valor de threshold de 28-30. A aparição de fluorescência nas amostras é caracterizada pela presença de atividade gelatinolítica, ou seja, degradação.

O controle, tratado com água deionizada, apresentou grande atividade gelatinolítica na região de camada híbrida, para todos os terços avaliados. Quanto às amostras tratadas com cross-linkers (EDC, PA e GD) as mesmas apresentaram completa inibição enzimática (ausência de fluorescência) na camada híbrida. Entretanto, observou-se alguma atividade gelatinolítica em túbulos dentinários essas amostras.

Figura 16 - Zimografia in situ da atividade proteolítica relativa da dentina radicular nos terços cervical, médio e apical após tratamento da dentina condicionada com *cross-linkers*. No grupo controle (sem *cross-linker*) a dentina condicionada foi tratada com água destilada. A cor verde nas imagens indica áreas com atividade proteolítica positiva. Microscópio de fluorescência no aumento de 20x (lente objetiva) e ganho de 1,1. PI, pino intracanal; CR, cimento resinoso; DR, dentina radicular.



Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Uma das propostas do presente estudo foi avaliar a possível interferência da aplicação de EDC, PA ou GD no comportamento mecânico da união cimento resinoso-dentina radicular. É importante que novos protocolos, como o tratamento da dentina desmineralizada com *cross-linkers*, não interfiram negativamente na adesão inicial ao substrato dentário, o que do contrário, poderia inviabilizar sua indicação em procedimentos clínicos. Neste estudo, nenhum dos *cross-linkers* foi prejudicial à resistência de união imediata do cimento resinoso a dentina do conduto radicular. Todos foram comparáveis ao controle, onde apenas água foi utilizada para simular o tratamento da dentina após o condicionamento ácido. Aumento da resistência de união imediata à dentina coronária após a utilização de *cross-linkers* tem sido demonstrado (Bedran-Russo et al²., 2007; Bedran-Russo et al³., 2008; Al-Ammar et al¹., 2009; Scheffel et al⁵³., 2014). Entretanto, no estudo de Al-Ammar et al¹. (2009) por exemplo, tanto GD como PA foram aplicadas sobre a dentina desmineralizada por 60 minutos, previamente à aplicação do sistema adesivo.

Objetivando a utilização de um tempo de aplicação clinicamente viável, todos os *cross-linkers* foram mantidos passivamente em contato com a dentina por 60 segundos (Scheffel et al⁵²., 2014; Scheffel et al⁵³., 2014; Shafiei et al⁵⁷., 2016) previamente ao seu enxague. Tanto para PA como para GD foi demonstrado que a rigidez do colágeno dentinário aumentou significativamente em função do tempo de aplicação e da concentração do *cross-linker* (Bedran-Russo et al³., 2008). No estudo mencionado, o tempo mínimo de aplicação dos *cross-linkers* foi de 10 minutos. Embora esses resultados sejam muito interessantes, esses períodos de aplicação são clinicamente inviáveis. Os resultados do ensaio de zimografia in situ realizado

no presente estudo demonstraram redução significativa da atividade proteolítica da dentina radicular. Resultados similares foram demonstrados para a dentina coronária com o mesmo tempo de aplicação de 60 segundos (Tezvergil-Mutluay et al⁶⁴., 2012; Mazzoni et al³⁴., 2013; Scheffel et al⁵²., 2014; Scheffel et al⁵³., 2014). Isso significa dizer que 60 segundos são suficientes para que esses agentes *cross-linkers* exerçam sua atividade de inibição das proteases liberadas durante a desmineralização da dentina pelo ácido fosfórico. Também foi demonstrado que o EDC, na mesma concentração empregada no presente estudo, aplicado por 30 e 60 segundos, foi capaz de aumentar o módulo de elasticidade do colágeno dentinário (Scheffel et al⁵⁴., 2015).

A concentração de cada *cross-linker* investigado neste estudo foi baseada nos resultados positivos que esses agentes, nessas concentrações específicas, apresentaram quando aplicados sobre a dentina coronária (Al-Ammar et al¹., 2009; Scheffel et al⁵²., 2014; Scheffel et al⁵³., 2014). Também já foi demonstrado que tanto 0,5 mol/L EDC quanto 5% GD não exerceram efeitos tóxicos sobre células odontoblastóides MDPC-23 quando aplicados sobre discos de dentina de apenas 0,4 mm de espessura, simulando, clinicamente, cavidades profundas em dentina (Scheffel et al⁵⁴., 2015; Scheffel et al⁵⁵., 2015). A compatibilidade biológica transdentinária da PA na concentração de 5% também foi avaliada sobre a mesma linhagem celular dos trabalhos mencionados acima, a qual não demonstrou ser citotóxica (dados não publicados*).

Ambos os *cross-linkers*, PA e GD, apresentaram comportamento comparável ao tratamento da dentina desmineralizada apenas com água (controle). Entretanto,

* Alonso JRL, Basso FG, Pansani TN, Brackett MG, Scheffel DLS, Pashley DH, De-Souza-Costa CA, Hebling J. Compatibility of grape seed extract on odontoblasts. Araraquara: FOAR-UNESP; 2016.

os valores de resistência de união obtidos quando do uso da PA foram significativamente inferiores em comparação aos valores obtidos quando do tratamento com GD. Sugere-se que resíduos de PA mantidos sobre a dentina tenham, de alguma forma, influenciado negativamente os valores de resistência de união. A solução de PA apresenta uma coloração castanho escuro, e é possível visualizar resíduos não dissolvidos do material em suspensão. Mesmo após a lavagem da dentina para remoção da solução residual, o tecido fica pigmentado, o que poderia limitar sua utilização clínica, principalmente em restaurações de dentes anteriores. No estudo desenvolvido por Cecchin et al⁹. (2015), foi realizada a filtragem da solução de PA com papel filtro antes de sua aplicação sobre a dentina. O efeito da filtragem da solução de PA é um tópico interessante para estudos futuros.

A análise do tipo de fratura demonstrou ter ocorrido aumento de fraturas entre o pino de fibra de vidro e o cimento-resinoso quando da utilização dos *cross-linkers*, exceto para a PA. Quando a PA foi utilizada, um grande número de fraturas entre a dentina e o cimento-resinoso foi observado, sustentando a hipótese acima de que resíduos desse agente podem ter permanecido contaminando a dentina, mesmo após o seu enxague.

Assim como no presente trabalho, Shafiei et al⁵⁷. (2016) também demonstraram ausência de interferência do EDC sobre os valores de resistência de união imediata para todos os cimentos resinosos investigados, Variolink II, Panavia F2.0 e Clearfil SA, respectivamente cimentos resinosos do tipo convencional, autocondicionante e autoadesivo. Em seu estudo, os autores aplicaram EDC na concentração de 0,3 mol/L, por 60 segundos.

Houve redução gradual da resistência de união no sentido apical da raiz para

todos os grupos, exceto para PA. A exceção observada para esse *cross-linker* está muito provavelmente relacionada aos menores valores de resistência de união obtidos para o terço cervical, e não a sua ação superior aos demais *cross-linkers*. A interferência dos terços radiculares na qualidade da adesão também foi demonstrada em outros estudos (Bouillaguet et al⁴., 2003; Cecchin et al⁹., 2015; Shafiei et al⁵⁷., 2016). Uma das razões para menores valores de resistência de união a medida que caminha-se no sentido apical é a limitação quanto à transmissão da luz para fotoativação nas regiões mais distantes do foco de luz, como no caso da região apical, o que ocasiona uma polimerização deficiente, gerando interfaces menos estáveis (Kim et al²³., 2009). Dificuldades na evaporação de solventes presentes nos materiais adesivos também pode exercer papel relevante.

A zimografia *in situ* identifica, por fluorescência (Polassari et al⁴⁸., 2013), formas ativas de enzimas proteolíticas em amostras biológicas (Stamenkovic et al⁶¹., 2003). Essas enzimas degradam o substrato gelatinoso aplicado sobre as amostras e a intensidade da fluorescência é diretamente proporcional a atividade proteolítica do tecido. No presente estudo, foi utilizado um protocolo adaptado de Mazzoni et al³³. (2012), para permitir a detecção de proteases em dentina radicular.

Por ser um ensaio inespecífico, a fluorescência representa a atividade total das proteases teciduais. Para o tecido dentinário, isso significa dizer que a zimografia *in situ* detecta a atividade de MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-13, MMP-20 e cisteínas cathepsinas (Sulkala et al⁶²., 2002; Mazzoni et al³¹., 2007; Sulkala et al⁶³., 2007; Mazzoni et al³²., 2011). Intensa atividade proteolítica foi observada para o grupo não tratado com *cross-linker* (controle), concentrada na região da camada híbrida. Essa grande atividade na região da camada híbrida nos

permite assumir que houve liberação de MMPs devido ao condicionamento ácido (Tjäderhane et al⁶⁶., 2013), as quais não foram sepultadas pelos monômeros do sistema adesivo. Uma vez mantidas livres, essas enzimas degradaram o substrato gelatinoso do kit de zimografia resultando na intensa fluorescência observada para o grupo controle. Inversamente, ausência ou mínima fluorescência foi observada para os grupos tratados com *cross-linker*. Esse resultado demonstra, indiretamente, a inibição da atividade proteolítica da dentina por esses agentes, como demonstrado por outros estudos utilizando essa mesma metodologia (Mazzoni et al³³., 2012; Mazzoni et al³⁴., 2013; Mazzoni et al³⁵., 2014). A inibição da atividade de MMPs dentinárias após o uso de *cross-linkers* também foi demonstrada em outros estudos, utilizando metodologias diferentes (Tezvergil-Mutluay et al⁶⁴., 2012; Epasinghe et al¹³., 2013; Scheffel et al⁵²., 2014; Scheffel et al⁵³., 2014).

MMPs também estão presentes nas paredes internas dos túbulos dentinários como componente da camada proteica (*lamina limitans*) que reveste esta parede. Tem sido sugerido que essa localização está diretamente relacionada com a formação de dentina peritubular (Hannas et al¹⁷., 2007). Atividade proteolítica ao longo dos túbulos dentinários foi observada para todos os grupos tratados com *cross-linkers*. Entretanto, o mesmo não pôde ser documentado para o grupo controle. Devido ao ajuste de contraste e valor das amostras para análise no programa ImageJ, a grande intensidade da fluorescência presente na camada híbrida das amostras do grupo controle mascara a fluorescência em outras partes da amostra. Entretanto, fluorescência ao longo dos túbulos dentinários também ocorre nas amostras do grupo controle. Possivelmente, essa atividade só tenha aparecido para as amostras experimentais devido à ausência de grande fluorescência nas suas respectivas camadas híbridas.

O mecanismo de inativação de MMPs por *cross-linker* está relacionado com alterações irreversíveis no domínio catalítico da enzima, ou inibição alostérica de outros domínios que participam da degradação do colágeno, modificando assim a conformação estrutural das enzimas (Sela-Passwell et al⁵⁶., 2010; Liu et al²⁸., 2011). O mesmo efeito de enrijecimento causado sobre as fibrilas de colágeno devido ao aumento do número de ligações cruzadas induzidas pelos *cross-linker* (Charulatha, Rajaram¹⁰, 2003; Hannas et al¹⁷., 2007), também ocorre quando as enzimas dentinárias entram em contato com esses agentes. Assim, a motilidade da enzima, necessária para o seu acoplamento sobre a molécula de colágeno, fica comprometida. Ao mesmo tempo, a nova condição das moléculas de colágeno dificulta sobremaneira a quebra da tripla hélice por essas enzimas (Liu et al²⁸., 2011).

A principal finalidade da utilização de agentes *cross-linkers* como coadjuvante nos protocolos de adesão à dentina é melhorar a longevidade da união entre materiais resinosos e esse substrato. O presente trabalho avaliou apenas o comportamento imediato da união cimento resinoso-dentina radicular, assim como a atividade proteolítica desse substrato. Especificamente em relação a dentina radicular, tem sido demonstrado a manutenção dos valores de resistência de união após envelhecimento de espécimes tratados com PA (Kalra et al²¹., 2013; Cecchin et al⁹., 2015) e EDC (Shafiei et al⁵⁷., 2016). Entretanto, mais estudos são necessários para validar esses efeitos antes da utilização clínica desses agentes promotores de ligações cruzadas.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia utilizada neste estudo, foi possível concluir que nenhum dos agentes promotores de ligações cruzadas, EDC, PA e GD, interferiu negativamente nos valores imediatos de resistência de união à dentina radicular. Esses agentes foram capazes de reduzir a atividade proteolítica presente, principalmente, na camada híbrida.

REFERÊNCIAS*

1. 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.
2. 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.
3. Bedran-Russo AK, Pashley DH, Agee K, Drummond JL, Miescke KJ. Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen cross-linkers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008; 86B(2): 330-4.
4. Bouillaguet S, Troesch S, Wataha JC, Krejci I, Meyer JM, Pashley DH. Microtensile bond strength between adhesive cements and root canal dentin. *Dent Mater*. 2003; 19(3): 199-205.
5. Boskey AL. The role of extracellular matrix components in dentin mineralization. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1991; 2(3): 369-87.
6. Brodsky B, Ramshaw JAM. The collagen triple-helix structure. *Matrix Biol*. 1997; 15(8-9): 545-54.
7. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjäderhane L, Mazzoni A, et al. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009; 90(1): 373-80.
8. 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.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

9. Cecchin D, Pin LC, Farina AP, Souza M, Vidal Cde M, Bello YD, et al. Bond strength between fiber posts and root dentin treated with natural cross-linkers. *J Endod*. 2015; 41(10): 1667-71.
10. Charulatha V, Rajaram A. Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. *Biomaterials*. 2003; 24(5): 759–67.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Frassetto A, Breschi L, Turco G1, 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.
15. Green B, Yao X, Ganguly A, Xu C, Dusevich V, Walker MP, et al. Grape seed proanthocyanidins increase collagen biodegradation resistance in the dentin/adhesive interface when included in an adhesive. *J Dent*. 2010; 38(11): 908-15.

16. 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.
17. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand*. 2007; 65(1): 1-13.
18. Ilie N, Kunzelmann KH, Hickel R. Evaluation of micro-tensile bond strengths of composite materials in comparison to their polymerization shrinkage. *Dent Mater*. 2006; 22(7): 593-601.
19. Inoue T, Saito M, Yamamoto M, Debari K, Kou K, Nishimura F, et al. Comparison of nanohardness between coronal and radicular intertubular dentin. *Dent Mater*. 2009; 28(3): 295-300.
20. Jacobsen T, Söderholm KJ. Some effects of water on dentin bonding. *Dent Mater*. 1995; 11(2): 132-6.
21. Kalra M, Iqbal K, Nitisusanta LI, Daood U, Sum CP, Fawzy AS. The effect of proanthocyanidins on the bond strength and durability of resin sealer to root dentine. *Int Endod J*. 2013; 46(2): 169-78.
22. Kanca J 3rd. Improving bond strength through acid etching of dentin and bonding to wet dentin surfaces. *J Am Dent Assoc*. 1992; 123(9): 35-43.
23. Kim YK, Kim SK, Kim KH, Kwon TY. Degree of conversion of dual-cured resin cement light-cured through three fibre posts within human root canals: an ex vivo study. *Int Endod J*. 2009; 42(8): 667-74.
24. 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.

25. Ku CS, Sathishkumar M, Mun SP. Binding affinity of proanthocyanidin from waste Pinus radiata bark onto proline-rich bovine achilles tendon collagen type I. *Chemosphere*. 2007; 67(8): 1618–27.
26. Lee SY, Chiang HC, Huang HM, Shih YH, Chen HC, Dong DR, et al. Thermo-debonding mechanisms in dentin bonding systems using finite element analysis. *Biomaterials*. 2001; 22(2): 113-23.
27. Lee TY, Jin EJ, Choi B. MMP-13 Expression in coronal and radicular dentin according to caries progression –a pilot study. *Tissue Eng Reg Med*. 2013; 10(6): 317-21.
28. Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, et al. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res*. 2011; 90(8): 953-68.
29. Loomis WD. Overcoming problems of phenolics and quinines in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods Enzymol*. 1974; 31(pt A): 528–44.
30. Märten A, Fratzl P, Paris O, Zaslansky P. On the mineral in collagen of human crown dentine. *Biomaterials*. 2010; 31(20): 5479-90.
31. 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.
32. Mazzoni A, Papa V, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L, Ruggeri A, et al. Immunohistochemical and biochemical assay of MMP-3 in human dentine. *J Dent*. 2011; 39(3): 231–7.
33. Mazzoni A, Nascimento FD, Carrilho M, Tersariol I, Papa V, Tjäderhane L, et al. MMP Activity in the hybrid layer detected with in situ Zymography. *J Dent Res*. 2012; 91(5): 467-72.

34. Mazzoni A, Angeloni V, Apolonio FM, Scotti N, Tjäderhane L, Tezvergil-Mutluay A, et al. Effect of carbodiimide (EDC) on the bond stability of etch-and-rinse adhesive systems. *Dent Mater.* 2013; 29(10): 1040-7.
35. Mazzoni A, Apolonio FM, Saboia VP, Santi S, Angeloni V, Checchi V, et al. Carbodiimide inactivation of MMPs and effect on dentin bonding. *J Dent Res.* 2014; 93(3): 263-8.
36. Mosharraf R, Ranjbarian P. Effects of post surface conditioning before silanization on bond strength between fiber post and resin cement. *J Adv Prosthodont.* 2013; 5(2): 126-32.
37. Mouw JK, Ou G, Weaver VM. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15(12): 771-85.
38. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res.* 1982; 16(3): 265-73.
39. Olde Damink LH, Dijkstra PJ, van Luyn MJ, van Wachem PB, Nieuwenhuis P, Feijen J. In vitro degradation of dermal sheep collagen cross-linked using a water-soluble carbodiimide. *Biomaterials.* 1996; 17(7): 679-84.
40. Oliveira SS, Marshall SJ, Habelitz S, Gansky SA, Wilson RS, Marshall Jr GW. The effect of a self-etching primer on the continuous demineralization of dentin. *Eur J Oral Sci.* 2004; 112(4): 376-83.
41. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8(3): 221–33.
42. 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): 5940–5.

43. 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.
44. 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): 7–21.
45. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*. 2011; 27(1): 1-16.
46. 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.
47. Pierpoint WS. o-Quinones formed in plant extracts: their reactions with amino acids and peptides. *Biochem J*. 1969; 112(5): 609–16.
48. Polassari H, Pennongton CJ, Lamas MDRE, Tjäderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature odontoblasts and pulp tissue. *Eur Oral J Sci*. 2003; 111(2): 117-27.
49. Reis A, Carrilho M, Breschi L, Loguercio A. Overview of clinical alternatives to minimize the degradation of the resin-dentin bonds. *Oper Dent*. 2013; 38(4): E1-E25.
50. Ryu M, Kobayashi T, Kawamukai E, Quan G, Furuta T. Cytotoxicity assessment of residual high-level disinfectants. *Biocontrol Sci*. 2013; 18(4): 217-20.

51. Santos J, Carrilho M, Tervahartiala T, Sorsa T, Breschi L, Mazzoni A, et al. Determination of matrix metalloproteinases in human radicular dentin. *J Endod.* 2009; 35(5): 686-9.
52. 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.
53. 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.
54. Scheffel DL, Bianchi L, Soares DG, Basso FG, Sabatini C, de Souza Costa CA, et al. Transdental cytotoxicity of carbodiimide (EDC) and glutaraldehyde on odontoblast-like cells. *Oper Dent.* 2015; 40(1): 44–54.
55. 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.
56. Sela-Passwell N, Rosenblum G, Shoham T, Sagi I. Structural and functional bases for allosteric control of MMP activities: can it pave the path for selective inhibition? *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1803(1): 29-38.
57. Shafiei F, Yousefipour B, Bassir MM. Effect of Carbodiimide on bonding durability of adhesive-cemented fiber posts in root canals. *Oper Dent.* 2016 Jan 21. [Epub ahead of print] doi: <http://dx.doi.org/10.2341/15-099-L>.
58. Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res.* 2002; 62(3): 447-56.
59. Spencer P, Wang Y, Katz JL. Identification of collagen encapsulation at the dentin/adhesive interface. *J Adhes Dent.* 2004; 6(2): 91-5.

60. 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.
61. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodeling: the role of matrix metalloproteinase. *J Pathol.* 2003; 200(4): 448-64.
62. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res.* 2002; 81(9): 603–7.
63. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(2): 121–7.
64. 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.
65. Tjäderhane L, Carrilho MR, Breschi L, Tay FR, Pashley DH. Dentin basic structure and composition—an overview. *Endod Topics.* 2012; 20(1): 3–29.
66. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol ILS, 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.
67. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer-A review. *Dent Mater.* 2013; 29(10): 999-1011.
68. Van Noort R, Norooze S, Howard I, Cardew G. A critique of bond strength measurements. *J Dent.* 1989; 17(2): 61-7.

69. Van Noort R, Cardew G, Howard I, Norooze S. The effect of local interfacial geometry on the measurements of the tensile bond strength to dentin. *J Dent Res.* 1991; 70(5): 889-93.
70. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(14): 5578–82.
71. Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res.* 2003; 82(2): 141-5.

ANEXO

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DENTINÁRIA E RESISTÊNCIA DA UNIÃO CIMENTO-DENTINA RADICULAR PRODUZIDA NA PRESENÇA DE AGENTES PROMOTORES DE LIGAÇÕES CRUZADAS

Pesquisador: JOSIMERI HEBLING COSTA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 34373314.6.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 912.194

Data da Relatoria: 10/11/2014

Apresentação do Projeto:

Pretende-se avaliar o efeito de três diferentes agentes cross-linkers na atividade proteolítica da dentina radicular e na resistência da união cimento-dentina radicular, após cimentação adesiva de pinos radiculares.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o efeito de três diferentes agentes promotores de ligações cruzadas (cross-linkers), carbodiimida (EDC), proantocianidina e glutaraldeído, no comportamento da união cimento-dentina radicular.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Entende-se que o risco é mínimo, uma vez que se trata do uso de dentes Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Araraquara –UNESP, em detrimento do benefício do conhecimento sobre a longevidade da união entre materiais resinosos com a dentina ainda é considerada um desafio na Odontologia adesiva.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pretende, com os resultados deste estudo que a biomodificação do colágeno melhore as

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: 1633-0164

Fax: 1633-0164

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

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 912.194

propriedades mecânicas e a estabilidade das interfaces adesivas, aumentando a longevidade dos tratamentos protéticos, o que poderá ser futuramente um benefício ao paciente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Estão de acordo

Recomendações:

O pesquisador, elaborou melhor as medidas de segurança para o trabalho com o glutaraldeído, motivo da pendência

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Esses riscos serão minimizados por meio da utilização de EPIs adequados para a manipulação das amostras (luvas, jaleco, gorro, máscara e óculos de proteção), além de adequada proteção contra radiação (dispositivo para RX - caixa chumbada, completamente lacrada no momento da radiação). Em relação à manipulação/exposição ao Glutaraldeído, sabe-se que o limite de exposição ocupacional máximo permitido de Glutaraldeído

no ar é de 0,2 ppm, podendo irritar olhos, nariz e garganta, se ultrapassada essa concentração. Sendo assim, serão tomadas as medidas de proteção individual específicas e cabíveis a este agente, sendo eles: luvas de nitrila, máscara, óculos de proteção e avental impermeável. Adicionalmente, os procedimentos envolvendo a utilização de glutaraldeído, sejam eles o preparo da solução ou sua aplicação nos dentes, serão todos realizados em capela de fluxo laminar vertical.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo APROVADO em reunião de 12 de dezembro de 2014.

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: 1633-0164

Fax: 1633-0164

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

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 912.194

ARARAQUARA, 12 de Dezembro de 2014

Assinado por:
Lígia Antunes Pereira Pinelli
(Coordenador)

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 06 de Abril de 2016.

JULIANA ROSA LUIZ ALONSO