



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



Isabela Guiné de Souza

**Atividade inibitória de partículas liberadoras de íons (S-PGR) sobre
metaloproteinases ligadas ao colágeno e efeito sobre a degradação da matriz
dentinária**

Araraquara

2022



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Isabela Guiné de Souza

**Atividade inibitória de partículas liberadoras de íons (S-PRG) sobre
metaloproteinases ligadas ao colágeno e efeito sobre a degradação da matriz
dentinária**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Odontologia da Faculdade de Odontologia de
Araraquara, da Universidade Estadual
Paulista, para a obtenção do grau de
Cirurgião-dentista.

Orientador: Profa. Dra. Josimeri Hebling

Araraquara

2022

S729a Souza, Isabela Guiné de
Atividade inibitória de partículas liberadoras de íons (S-PGR) sobre metaloproteinases ligadas ao colágeno e efeito sobre a degradação da matriz dentinária / Isabela Guiné de Souza. -- Araraquara, 2022
44 p. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Odontologia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Josimeri Hebling

1. Dentina. 2. Colágeno. 3. Hidroxiprolina. 4. Metaloproteinases da matriz. 5. Íons. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

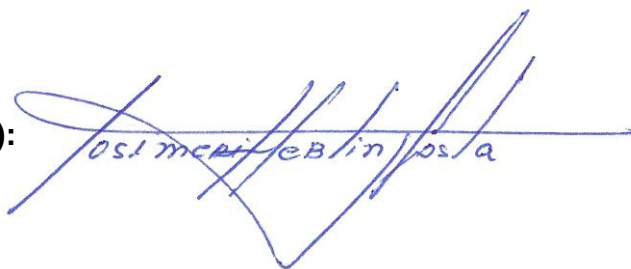
**UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara**

Isabela Guiné de Souza

**Atividade inibitória de partículas liberadoras de íons (S-PRG) sobre
metaloproteinases ligadas ao colágeno e efeito sobre a degradação da matriz
dentinária**

Orientador: Profa. Dra. Josimeri Hebling

Assinatura Orientador (a):

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Josimeri Hebling', with a stylized, overlapping flourish.

Assinatura Aluno (a):

Isabela Guiné de Souza

Araraquara, 29 de março de 2022.

Dedico este trabalho aos meus pais Débora Ferreira Guiné e Nivaldo Tristão de Souza, meus irmãos Ian Guiné de Souza e Isadora Guiné de Souza e toda a minha família que sempre foi a razão da minha vida, todos de alguma forma, me ensinaram muito e foram responsáveis pela formação do meu caráter, meu amadurecimento como pessoa e pela visão de mundo que eu tenho hoje. Me sinto muito abençoada por estar perto de pessoas tão incríveis e de bom coração, que proporcionaram tudo a mim, minha eterna gratidão e amor a cada um de vocês.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Débora Ferreira Guiné e Nivaldo Tristão de Souza por terem sempre me proporcionado estudos de qualidade, me abrindo caminho para conseguir chegar até aqui e poder realizar o meu sonho. Obrigada por sempre me incentivarem nos estudos e a correr atrás daquilo que me faz feliz, sem a ajuda de vocês nada disso seria possível, tenho imensa gratidão por ter vocês na minha vida, amo vocês. Agradeço aos meus irmãos Ian e Isadora por serem meu porto seguro, eu sei que posso contar com vocês para o que eu precisar para a vida toda.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Josimeri Hebling, por ter acreditado em mim e por ter me dado a chance de participar desse grupo de pesquisa que tanto admiro e levo como inspiração profissional, por ter compartilhado tanto conhecimento, ética e amor à profissão. E ao Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica Infantil da FOAr-Unesp, coordenado pela Prof.^a Dr.^a Josimeri Hebling, onde realizei a maior parte desta pesquisa.

Muito obrigada Igor Paulino Mendes Soares e Caroline Anselmi de Oliveira por toda ajuda e apoio durante a realização do projeto, por terem também compartilhado tanto conhecimento comigo, pela paciência e companheirismo, tornando todo o processo mais leve. Agradeço também a Lídia de Oliveira Fernandes por ter sempre ajudado no que foi preciso.

Aos meus avós Marli Tristão e Erandi Souza, que sempre acreditaram no meu potencial e estiveram me apoiando e incentivando mesmo estando longe, dispostos a fazer o que fosse preciso por mim, amo muito vocês. Ao meu namorado Raphael Cazelatto que sempre esteve tão presente, obrigada por todo o carinho e incentivo.

Agradeço ao CNPq - PIBIC pelo financiamento da pesquisa (138984/2020-4).

Souza IG. Atividade inibitória de partículas liberadoras de íons (S-PRG) sobre metaloproteinases ligadas ao colágeno e efeito sobre a degradação da matriz dentinária [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a atividade inibitória de um eluato produzido a partir de partículas liberadoras de íons (S-PRG) sobre metaloproteinases de matriz (MMPs) ligadas ao colágeno e degradação da matriz dentinária. **Métodos:** Quarenta espécimes de dentina ($0,5 \times 2,0 \times 5,0$ mm) obtidos de molares humanos foram completamente desmineralizados para produzir espécimes de matriz dentinária (MD). A massa seca de cada espécime foi mensurada e um ensaio colorimétrico determinou a atividade inicial total de MMPs, permitindo alocar homogêneamente os espécimes em 4 grupos de tratamento ($n=10$ /grupo): G1) água ultrapura por 1 min (controle negativo), G2) 2% digluconato de clorexidina (CHX – controle positivo inibitório) por 1 min, G3) eluato de partículas S-PRG por 1 min e G4) eluato de partículas S-PRG por 30 min. Após os tratamentos, a atividade total de MMPs foi reavaliada. Então, os espécimes foram armazenados em fluido corporal simulado (SBF) a 37°C por até 21 dias. A massa seca foi reavaliada semanalmente. Ao sétimo dia, a degradação da MD foi analisada pela presença de fragmentos de colágeno (FC) e hidroxiprolina (Hyp) no SBF. As análises estatísticas foram realizadas com ANOVA/Tukey, ANOVA para medidas repetidas/Sidak e testes t pareados ($\alpha=5\%$). **Resultados:** A exposição ao eluato de S-PRG por 1 min e 30 min reduziu significativamente a atividade de MMPs ($p<0,0001$). A exposição ao eluato de partículas S-PRG por 30 min apresentou inibição da atividade de MMPs semelhante à CHX ($p=0,061$). Ambos os tratamentos com eluato de partículas S-PRG e CHX reduziram a liberação de FC ($p\leq 0,007$) e Hyp ($p<0,046$). Após 21 dias de armazenamento em SBF, espécimes tratados com o eluato de partículas S-PRG, independentemente do tempo de exposição, apresentaram redução ($p\leq 0,017$) de perda de massa, a qual foi intermediária entre CHX e controle negativo. **Conclusão:** O tratamento da dentina desmineralizada com eluato de partículas S-PRG reduziu a atividade total de MMPs ligadas à matriz e a degradação da matriz dentinária por até 21 dias.

Palavras-chave: Dentina. Colágeno. Hidroxiprolina. Metaloproteinases da matriz. Íons.

Souza IG. Inhibitory activity of an ion-releasing filler (S-PGR) eluate on collagen-bound metalloproteinases and effect on dentin matrix degradation [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the inhibitory activity of an eluate produced from ion releasing-filler (S-PRG) on dentin collagen-bound metalloproteinases (MMP) and dentin matrix degradation. **Methods:** Dentin beams (5 × 2 × 0.5 mm) obtained from human molars, were completely demineralized to produce dentin matrix specimens. The dry mass was measured and a colorimetric assay determined the initial total MMPs activity to establish the allocation of the beams into 4 treatment groups (n=10/group): 1) water for 1 min (negative control), 2) 2% chlorhexidine digluconate (CHX – inhibitor control) for 1 min, 3) S-PRG eluate for 1 min, or 4) 30 min. After treatments, the total MMP activity was reassessed. The specimens were stored in simulated body fluid (SBF) at 37°C for up to 21 days. The dry mass was reassessed weekly. On day 7, the dentin matrix degradation was analyzed by the presence of collagen fragments (CF) and hydroxyproline (Hyp) in the SBF. Statistical analyses were performed with ANOVA with Tukey's post-hoc, paired t-tests, and RM-ANOVA with Sidak's post-hoc ($\alpha=5\%$). **Results:** S-PRG eluate exposure for 1 min and 30 min significantly ($p<0.0001$) reduced MMP activity. S-PRG exposure for 30 min presented MMP activity inhibition similar to CHX ($p=0.061$). S-PRG and CHX decreased CF ($p\leq 0.007$) and Hyp ($p<0.046$) release. After 21 days of storage, S-PRG-treated beams, regardless of exposure time, presented a reduced ($p\leq 0.017$) loss of mass, intermediate between CHX and control. **Conclusion:** Treating demineralized dentin with S-PRG eluate reduced matrix-bound MMP activity and decreased matrix degradation for up to 21 days.

Keywords: Dentin. Collagen. Hydroxyproline. Matrix metalloproteinases. Ions.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 PROPOSIÇÃO	11
3 REVISÃO DA LITERATURA	12
3.1 Composição da dentina	12
3.2 Proteases dentinárias	13
3.3 Mecanismos de inibição das proteases e seus inibidores	16
3.4 Partículas S-PRG e suas propriedades bioativas.....	15
4 MATERIAL E MÉTODO.....	18
4.1 Cálculo do tamanho da amostra.....	18
4.2 Preparação dos espécimes de matriz dentinária	18
4.3 Avaliações preliminares e alocação nos grupos de tratamento	19
4.4 Obtenção do eluato de partículas S-PRG.....	20
4.5 Tratamento da matriz dentinária.....	20
4.6 Determinação total da atividade de MMPs pós-tratamento	21
4.7 Perda de massa seca	21
4.8 Liberação de fragmentos de colágeno	21
4.9 Liberação de hidroxiprolina	22
4.10 Análise de dados	23
5 RESULTADOS.....	24
6 DISCUSSÃO	29
7 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS.....	34
ANEXO A – APROVAÇÃO CEP	41
ANEXO B – BOLSA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PIBIC/CNPq.....	44

1 INTRODUÇÃO

A dentina humana responde a vários processos fisiopatológicos. Esse tecido apresenta 20% de sua massa composta por conteúdo orgânico, do qual, 90% correspondem a colágeno do tipo I¹. A rede de fibrilas colágenas serve como arcabouço para a deposição mineral¹, a qual é guiada por proteínas não colágenas. Essas últimas, compõem os 10% restantes da matriz dentinária e são responsáveis por funções primordiais durante a dentinogênese fisiológica ou em resposta a processos patológicos^{1,2}. Dentre as proteínas não colagenosas, existem duas importantes famílias de proteases dentinárias (também denominadas de endopeptidases) que são as metaloproteinases de matriz (MMPs) e cisteínas catepsinas (CATs). Em conjunto, essas enzimas têm capacidade de degradar todos os componentes orgânicos da matriz extracelular, sendo fundamentais nos processos de formação e remodelação tecidual^{3,4}. No entanto, MMPs e CATs também estão envolvidas em processos patológicos de perda progressiva de tecido, incluindo lesões de cárie^{5,6,7} e lesões erosivas^{7,8,9}. Além disso, essas enzimas desempenham um papel importante na falha de interfaces adesivas estabelecidas em dentina devido à sua capacidade de degradação de componentes da camada híbrida^{6,10,11}.

Embora MMPs e CATs coexistam na dentina, as primeiras apresentam maior atividade enzimática, indicando um papel mais relevante na degradação da matriz dentinária¹². Na dentina humana, já foram identificadas as MMP-8¹³, MMP-2, MMP-9¹⁴, MMP-20¹⁵ e MMP-7¹⁶, assim como as CATs K e B. As MMPs são assim denominadas porque são diretamente dependentes dos íons metálicos cálcio e zinco¹⁷. Durante a deposição de cristais de apatita, as MMPs degradam parcialmente a matriz dentinária para permitir a nucleação mineral¹⁸, e, uma vez concluído o processo de mineralização, essas enzimas ficam aprisionadas na dentina¹⁴.

Na dentina mineralizada, as MMPs apresentam configuração de proenzimas (zimogênios) que não exercem ação proteolítica¹⁹. No entanto, a desmineralização ácida do conteúdo mineral da dentina, como ocorre em processos de cárie, processos erosivos e procedimentos adesivos, expõem as fibrilas de colágeno e as proteases dentinárias²⁰. Uma vez expostas, essas enzimas tornam-se ativas e iniciam, imediatamente, o processo a catalisar o processo de hidrólise das fibrilas de colágenos, acelerando a degradação da matriz dentinária^{20,21}. Entretanto, a atividade indesejável dessas enzimas pode ser regulada por inibidores endógenos e exógenos.

Diferentes células produzem inibidores teciduais endógenos de MMPs, denominados TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*), os quais modulam a atividade de MMPs em tecidos saudáveis, restringindo o processo de degradação¹⁷. Porém, esse processo intrínseco de autorregulação é inviável em ambientes com pH ácido, o qual ativa, principalmente, as MMPs. Portanto, vários estudos têm investigado inibidores exógenos de MMPs^{5,22} uma vez que a inativação de proteases dentinárias reduz a progressão de lesões de cárie^{5,22}, de lesões erosivas⁹ e favorece a longevidade de interfaces adesivas no substrato dentinário¹¹.

Em geral, os mecanismos de ação dos inibidores exógenos de MMPs e CATs envolvem a quelatação de íons, o revestimento do substrato e a limitação da motilidade enzimática por reticulação^{6,10,23}. A clorexidina (CHX) é um exemplo de um forte inibidor não-específico de MMP-2, -8, -9 e CAT-K e -B em até 80% quando livres ou ligadas à matriz dentinária²⁴⁻²⁷. O mecanismo pelo qual a CHX inibe a atividade catalítica da enzima tem sido relacionado à sua propriedade quelante que promove a sua ligação ao Ca^{2+} e Zn^{2+} na estrutura da enzima e impede a atividade catalítica²⁸.

Como o ambiente iônico pode modular a atividade enzimática, outros agentes terapêuticos também têm sido investigados. O fluoreto de sódio (NaF) inibe MMPs ligadas à matriz dentinária²⁹, salivares³⁰ e recombinantes³¹. Ainda, algum potencial de inativação enzimática do NaF foi observado para CATs ligadas à matriz dentinária³². O mecanismo pelo qual o NaF inibe a atividade enzimática não está esclarecido, embora sugira-se que a elevada eletronegatividade do F^- pode competir pela interação com íons Ca^{2+} e Zn^{2+} , tornando-os menos disponíveis para atividade catalítica³⁰. Ainda, íons metálicos incluindo Al^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} e Hg^{2+} também mostraram um efeito inibitório sobre a atividade de MMPs^{31,33-37}.

Partículas de vidro são muito utilizadas como fonte de liberação de íons. Os cimentos de ionômero de vidro (CIVs), por exemplo, são grandes representantes de materiais incorporados com partículas de vidro dispersas em uma matriz insolúvel de hidrogel, capazes de liberar íons para o substrato. Essas partículas de fluoralumíniosilicato servem como material de preenchimento e conferem a esses cimentos capacidade remineralizadora^{38,39} e antimicrobiana³⁹⁻⁴¹, e são capazes de recarregamento por íons flúor^{39,42}. As partículas de vidro também conferem aos CIVs propriedades mecânicas importantes para um material restaurador, como resistência ao desgaste, resistência mecânica às forças de compressão e resistência à abrasão^{43,44}. Entretanto, quando comparadas as mesmas propriedades da resina

composta, os CIVs são muito inferiores⁴³, o que limita a indicação desses materiais em áreas de esforços mastigatórios como restaurações de classe IV e amplas restaurações de classe I e II, principalmente em dentes permanentes.

Partículas de ionômero de vidro com superfície pré-reagida (S-PRG, *surface pre-reacted glass ionomer*) têm sido incorporadas como partículas bioativas de carga em vários materiais dentários, os quais são denominados de GIOMERs. As partículas S-PGR são constituídas por três camadas. Um vidro multifuncional de fluoro-boro-alumino-silicato em seu centro (*multifuncional glass core*), recoberto com uma fase de cimento de ionômero (camada intermediária), e uma camada superficial cuja tecnologia é patenteada pela SHOFU *Dental Incorporate* (Kioto, Japão). Devido a sua composição, os compósitos resinosos que contém essas partículas (GIOMERs) mantêm suas propriedades mecânicas e estéticas desejáveis e passam a apresentar bioatividade.

Além de F^- , as partículas S-PRG podem liberar cinco outros íons: Al^{3+} , BO_3^{3-} , Na^+ , SiO_3^{2-} e Sr^{2+} ⁴⁶. Assim, vários efeitos terapêuticos têm sido atribuídos à essas partículas, incluindo a capacidade de tamponamento de ácido^{46,47}, inibição da desmineralização^{47,48}, indução da formação de dentina terciária⁴⁹ e propriedades antimicrobianas⁵⁰⁻⁵³.

Também tem sido relatado que o eluato produzido a partir da dissolução dessas partículas inibiu a atividade proteolítica e gelatinolítica de *P. gingivalis*⁵⁴. Assim, é plausível que o eluato de S-PGR poderia exercer efeito inibitório sobre a atividade proteolítica dentinária. Portanto, este estudo avaliou o efeito do eluato de partículas S-PRG sobre a atividade de MMPs ligadas à matriz de dentina e, consequentemente, sobre a degradação do colágeno dentinário. As hipóteses nulas testadas foram que (1) o eluato de partículas S-PRG não apresentaria efeito inibitório sobre a atividade de MMPs ligadas à dentina e (2) sobre a degradação do colágeno da matriz dentinária.

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito inibitório in situ de um eluato produzido a partir de partículas liberadoras de íons (S-PRG) sobre MMPs ligadas à matriz e sobre a degradação do colágeno da matriz dentinária.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Será apresentada a seguir a revisão de literatura, com base em estudos antigos e recentes publicados sobre os temas.

3.1 Composição da dentina

A dentina é um tecido conjuntivo mineralizado, avascular e acelular localizado subjacente ao esmalte dentário. A matriz dentinária é depositada por odontoblastos presentes na polpa dental e constitui a maior parte do dente⁵⁵. Sua composição correspondente ao peso é de 70% de matriz inorgânica (cristais de apatita), 20% de matriz orgânica e 10% de água¹. Possui uma morfologia específica, caracterizada por túbulos dentinários (~0,9-3,1 µm diâmetro), que variam seu diâmetro de acordo com a proximidade do tecido pulpar: quanto mais próximos a ele, mais amplos⁵⁵. Os túbulos dentinários são cercados por uma camada hiper mineralizada denominada dentina peritubular e uma dentina intertubular com menor conteúdo mineral, na qual o material orgânico está concentrado⁵⁵. A matriz intertubular é composta, principalmente, por fibrilas de colágeno do tipo I (aproximadamente 90% em massa) associadas a proteínas não-colagenosas e proteoglicanos, formando uma rede orgânica tridimensional reforçada por minerais de apatita cristalizados^{56,57}. Proteínas não colagenosas representam 10% do conteúdo orgânico da dentina e, dentro do contexto do presente trabalho, destacam-se as proteases dentinárias.

3.2 Proteases dentinárias

As proteases dentinárias ou endopeptidases são enzimas essenciais para a remodelação e mineralização no processo de dentinogênese. À medida que a matriz dentinária é mineralizada, essas enzimas ficam aprisionadas no tecido, e permanecem em estado latente como precursores enzimáticos (zimogênios)^{3,4}. Entretanto, frente a processos que envolvem a dissolução mineral da dentina, como ocorre nas lesões de cárie, lesões erosivas ou durante o condicionamento ácido dos procedimentos restauradores adesivos, essas enzimas são liberadas e ativadas; assim, passam a exercer novamente o seu papel de degradação dos componentes da matriz extracelular da dentina, incluindo o colágeno na sua forma nativa ou

desnaturada^{58,59}. Como consequência da reativação dessas enzimas, ocorre o aumento das lesões de cárie e de erosão, assim como a degradação do componente orgânico presente nas camadas híbridas, as quais são responsáveis pelo selamento da dentina e adesão do material restaurador resinoso^{60,20}.

As metaloproteinases da matriz (MMPs) e as cisteínas catepsinas (CATs) são as duas classes (famílias) de proteases presentes na matriz orgânica da dentina^{3,4}. As MMPs são produzidas principalmente por células do tecido conjuntivo, incluindo odontoblastos. As MMPs contêm íons zinco no seu sítio de ação catalítico para que exerçam a sua função de quebra de ligações peptídicas, além de íons cálcio, responsáveis por manter sua conformação estrutural terciária estável e ativa, sendo, assim, denominadas enzimas metal-dependentes (ou metaloproteinases)^{1,61}. Sabe-se que as MMP-2 e -9 são as mais importantes no que se refere a degradação da camada híbrida na dentina, contudo há outras MMPs identificadas na dentina humana, como a collagenase MMP-8, as gelatinases MMP-2 e MMP-9, a matrilisina MMP-7 e a enamelesina MMP-20^{62,63}.

As CATs são endopeptidases produzidas por vários tipos de células, incluindo os odontoblastos. Assim como as MMPs, as CATs têm a capacidade de degradar componentes da matriz extracelular, principalmente colágeno do tipo I, laminina, fibronectina e proteoglicanos^{64,65}. Existem 11 CATs humanas conhecidas atualmente, que são B, C, F, H, K, L, O, S, V, X e W. Elas têm em comum na sua estrutura um sítio ativo formado por resíduos de cisteína (Cys) e histidina (His), aminoácidos fundamentais para sua atividade⁶⁶. Entretanto, na dentina humana foram identificadas somente as catepsinas B, C, K, L e O, sendo que a CAT-K compreende 98% da atividade das CATs sobre o colágeno e se difere na capacidade de clivar o colágeno helicoidal em múltiplos locais. Porém, embora MMPs e CATs coexistam na matriz dentinária, a atividade enzimática de quebra do colágeno por MMPs parece ser maior do que a atividade das CATs^{67,68}.

3.3 Mecanismos de inibição das proteases e seus inibidores

A atividade de proteases pode ser inibida por inibidores endógenos e exógenos. Diferentes células produzem inibidores endógenos que modulam a atividade de proteases em tecidos saudáveis, restringindo o processo de degradação¹⁷. Os inibidores endógenos teciduais são denominados TIMPs (*tissue inhibitors of*

metalloproteinases). Porém, estudos têm se concentrado na atividade inibitória exercida por agentes exógenos a fim de mediar processos destrutivos ao tecido, como a progressão de lesões de cárie e erosivas, além de preservação de interfaces adesivas^{5,9,11,22}.

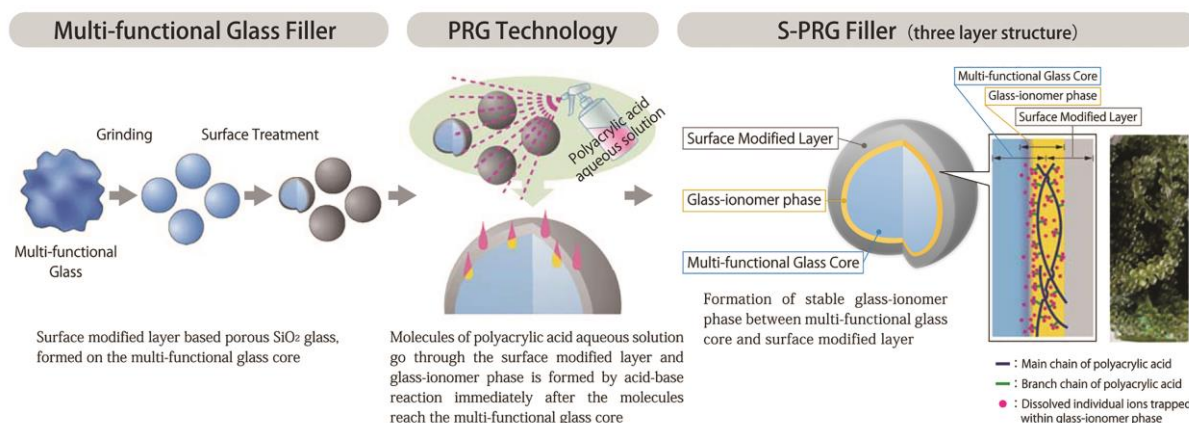
Dentre os inibidores exógenos, a clorexidina (CHX) destaca-se por ser um exemplo de um forte inibidor não-específico de MMP-2, -8, -9 e CAT-K e -B em até 80% quando livres ou ligadas à matriz dentinária²⁴⁻²⁷. O mecanismo de ação ocorre por meio da alteração da estrutura tridimensional dessas enzimas e quelação dos íons metálicos (Ca^{2+} e Zn^{2+}) por meio da adição de cloreto de sódio, que impede a ação enzimática²⁴. Nos procedimentos restauradores adesivos, a CHX em solução aquosa é aplicada após o condicionamento ácido e antes da utilização do sistema adesivo. Tem sido demonstrado que aplicação desse inibidor enzimático não-específico preserva a integridade estrutural do colágeno que permanece exposto no interior da camada híbrida^{11,24}. A clorexidina é capaz de inativar todas as MMPs mesmo em baixas concentrações (0,02%), e possui elevada substantividade, propriedade essa que permite a substância ficar retida na matriz orgânica da dentina por um período, que pode ser responsável pela prevenção ou desaceleração da perda de resistência de união de interfaces adesivas à dentina²⁴.

Outra forma de inibição das proteases é por meio da biomodificação do colágeno dentinário por agentes promotores de ligações cruzadas (*crosslinkers*), que são capazes de induzir novas ligações em moléculas de colágeno, tanto no interior das fibrilas como entre as fibrilas, melhorando suas propriedades mecânicas e sua resistência à degradação hidrolítica e enzimática⁶⁰. Além da ligação cruzada na matriz orgânica, os agentes também induzem a formação dessas ligações em outras proteínas dentinárias, incluindo as MMPs e CATs; por esse motivo, atuam como potentes inibidores de proteases, limitando a motilidade molecular das proteases, impedindo o acoplamento do seu sítio ativo ao substrato (colágeno)^{26,27}. Os *crosslinkers* mais estudados incluem as proantocianidinas (PA), a carbodiimida (EDC) e o glutaraldeído (GA), apresentando resultados promissores para a preservação de interfaces adesivas em dentina.

3.4 Partículas S-PRG e suas propriedades bioativas

Partículas de ionômero de vidro com superfície pré-reagida (S-PRG, *surface pre-reacted glass ionomer*) têm sido incorporadas como partículas bioativas de carga em vários materiais dentários, os quais são denominados GIOMERs. As partículas S-PGR são constituídas por três camadas (Figura 1). Um vidro multifuncional de fluoro-boro-alumino-silicato em seu centro (multifuncional glass core), recoberto com uma fase de cimento de ionômero (camada intermediária), e uma camada superficial cuja tecnologia é patenteada pela SHOFU *Dental Incorporate* (Kioto, Japão).

Figura 1 – Representação esquemática da manufatura e das três camadas que compõem as partículas S-PRG

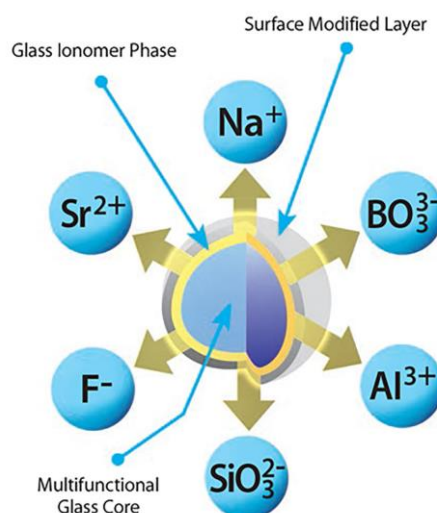


Fonte: Shofu Dental Corporation.

As partículas S-PGR liberam seis diferentes íons, que são: flúor (F^-), sódio (Na^+), estrôncio (Sr^{2+}), alumínio (Al^{3+}), borato (BO_3^{3-}) e silicato (SiO_3^{2-}) (Figura 2), e diversas propriedades bioativas têm sido atribuídas a esses íons quando liberados das partículas⁴⁵. Essas propriedades afetam positivamente o sucesso de um tratamento restaurador, como o reforço da estrutura dentária, o tamponamento de ácidos, a inibição da desmineralização, e a inibição da adesão do biofilme. As partículas S-PGR possuem um efeito de modulação em condições ácidas produzidas por microrganismos cariogênicos orais, fazendo com que o ambiente fique com pH neutro ou levemente alcalino. Tal efeito de modulação deve-se a liberação de íons BO_3^{3-} , Na^+ , Sr^{2+} e F^- ⁴⁶. Outra vantagem das partículas S-PRG é que possibilitam a recarga desses íons multifuncionais⁵³. A quantidade de liberação desses íons é

proporcional à concentração de partículas presentes no material, ou seja, quanto maior a concentração das partículas maior será sua liberação no meio⁴⁶.

Figura 2 – Íons liberados pelas partículas S-PRG, presentes na camada intermediária da partícula, correspondente a fase de ionômero de vidro



Fonte: Shofu Dental Corporation.

Além do fluoreto, os íons BO_3^{3-} , Na^+ , Al^{3+} , SiO_3^{2-} e Sr^{2+} estão envolvidos na neutralização e na redução subsequente da desmineralização do esmalte^{47,48}. O íon Sr^{2+} possui a capacidade de promover a remineralização, com um efeito sinérgico sendo observado quando aplicado em conjunto com o F^- ⁴⁷. Essa combinação de íons pode ser vantajosa para substituir os íons hidroxila e cálcio na estrutura da apatita, resultando na formação de estroncioapatita. Adicionalmente, o Sr^{2+} também apresenta um excelente efeito antibacteriano⁴⁷. Ainda, tem sido demonstrado que em materiais para capeamento pulpar direto contendo as partículas S-PRG, o estrôncio apresenta efeito positivo no processo de reparação de injúrias ao complexo dentina-polpa, sendo potencializado quando associado à liberação dos demais íons, promovendo a formação de dentina terciária após exposição pulpar⁴⁹.

Um eluato produzido a partir de uma solução aquosa saturada de partículas S-PRG foi avaliado quanto aos seus efeitos sobre a formação de biofilme e sobre a halitose, apresentando efeitos inibitórios na formação de biofilme e uma capacidade de interromper biofilmes maduros, porém com a necessidade de estar em concentrações mais altas neste último caso^{50,54}. Esse fenômeno pode estar

relacionado ao efeito inibitório na aderência, coagregação e atividade da protease de bactérias orais⁵⁰. Resinas compostas contendo essas partículas incorporadas apresentaram redução na aderência de bactérias (biofilme) nas restaurações, sendo esse efeito atribuído à liberação dos diferentes íons^{50,51}. Os íons do eluato produzido a partir de partículas S-PRG têm o potencial de penetrar no biofilme dentário, podendo ser absorvidos pela membrana celular ou de atravessar essa membrana para suprimir a atividade metabólica⁵⁰. Ainda, foi demonstrado que enxaguar a boca e limpar a língua com o eluato reduz imediatamente a quantidade de bactérias presentes na cavidade oral e a quantidade de compostos de enxofre voláteis, sendo um novo método de controle do mau hálito⁵⁰. Outra propriedade atribuída ao eluato de partículas S-PRG é sua atividade antifúngica. Íons liberados inibem efetivamente o crescimento e os fatores patogênicos de *C. albicans*⁵³.

Embora várias propriedades desejáveis já tenham sido demonstradas, a inibição da atividade proteolítica e gelatinolítica tecidual ainda necessita ser investigada, especialmente no contexto restaurador. Como mencionado no item 3.2, proteases dentinárias exercem um papel importante na degradação da união resina-dentina, e a inibição dessas proteases melhoram a longevidade dessas interfaces. Até o momento, apenas é conhecida a atividade anticolagenolítica e antigelatinolítica exercida pelas partículas S-PGR sobre bactérias *P. gingivalis*⁵⁴.

4 MATERIAL E MÉTODO

Neste estudo trabalhamos com os materiais e métodos a seguir.

4.1 Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo do tamanho da amostra para cada variável resposta foi baseado em estudos anteriores^{26,27}, utilizando o *software* G*Power (versão 3.1.9.6). O poder (probabilidade de erro $1-\beta$) e probabilidade de erro α foram fixados em 80% e 5%, respectivamente, para todas as variáveis de resposta. O tamanho do efeito foi calculado individualmente usando médias e desvios-padrão dos tratamentos com água e CHX a 2%. O tamanho do efeito para a atividade total de MMPs foi de 2,1, para a liberação de fragmentos de colágeno foi de 2,5, a liberação de hidroxiprolina (Hyp) foi de 4,9 e a alteração da massa seca (considerando o período de 7 dias) foi de 3,0. Portanto, o tamanho estimado da amostra por grupo foi 5 para atividade total de MMPs, 4 para liberação de colágeno, 3 para liberação de Hyp e 4 para alteração de massa. Considerando que os grupos tratados com eluato de partículas S-PRG apresentariam valores intermediários entre os grupos tratados com água e tratados com CHX, o tamanho final da amostra de 10 espécimes por grupo foi definido para todas as variáveis de resposta.

4.2 Preparação dos espécimes de matriz dentinária

Trinta terceiros molares humanos hígidos foram obtidos após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (protocolo nº 32520020.7.0000.5416, ANEXO A, p.45). Os dentes foram armazenados a 4 °C em 0,1% de solução de timol para prevenir o crescimento bacteriano e usados dentro de 3 meses após a extração. De cada dente, um disco de dentina com 0,5 mm de espessura foi obtido do terço médio coronário. Para isso, o esmalte e a dentina superficial foram removidos por corte horizontal utilizando disco de cobre de 0,3 mm revestido com diamante acoplado a máquina de corte de precisão (Isomet 1000, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA) sob refrigeração com água. Discos apresentando ilhas de esmalte e projeção do corno pulpar foram descartados. Em seguida, dois espécimes de dentina 5,0 × 2,0 × 0,5 mm foram seccionados do terço médio dos discos sob refrigeração com água e as medidas foram verificadas com paquímetro

digital com resolução de 0,01 mm (Mod. 500-144b, Mytutoyo Sul Americana Ltda., São Paulo, SP, Brasil), totalizando quarenta espécimes.

Os espécimes foram desmineralizados em tubos contendo solução aquosa de ácido fosfórico a 10%⁷⁰. Os tubos foram colocados em um misturador rotativo vertical (Phoenix-Luferco, Araraquara, SP, Brasil) e permaneceram sob agitação constante por 48h a 4°C para garantir a completa dissolução do mineral. Após o período de desmineralização, as matrizes dentinárias foram enxaguadas com água deionizada sob agitação constante por 2h a 4°C.

4.3 Avaliações preliminares e alocação nos grupos de tratamento

Cada espécime foi cuidadosamente seco com papel absorvente e alocado em poços identificados de uma placa de 96 poços mantida em um dessecador contendo sílica e sulfato de cálcio anidro por 72h. Após esse período, a massa seca dos espécimes foi aferida em balança analítica com sensibilidade de 0,01 mg (XS105 Microbalance, Mettler Toledo, Hightstown, NJ, EUA) até obter um valor constante.

Em seguida, os espécimes foram reidratados em 100 µL de água deionizada por 1h a 4°C para determinar a atividade endógena total inicial de MMPs ligadas à matriz dentinária. Para isso, os espécimes foram alocados em poços de uma placa de 96 poços contendo 300 µL de um substrato cromogênico de MMPs genérico tamponado (kit de ensaio colorimétrico Sensolyte Generic MMP - catálogo nº 72095, lote nº 1031, AnaSpec Inc. Fremont, CA, EUA). Após 60 min a 37°C, os espécimes foram removidos dos poços, e a atividade total de MMPs de cada amostra foi determinada medindo a absorbância da solução contida em cada poço a 412 nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia). Os espécimes foram abundantemente enxaguados em água deionizada e armazenados individualmente em tubos a 100% de umidade relativa e 4°C até a realização dos tratamentos. A alocação dos espécimes nos quatro grupos de tratamento considerou valores médios semelhantes de massa seca inicial e atividade de MMPs verificados por meio de análises de variância a um fator após avaliação da distribuição normal (Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (Levene) dos dados ($\alpha=5\%$).

4.4 Obtenção do eluato de partículas S-PRG

O eluato de partículas S-PRG foi preparado conforme descrito em estudo prévio⁴⁶ e fornecido pelo fabricante (Shofu Inc, lote #081922, Kyoto, Japão). Partículas de S-PRG (ca. 3 μm) foram diluídas em água destilada (1:1), seguido por agitação a 23°C durante 24h. Em seguida, a mistura foi centrifugada para sedimentar as partículas. O sobrenadante foi coletado e filtrado (Chromato Disk; 25a tipo hidrofílico, diâmetro: 25 mm, tamanho de poro: 0,45 μm ; GL Sciences Inc., Tóquio, Japão). As concentrações de íons liberados (Tabela 1) foram analisadas usando espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICPS-8000, Shimadzu Corp., Kyoto, Japão) e eletrodos de íon de flúor (Modelo 9609BNWP, Orion Research, Boston, MA, EUA). O pH final do eluato foi $7,8 \pm 0,1$.

Tabela 1 - Concentrações (em mM e ppm) dos íons presentes no eluato obtido a partir da dissolução de partículas S-PRG em água destilada seguido por filtragem

Concentração	Íon					
	Al ³⁺	BO ₃ ³⁻	Na ⁺	SiO ₂ ³⁻	Sr ²⁺	F ⁻
mM	0,72	136,92	23,89	0,51	1,73	7,13
ppm	19,42	8.052,40	525,44	91,92	151,58	128,34

Fonte: Elaboração própria.

4.5 Tratamento da matriz dentinária

Cada espécime foi retirado de seu recipiente de armazenamento, cuidadosamente seco com papel absorvente, e imerso em um tubo com 1 mL da solução de tratamento durante o período de cada tratamento, sob agitação constante a 200 rpm a 25°C (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha). Os espécimes (n=10/tratamento) foram tratados com: G1 (Água/Controle): água ultrapura (pH ~ 6,8) por 1 min; G2 (CHX): solução aquosa de digluconato de clorexidina a 2% durante 1 min (pH ~ 7,2) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA); G3 (S-PRG1): Eluato de partículas S-PRG por 1 min, ou G4 (S-PRG30): 30 min. Imediatamente após o tempo estipulado para cada grupo de tratamento, as soluções foram aspiradas. Os espécimes foram enxaguados com 1 mL de água deionizada durante 1 min e secos com papel absorvente para retirar o excesso de água.

4.6 Determinação total da atividade de MMPs pós-tratamento

Concluídos os tratamentos, cada espécime foi transferido para um poço de uma placa de 96 poços previamente preparada com substrato para a mensuração da atividade de MMPs pós-tratamento, conforme descrito anteriormente. A redução da atividade total de MMPs (%) foi calculada considerando os valores iniciais e finais da atividade de MMPs para cada matriz dentinária, e o grupo controle (água) foi utilizado para normalização dos dados a serem considerados como ausência de redução²⁷.

4.7 Perda de massa seca

Depois disso, os espécimes foram enxaguados abundantemente em água deionizada e transferidos individualmente para tubos contendo 600 µL de fluido corporal simulado (SBF; 12,9 mM KCl, 1,9 mM KSCN, 2,4 mM Na₂SO₄.10 H₂O, 3,3 mM NH₄Cl, 1,5 mM CaCl₂.2H₂O, NaHCO₃ 7,5 mM, ZnCl₂ 0,02 mM e tampão HEPES 5,0 mM; pH~7,4)⁷¹. Os tubos foram armazenados em incubadora a 37°C sob agitação (VDRL Shaker, Biomixer, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por até 21 dias. Aos 7, 14 e 21 dias, cada espécime foi removido de seu tubo de armazenamento, enxaguado com água deionizada para remover o excesso de sais do SBF e a massa seca foi reavaliada seguindo o mesmo procedimento descrito para a avaliação inicial. Após aferição de massa seca, os espécimes foram reidratados por 1h em água deionizada antes de serem reimersos em 600 µL de SBF. A variação da massa seca (%) foi calculada pela diferença entre cada período com o anterior. A perda cumulativa de massa seca (%) foi calculada pela diferença entre cada ponto de tempo com a massa inicial.

4.8 Liberação de fragmentos de colágeno

Após 7 dias de armazenamento, a degradação da matriz dentinária foi avaliada pela quantificação dos fragmentos de colágeno solubilizados determinada pelo método de Sirius Red⁷². Esse método é baseado na ligação seletiva da solução corante aos colágenos dos tipos I a IV, quantificando os fragmentos de colágeno solúvel total presentes na amostra⁷³. Para isso, 300 µL da solução de armazenamento homogeneizada foram coletados de cada tubo contendo espécime e misturados (1:1) com solução 0,05M Direct Red 80 (Sigma-Aldrich) em ácido pícrico saturado. As soluções foram incubadas por 1h a 400 rpm e 25°C (Eppendorf AG). Em seguida, os

tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 300 µL de ácido clorídrico 0,01 M a 4°C. Os tubos foram centrifugados novamente (12.000 rpm / 10 min), o sobrenadante foi descartado e 200 µL de hidróxido de sódio 0,5 M foram adicionados para solubilizar os fragmentos de colágeno corados e precipitados. Uma alíquota de 100 µL de cada amostra foi coletada para determinar a absorbância a 555 nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer). Os fragmentos de colágeno solubilizados presentes na amostra foram quantificados por meio de uma curva padrão ($R^2=0,98$) construída com uma solução estoque de colágeno (Sigma-Aldrich) e normalizada com a massa seca de cada feixe expressa em porcentagem em relação ao controle (água).

4.9 Liberação de hidroxiprolina

Como a hidroxiprolina (Hyp) é um aminoácido característico da estrutura do colágeno, compreendendo 9,6% em massa dessa proteína¹, e não sendo encontrado em outras proteínas que compõem a dentina, avaliamos o conteúdo de Hyp no meio de armazenamento (SBF) como um segundo parâmetro indicativo da degradação do colágeno ao longo do tempo^{29,71}.

Após 7 dias, 300 µL da solução de armazenamento homogeneizada foram coletados de cada tubo contendo espécime e colocados em poços separados de uma placa de 96 poços mantida em um dessecador contendo sílica e sulfato de cálcio anidro por 72h. Após a completa secagem dos poços, 100 µL de água ultrapura foram adicionados a cada poço para concentrar as amostras por ressuspensão. As soluções foram misturadas (1:1) com HCl 12 M e transferidas para tubos colocados em um banho seco digital a 120°C (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) por 3h para hidrolisar os peptídeos solubilizados. Após o resfriamento, 2,5 mg de carvão ativado (Sigma-Aldrich) foram adicionados a cada tubo. Os tubos foram centrifugados por 2 min a 13.000 rpm e 100 µL do sobrenadante foram coletados e transferidos para uma placa de 96 poços colocada em um dessecador contendo sulfato de cálcio anidro e sílica para reter o vapor de HCl liberado e secar completamente as amostras. A concentração de Hyp foi determinada por uma reação colorimétrica das amostras oxidadas com 4- (Dimetilamino) benzaldeído (DMAB) de acordo com as instruções do fabricante (MAK008-1KT, Sigma-Aldrich). A absorbância da solução final foi mensurada a 560 nm (Multiskan GO). O teor de Hyp de cada amostra foi quantificado por meio de uma curva padrão ($R^2=0,99$) construída com uma solução estoque de Hyp

do kit e normalizada com a massa seca de cada feixe expresso em porcentagem em relação ao controle (água).

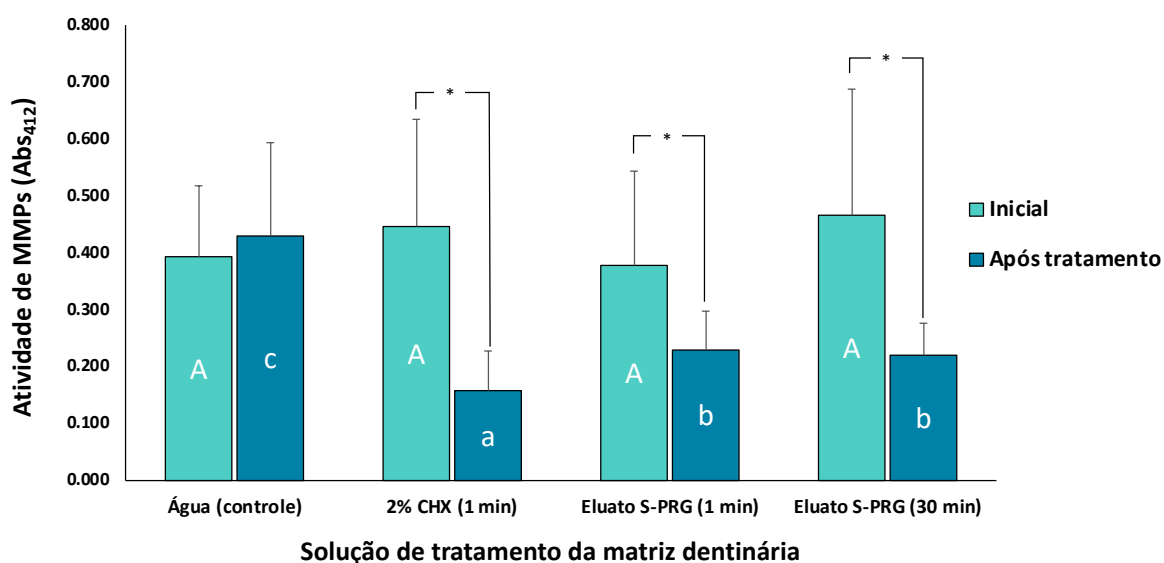
4.10 Análise de dados

Todos os experimentos foram realizados em duas ocasiões (duplicata experimental) para minimizar erros sistemáticos e permitir observar a reprodutibilidade. As análises estatísticas foram realizadas com o *software* SPSS (versão 26.0, IBM Inc., Chicago, IL, EUA). Todas as inferências estatísticas foram baseadas no nível de significância de 5% pré-estabelecido. Os conjuntos de dados da atividade total de MMPs, liberação de fragmentos de colágeno (FC) e liberação de Hyp apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) e as variâncias foram homogêneas (Levene, $p > 0,05$). Portanto, esses dados foram analisados com ANOVA a um fator complementada com Tukey. Os dados de atividade de MMPs também foram analisados com testes t pareados. Os dados da mudança de massa seca apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) e foram analisados com ANOVA para medidas repetidas complementadas com Sidak.

5 RESULTADOS

A Figura 3 representa a atividade total de MMPs em espécimes de matriz de dentina antes e depois do tratamento com água, CHX ou eluato de S-PRG. Todos os grupos experimentais apresentaram atividade de MMPs total inicial semelhante antes dos tratamentos ($p=0,65$, ANOVA). Após os tratamentos, os espécimes tratados com CHX e S-PRG mostraram menor atividade de MMPs do que os espécimes tratados com água ($p<0,0001$, Tukey). Exceto para as amostras tratadas com água ($p=0,1597$, teste t pareado), esses valores foram significativamente menores do que antes dos tratamentos ($p\leq 0,0058$, teste t pareado). Os espécimes tratados com S-PRG mostraram, independentemente do tempo de exposição (1 ou 30 min), atividade total de MMPs intermediária entre os espécimes tratados com água e com CHX.

Figura 3 – Atividade total de MMPs em espécimes de matriz dentinária antes e depois do tratamento com água, clorexidina 2% (CHX) ou eluato de S-PRG



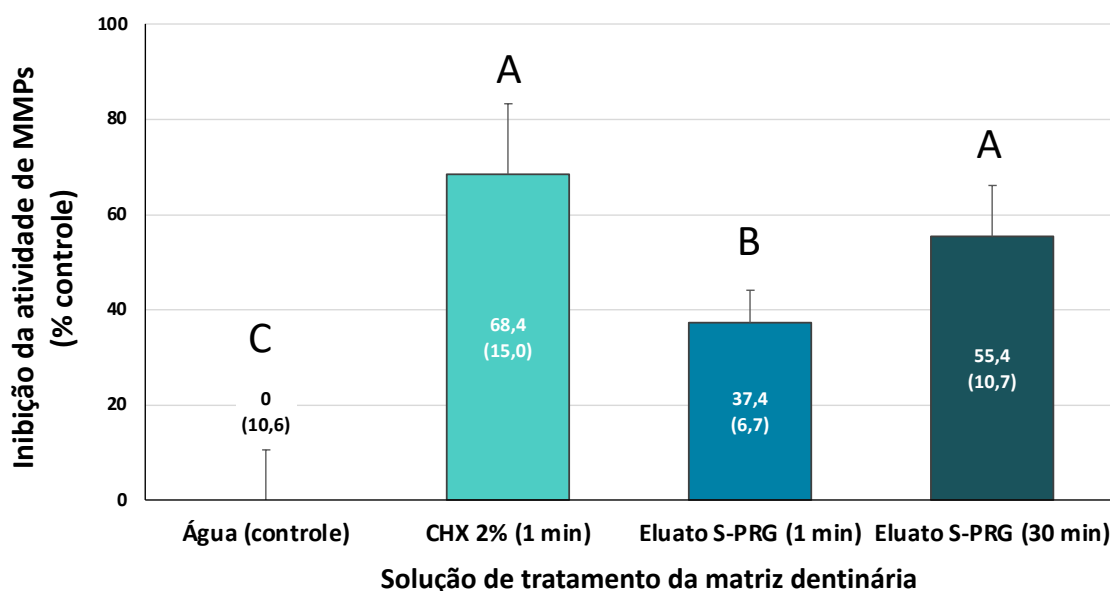
As colunas representam as médias e as barras de erro representam o desvio padrão ($n=10$). Colunas conectadas pelo asterisco (*) são estatisticamente diferentes (teste t pareado, $p<0,05$). As letras maiúsculas permitem comparações entre os grupos antes do tratamento (ANOVA), enquanto as letras minúsculas permitem comparações entre os grupos após o tratamento (Tukey). Os grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente ($p>0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

A redução da atividade de MMPs é mostrada na Figura 4. O tratamento com CHX e S-PRG30 apresentou as maiores atividades inibitórias ($p<0,0001$; Tukey), reduzindo em 68,4% e 55,4%, respectivamente. O tratamento com eluato de S-PRG

por 1 min também apresentou efeito inibitório significativo (37,4%), intermediário entre o controle e os outros dois grupos ($p \leq 0,0045$; Tukey).

Figura 4 – Porcentagem de inibição da atividade de MMP em espécimes de matriz dentinária após tratamento com água, clorexidina 2% (CHX) ou eluato de partículas S-PRG

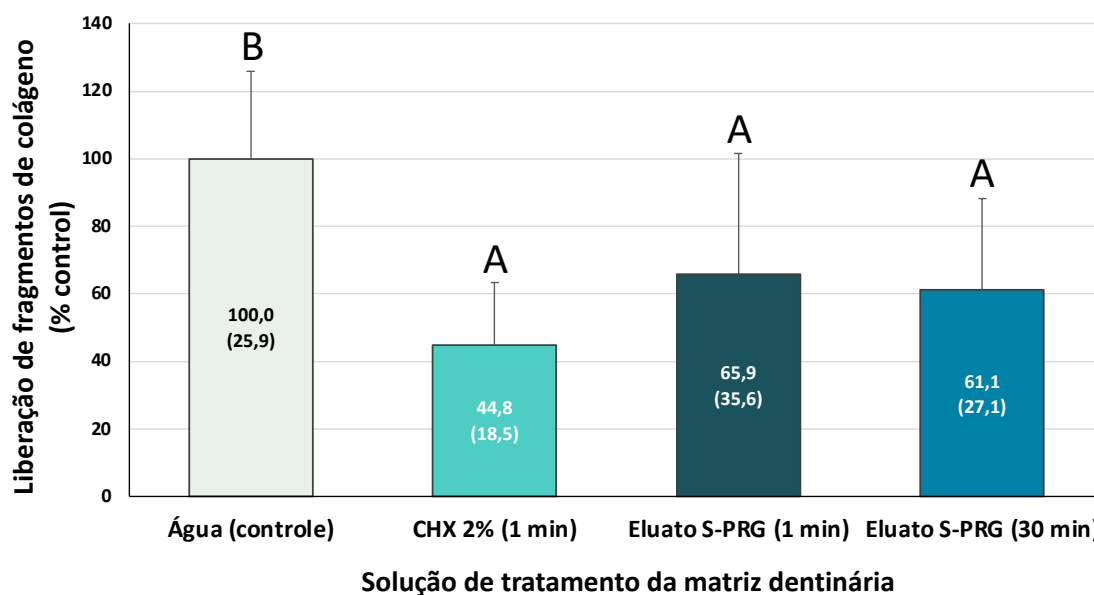


Colunas representam as médias e as barras de erro representam o desvio padrão ($n=10$). Os mesmos dados estatísticos são mostrados numericamente dentro das colunas. As colunas identificadas com a mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey, $p > 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

A estimativa quantitativa dos fragmentos de colágeno liberados após 7 dias de tratamentos (porcentagem do grupo de controle tratado com água) está representada na Figura 5. Em comparação com os espécimes tratados com água, todos os outros grupos apresentaram liberação significativamente menor ($p \leq 0,007$, Tukey) de fragmentos de colágeno, sem diferenças entre eles ($p \geq 0,92$, Tukey).

Figura 5 – Estimativa quantitativa do colágeno (ensaio de Sirius Red) liberado de espécimes de matriz dentinária e detectado no meio de armazenamento (fluido corporal simulado) após 7 dias de incubação

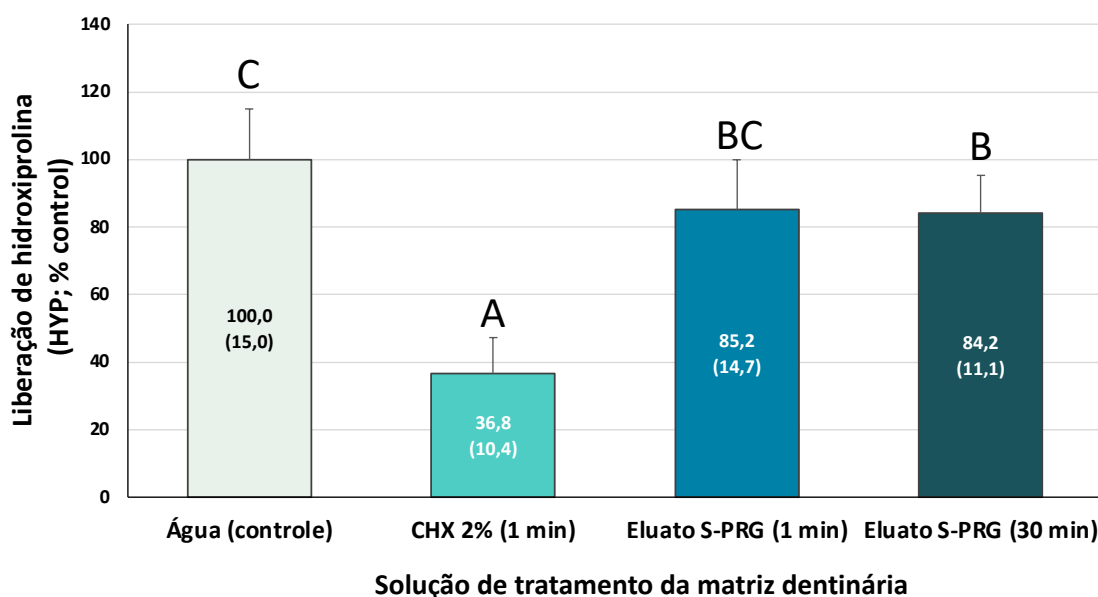


Espécimes foram tratadas com água, clorexidina 2% (CHX) ou eluato de S-PRG. Colunas representam as médias e as barras de erro representam o desvio padrão (n=10). Os mesmos dados estatísticos são mostrados numericamente dentro das colunas. As colunas identificadas com a mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey, $p > 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Da mesma forma, a liberação de Hyp após 7 dias de tratamentos foi menor ($p \leq 0,036$, Tukey, Figura 6) para espécimes tratados com CHX e S-PRG em comparação com o controle; independentemente do tempo de exposição, as matrizes tratadas com S-PRG apresentaram liberação intermediária de Hyp entre os grupos controle e CHX (Figura 6).

Figura 6 – Liberação de hidroxiprolina (porcentagem relacionada ao controle) de de espécimes de matriz dentinária armazenadas por 7 dias em fluido corporal simulado após tratamento com água, clorexidina 2% (CHX) ou eluato de S-PRG

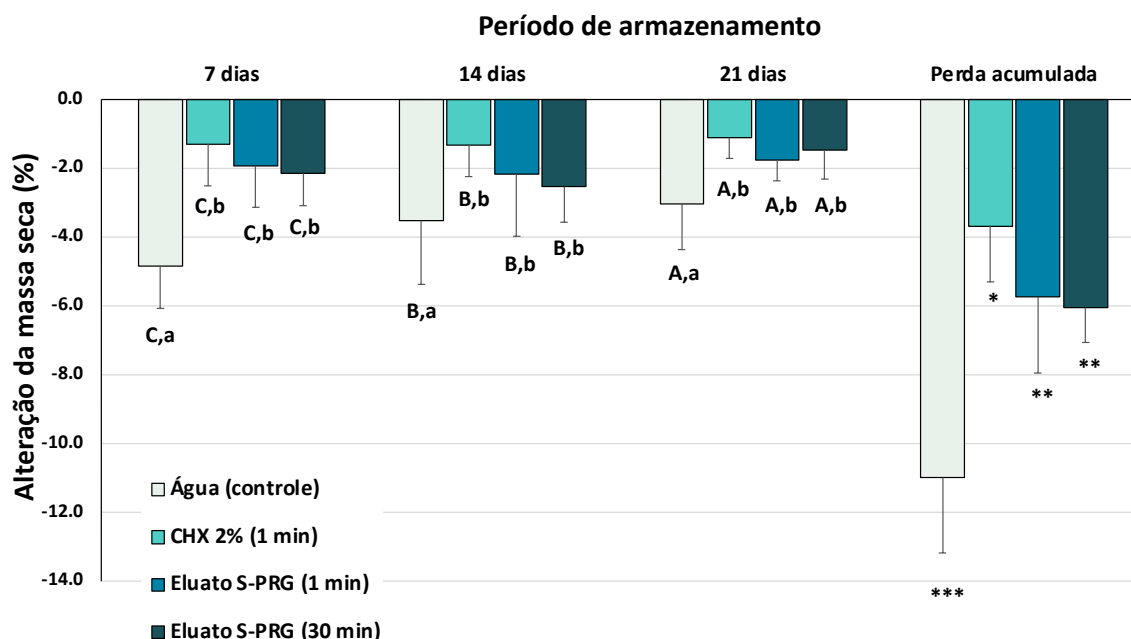


Colunas representam as médias e as barras de erro representam o desvio padrão (n=10). Os mesmos dados estatísticos são mostrados numericamente dentro das colunas. As colunas identificadas com a mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey, $p > 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

A alteração de massa seca após 7, 14 e 21 dias é ilustrada na Figura 7. A perda de massa seca foi semelhante para todos os grupos em cada período ($p = 0,091$, ANOVA para medidas repetidas); espécimes tratados com água (controle) apresentaram maior perda ($p \leq 0,017$, Sidak), independentemente do período. Após 21 dias, os grupos CHX e S-PRG mostraram uma perda de massa cumulativa menor - cerca de metade ou menos - em comparação com o controle ($p \leq 0,017$, Sidak).

Figura 7 – Alteração da massa seca dos espécimes de matriz dentinária tratados com água, clorexidina 2% (CHX) ou eluato de S-PRG e armazenadas por 7, 14 e 21 dias em fluido corporal simulado



Colunas representam as médias e as barras de erro representam o desvio padrão (n=10). Letras maiúsculas permitem comparações para a mesma solução de tratamento entre os períodos de armazenamento; as letras minúsculas permitem comparações para as soluções de tratamento dentro do mesmo período (ANOVA para medidas repetidas e Sidak). Os grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente ($p>0,05$). Para a mudança cumulativa de massa seca (perda acumulada), as colunas indicadas com o mesmo número de asteriscos não diferem estatisticamente (Sidak, $p>0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi delineado para investigar o efeito do eluato de partículas S-PRG na atividade proteolítica dentinária, a qual está diretamente relacionada à progressão de lesões de cárie, erosão e biodegradação das interfaces de união resina-dentina^{6,8}. Neste estudo, o tratamento da matriz dentinária com o eluato de S-PRG reduziu de uma maneira tempo-dependente a atividade de MMPs em cerca de metade. Portanto, a primeira hipótese nula de que o eluato de S-PRG não apresentaria um efeito inibitório na atividade de MMPs ligada à matriz dentinária foi rejeitada. Da mesma forma, o eluato de S-PRG reduziu significativamente a liberação de FC, Hyp e a perda de massa seca dos espécimes de dentina desmineralizada. A liberação de fragmentos de colágeno, hidroxiprolina e a perda de massa seca foram utilizadas como medidas indiretas para avaliar a solubilização da matriz dentinária por proteases ligadas ao colágeno. Assim, a segunda hipótese nula de que o eluato de S-PRG não apresentaria efeito inibitório na degradação da matriz dentinária também foi rejeitada.

Como controle inibitório, utilizou-se a CHX, uma vez que essa molécula apresenta capacidade de se ligar eletrostaticamente à dentina e alterar a configuração do sítio ativo de MMPs, tornando-as inativas^{28,70}. MMPs requerem cálcio para manter sua estrutura terciária e íons zinco para manter sua atividade catalítica e, uma vez que a CHX apresenta ação quelante, sugere-se que essa bisguanida catiônica exerce sua ação inibitória via o sequestro desses íons metálicos²³. Recentemente, foi relatado que a CHX pode ser identificada em espécimes de dentina mesmo após 10 anos de envelhecimento⁷⁵, indicando efeito inibitório prolongado. A atividade inibitória de 2% de CHX em MMPs recombinantes foi relatada como variando entre 74,3% e 81,9%²⁶. Para MMPs ligadas à matriz dentinária, a inibição foi em torno de 79% quando utilizados espécimes parcialmente desmineralizados²⁷. Neste estudo, a CHX inibiu em torno de 68%. Esse achado pode estar relacionado à desmineralização completa dos espécimes de dentina que criaram uma área interfibrilar desafiadora (5 mm³) a ser infiltrada pela CHX. Apesar disso, o tratamento da matriz dentinária com CHX reduziu significativamente a liberação de Hyp e a perda de massa seca, corroborando com outros estudos^{26,63}.

As partículas S-PRG são incorporadas em diversos materiais dentários restauradores devido às várias propriedades bioativas. Como os efeitos terapêuticos estão relacionados à propriedade de liberação de íons, o uso de um eluato preparado

a partir das S-PRG tem sido bastante investigado. Nos últimos anos, verificou-se que o eluato de S-PRG, como o utilizado no presente estudo, pode reduzir a atividade proteolítica de *P. gingivalis*, que é a principal atividade atribuída à degradação do tecido na periodontite⁵⁴. No entanto, o experimento realizado por Yoneda et al.⁵⁴ (atividade gelatinolítica) não foi capaz de esclarecer a extensão da inibição. Alternativamente, analisamos o efeito do eluato de S-PRG na atividade total de MMPs por meio de um ensaio colorimétrico quantitativo, que possibilitou determinar a porcentagem de inibição em relação a um controle. Além disso, avaliamos o efeito inibitório sobre as MMPs ligadas à matriz dentinária, visto que é a forma que se apresentam in situ e são menos suscetíveis à inibição ou inativação quando comparados às MMPs recombinantes ou isoladas^{76,71}.

Interações iônicas podem ser a base do mecanismo pelo qual o eluato de S-PRG inibiu a atividade de MMPs. As MMPs requerem cálcio e zinco para manter sua estrutura¹⁷. Além disso, para degradar o colágeno, as MMPs devem se ligar em locais específicos da cadeia peptídica por meio do íon zinco catalítico presente no sítio ativo^{77,78}. Considerando que o eluato de S-PRG contém muitos ânions, é razoável inferir que as interações iônicas tornem esses cátions menos disponíveis. Portanto, se os ânions podem reagir com o cálcio ou zinco presente na estrutura da enzima, a supressão da atividade catalítica por um distúrbio estrutural é viável. MMPs salivares recombinantes e purificadas foram inibidas em 75 a 275 ppm F⁻^{30,29}. Neste estudo, o eluato de S-PRG continha 138 ppm F⁻, sugerindo um papel importante nos efeitos inibitórios da atividade de MMPs. Vale ressaltar que o íon mais prevalente no eluato de S-PRG produzido foi o BO₃³⁻ (8.052 ppm), que pode ter papel relevante na inibição pelos mesmos mecanismos do F⁻. Outros íons, incluindo Al³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Sn²⁺ e Hg²⁺ também mostraram um efeito inibitório na atividade de MMPs³³⁻³⁷, apoiando nossos achados e hipóteses. No entanto, sua possível interação com a estrutura das MMPs requer investigações. Assim, novos estudos podem esclarecer quais íons do S-PRG são mais relevantes para a inibição proteolítica e como essa inibição ocorre.

Embora apenas 1 minuto de exposição do eluato de S-PRG tenha apresentado um efeito inibitório significativo, esse efeito foi maior quando a exposição aumentou para 30 minutos, sendo comparável à CHX. Esse achado pode indicar que a inibição de MMPs pelo eluato S-PRG está diretamente relacionada ao tempo disponível para os íons interagirem com a matriz dentinária. A inibição das MMP-2 e -9 encontradas na saliva humana dependem do tempo em que o F⁻ permanece na boca³⁰. Além de

inibir MMPs, foi relatado que F^- também pode inibir CAT-B e $-K^{32,79}$. Isso levanta evidências de que os íons eluídos das partículas de S-PRG podem promover um efeito inibitório abrangente na atividade proteolítica dentinária. Dada a propriedade de liberação de íons das partículas de S-PRG⁴⁶, pode-se supor que materiais restauradores contendo preenchimento de S-PRG também podem produzir alguma atividade inibitória de longa duração. No entanto, isso deve ser mais investigado.

A liberação de Hyp e fragmentos de colágeno (ensaio de Sirius red) foram usados como medidas indiretas de que a matriz dentinária foi degradada por proteases endógenas. Enquanto o primeiro está relacionado a peptídeos solubilizados específicos, o último permite estimar fragmentos maiores de colágeno e da matriz dentinária, sendo complementares^{73,29,71}. Além disso, a perda de massa ao longo do tempo foi outro parâmetro adicional usado para fortalecer os resultados. Embora o efeito inibitório do eluato de S-PRG na atividade de MMPs tenha aumentado com tempos de exposição mais elevados, ambos os grupos (1 ou 30 min) promoveram uma redução semelhante na degradação da matriz dentinária. Além da inibição de proteases, outro possível efeito do eluato de S-PRG pode ser a ligação de íons ou sais de metal à estrutura do colágeno, que pode atuar como um “revestimento” para prevenir a atividade enzimática³⁵. Dessa forma, íons e sais metálicos podem se ligar competitivamente ao local do colágeno ao qual as proteases também se ligam. Portanto, as proteases podem se tornar incapazes de se ligar ao colágeno para exercer atividade enzimática, fazendo com que a degradação do colágeno mediada por proteases seja suprimida³⁶.

Neste estudo, foram demonstrados os efeitos inibitórios in situ do eluato de S-PRG na atividade proteolítica da dentina. Embora um efeito inibitório tempo-dependente tenha sido encontrado, mesmo 1 minuto de exposição foi suficiente para promover a inibição de MMPs e diminuir significativamente a degradação da matriz dentinária em 21 dias. No entanto, a duração desse efeito a longo prazo não foi avaliada, sendo uma limitação do estudo. Ainda, como os efeitos foram avaliados apenas usando o eluato de partículas S-PRG, é questionável se os materiais restauradores contendo essas partículas podem liberar concentrações de íons capazes de promover um efeito inibitório. Além disso, íons e sais de metal que podem estar envolvidos na atividade inibitória podem lixiviar da matriz de dentina. Portanto, a eficácia inibitória de longo prazo promovida pelos íons S-PRG permanece questionável. Recentemente, o eluato de S-PRG (1:1) mostrou citotoxicidade severa

quando em contato direto com fibroblastos gengivais humanos⁸⁰. Assim, os efeitos da liberação de íons nas células pulpareas também devem ser levados em consideração ao usar esse tratamento diretamente sobre dentina. Estudos futuros podem revelar como esse efeito inibitório pode ser aplicável para limitar a biodegradação de interfaces adesivas, bem como a progressão de lesões cariosas e erosivas.

7 CONCLUSÃO

O tratamento da dentina desmineralizada com eluato de partículas S-PRG reduziu a atividade total de MMPs ligadas à matriz e a degradação da matriz dentinária por até 21 dias.

REFERÊNCIAS*

1. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition, and mineralization. *Front Biosc (Elite Ed)*. 2011; 3(1): 711–35.
2. Orsini G, Ruggeri Jr A, Mazzoni A, Nato F, Manzoli L, Putignano A et al. A review of the nature, role and function of dentin non-collagenous proteins: part 1: proteoglycans and glycoproteins. *Endod Topic*. 2012; 21: 1-18.
3. Fonović M, Turk B. Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1840(8): 2560-70.
4. Amar S, Smith L, Fields GB. Matrix metalloproteinase collagenolysis in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2017; 1864(11 Pt A): 1940-51.
5. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res*. 1998; 77(8): 1622-29.
6. Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay RF et al. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res*. 2015; 94(2): 241-51.
7. Tjäderhane L, Buzalaf MA, Carrilho M, Chaussain C. Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: the era of 'dentin degradomics'. *Caries Res*. 2015; 49(3): 193-208.
8. Buzalaf MA, Charone S, Tjäderhane L. Role of host-derived proteinases in dentine caries and erosion. *Caries Res*. 2015; 49(Suppl 1): 30-7.
9. Zarella BL, Cardoso CA, Pelá VT, Kato MT, Tjäderhane L, Buzalaf MA. The role of matrix metalloproteinases and cysteine-cathepsins on the progression of dentine erosion. *Arch Oral Biol*. 2015; 60(9): 1340-5.
10. 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.
11. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res*. 2006; 84(8): 741–6.
12. Scaffa PM, Breschi L, Mazzoni A, Vidal CM, Curci R, Apolonio F et al. Co-distribution of cysteine cathepsins and matrix metalloproteases in human dentin. *Arch Oral Biol*. 2017; 74: 101-7.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

13. 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.
14. Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri Jr A et al. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis. *J Biomed Mater Res A.* 2009; 88(3): 697-703.
15. 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.
16. Mazzoni A, Maravić T, Tezvergil-Mutluay A, Tjäderhane L, Scaffa PMC, Seseogullari-Dirihan R et al. Biochemical and immunohistochemical identification of MMP-7 in human dentin. *J Dent.* 2018; 79: 90-5.
17. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003; 92(8): 827-39.
18. Fanchon S, Bourd K, Septier D, Everts V, Beertsen W, Menashi S et al. Involvement of matrix metalloproteinases in the onset of dentin mineralization. *Eur J Oral Sci.* 2004; 112(2): 171-6.
19. 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.
20. 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.
21. Turco G, Cadenaro M, Maravić T, Frassetto A, Marsich E, Mazzoni A et al. Release of ICTP and CTX telopeptides from demineralized dentin matrices: Effect of time, mass and surface area. *Dent Mater.* 2018; 34(3): 452-9.
22. Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T et al. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *J Dent Res.* 2001; 80(6): 1545-9.
23. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldini S et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer-A review. *Dent Mater.* 2013; 29(10): 999-1011.
24. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L et al. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dent Mater.* 2010; 26(4): 320-5.

25. Scaffa PM, Vidal CM, Barros N, Gesteira TF, Carmona AK, Breschi L et al. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. *J Dent Res.* 2012; 91(4): 420-5.
26. 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.
27. 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.
28. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6(3): 437-9.
29. Brackett MG, Agee KA, Brackett WW, Key WO, Sabatini C, Kato MT et al. Effect of sodium fluoride on the endogenous MMP activity of dentin matrices. *J Nat Sci.* 2015; 1(6): e118.
30. Kato MT, Bolanho A, Zarella BL, Salo T, Tjäderhane L, Buzalaf MA. Sodium fluoride inhibits MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res.* 2014; 93(1): 74-7.
31. Mei ML, Li QL, Chu CH, Yiu CK, Lo EC. The inhibitory effects of silver diamine fluoride at different concentrations on matrix metalloproteinases. *Dent Mater.* 2012; 28(8): 903-8.
32. Altinci P, Mutluay M, Seseogullari-Dirihan R, Pashley D, Tjäderhane L, Tezvergil-Mutluay A. NaF inhibits matrix-bound cathepsin-mediated dentin matrix degradation. *Caries Res.* 2016; 50(2): 124-32.
33. Shen Y, Liu S, Jin F, Mu T, Li C, Jiang K et al. Aluminum ammonium sulfate dodecahydrate purified from traditional Chinese medicinal herb Korean monkshood root is a potent matrix metalloproteinase inhibitor. *Biometals.* 2012; 25(3): 541-51.
34. de Souza AP, Gerlach RF, Line SR. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dent Mater.* 2000; 16(2): 103-8.
35. Toledano M, Yamauti M, Osorio E, Osorio R. Zinc-inhibited MMP-mediated collagen degradation after different dentine demineralization procedures. *Caries Res.* 2012; 46(3): 201-7.
36. Oh S, Jung HS, Kim HJ, Jang JH, Kim DS, Choi KK et al. Effect of zinc on the collagen degradation in acid-etched dentin. *J Dent Sci.* 2018; 13(2): 97-102.
37. Cvikl B, Lussi A, Carvalho TS, Moritz A, Gruber R. Stannous chloride and stannous fluoride are inhibitors of matrix metalloproteinases. *J Dent.* 2018; 78: 51-8.

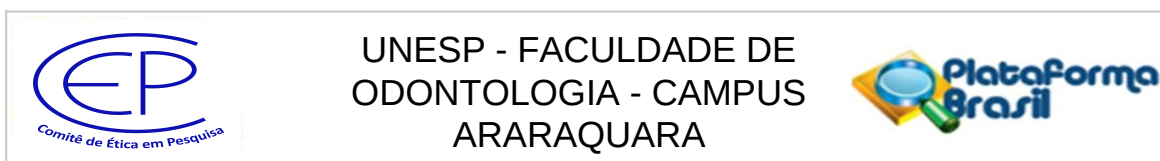
38. ten Cate JM, van Duinen RN. Hypermineralization of dentinal lesions adjacent to glass-ionomer cement restorations. *J Dent Res.* 1995; 74(6): 1266-71.
39. Benelli EM, Serra MC, Rodrigues AL Jr, Cury JA. In situ anticariogenic potential of glass ionomer cement. *Caries Res.* 1993; 27(4): 280-4.
40. Palenik CJ, Behnen MJ, Setcos JC, Miller CH. Inhibition of microbial adherence and growth by various glass ionomers in vitro. *Dent Mater.* 1992; 8(1): 16-20.
41. Forss H, Jokinen J, Spets-Happonen S, Seppä L, Luoma H. Fluoride and mutans streptococci in plaque grown on glass ionomer and composite. *Caries Res.* 1991; 25(6): 454-8.
42. Forsten L. Fluoride release and uptake by glass-ionomers and related materials and its clinical effect. *Biomaterials.* 1998; 19(6): 503-8.
43. Najeeb S, Khurshid Z, Zafar MS, Khan AS, Zohaib S, Martí JM et al. Modifications in glass ionomer cements: nano-sized fillers and bioactive nanoceramics. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(7): 1134.
44. Xie D, Brantley WA, Culbertson BM, Wang G. Mechanical properties and microstructures of glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2000; 16(2):129-38.
45. Ikemura K, Tay FR, Kouro Y, Endo T, Yoshiyama M, Miyai K et al. Optimizing filler content in an adhesive system containing pre-reacted glass-ionomer fillers. *Dent Mater.* 2003; 19(2): 137-46.
46. Fujimoto Y, Iwasa M, Murayama R, Miyazaki M, Nagafuji A, Nakatsuka T. Detection of ions released from S-PRG fillers and their modulation effect. *Dent Mater J.* 2010; 29(4): 392-7.
47. Kaga M, Kakuda S, Ida Y, Toshima H, Hashimoto M, Endo K et al. Inhibition of enamel demineralization by buffering effect of S-PRG filler-containing dental sealant. *Eur J Oral Sci.* 2014; 122(1): 78-83.
48. Kotaku M, Murayama R, Shimamura Y, Takahashi F, Suzuki T, Kurokawa H et al. Evaluation of the effects of fluoride-releasing varnish on dentin demineralization using optical coherence tomography. *Dent Mater J.* 2014; 33(5): 648-55.
49. Takahashi Y, Okamoto M, Komichi S, Imazato S, Nakatsuka T, Sakamoto S et al. Application of a direct pulp capping cement containing S-PRG filler. *Clin Oral Investig.* 2019; 23(4): 1723-31.
50. Suzuki N, Yoneda M, Haruna K, Masuo Y, Nishihara T, Nakanishi K et al. Effects of S-PRG eluate on oral biofilm and oral malodor. *Arch Oral Biol.* 2014; 59(4): 407-13.

51. Hotta M, Morikawa T, Tamura D, Kusakabe S. Adherence of *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus mutans* to saliva-coated S-PRG resin blocks. *Dent Mater J.* 2014; 33(2): 261-7.
52. Nomura R, Morita Y, Matayoshi S, Nakano K. Inhibitory effect of surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) eluate against adhesion and colonization by *Streptococcus mutans*. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 5056.
53. Tamura M, Cueno ME, Abe K, Kamio N, Ochiai K, Imai K. Ions released from a S-PRG filler induces oxidative stress in *Candida albicans* inhibiting its growth and pathogenicity. *Cell Stress Chaperones.* 2018; 23(6): 1337-43.
54. Yoneda M, Suzuki N, Masuo Y, Fujimoto A, Iha K, Yamada K et al. Effect of S-PRG eluate on biofilm formation and enzyme activity of oral bacteria. *Int J Dent.* 2012; 2012: 814913.
55. Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996; 7(2): 104-33.
56. Balooch M, Habelitz S, Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. Mechanical properties of mineralized collagen fibrils as influenced by demineralization. *J Struct Biol.* 2008; 162(3): 404-10.
57. Pugach MK, Strother J, Darling CL, Fried D, Gansky SA, Marshall SJ et al. Dentin caries zones: mineral, structure, and properties. *J Dent Res.* 2009; 88(1): 71-6.
58. Perdigão J, Reis A, Loguercio AD. Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. *J Esthet Restor Dent.* 2013; 25(4): 219-41.
59. Tjäderhane L. Dentin bonding: can we make it last? *Oper Dent.* 2015; 40(1): 4-18.
60. França CM, Tahayeri A, Rodrigues NS, Ferdosian S, Puppini Rontani RM, Sereda G et al. The tooth on-a-chip: a microphysiologic model system mimicking the biologic interface of the tooth with biomaterials. *Lab Chip.* 2020; 20(2): 405-13.
61. Zhu Q, Gibson MP, Liu Q, Liu Y, Lu Y, Wang X et al. Proteolytic processing of dentin sialophosphoprotein (DSPP) is essential to dentinogenesis. *J Biol Chem.* 2012; 287(36): 30426-35.
62. Yamashita H, Ozaki S, Iwasaki K, Kawase I, Nozawa Y, Umezu M. Tensile strength of human pericardium treated with glutaraldehyde. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2012; 18(5): 434-7.
63. Gao S, Yuan Z, Guo W, Chen M, Liu S, Xi T et al. Comparison of glutaraldehyde and carbodiimides to crosslink tissue engineering scaffolds fabricated by decellularized porcine menisci. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017; 71: 891-900.

64. Yang Y, Ritchie AC, Everitt NM. Comparison of glutaraldehyde and procyanidin cross-linked scaffolds for soft tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017; 80: 263-73.
65. Citta M, Anovazzi G, Basso FG, Scheffel D, Zhou J, Pashley DH et al. Mechanical stability and proteolytic activity of resin-dentin bonds using the cross-linked dry bonding technique. *Oper Dent.* 2021; 46(6): E251-63.
66. Nakabayashi N, Watanabe A, Arao T. A tensile test to facilitate identification of defects in dentine bonded specimens. *J Dent.* 1998; 26(4): 379-85.
67. Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res.* 2003; 82(2): 141-5.
68. Scaffa PM, Breschi L, Mazzoni A, Vidal CM, Curci R, Apolonio F et al. Co-distribution of cysteine cathepsins and matrix metalloproteases in human dentin. *Arch Oral Biol.* 2017; 74: 101-7.
69. Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L et al. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dent Mater.* 2010; 26(6): 571-8.
70. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Hoshika T, Tay FR, Pashley DH. The inhibitory effect of polyvinylphosphonic acid on functional matrix metalloproteinase activities in human demineralized dentin. *Acta Biomater.* 2010; 6(10): 4136-42.
71. Sabatini C, Pashley DH. Aging of adhesive interfaces treated with benzalkonium chloride and benzalkonium methacrylate. *Eur J Oral Sci.* 2015; 123(2): 102-7.
72. Junqueira LC, Junqueira LC, Brentani RR. A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen. *Anal Biochem.* 1979; 94(1): 96-9.
73. Tullberg-Reinert H, Jundt G. In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a sirius red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor beta2 and ascorbic acid 2-phosphate. *Histochem Cell Biol.* 1999; 112(4): 271-6.
74. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldini S et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer-a review. *Dent Mater.* 2013; 29(10): 999-1011.
75. Breschi L, Maravic T, Comba A, Cunha SR, Loguercio AD, Reis A et al. Chlorhexidine preserves the hybrid layer in vitro after 10-years aging. *Dent Mater.* 2020; 36(5): 672-80.
76. Kim J, Uchiyama T, Carrilho M, Agee KA, Mazzoni A, Breschi L et al. Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. *Dent Mater.* 2010; 26(8): 771-8.

77. Gioia M, Monaco S, Fasciglione GF, Coletti A, Modesti A, Marini S et al. Characterization of the mechanisms by which gelatinase A, neutrophil collagenase, and membrane-type metalloproteinase MMP-14 recognize collagen I and enzymatically process the two alpha-chains. *J Mol Biol.* 2007; 368(4): 1101-13.
78. Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley DH, Tay FR et al. Zinc reduces collagen degradation in demineralized human dentin explants. *J Dent.* 2011; 39(2): 148-53.
79. Mei ML, Ito L, Cao Y, Li QL, Chu CH, Lo EC. The inhibitory effects of silver diamine fluorides on cysteine cathepsins. *J Dent.* 2014; 42(3): 329-35.
80. Kashiwagi K, Inoue H, Komasa R, Hosoyama Y, Yamashita K, Morisaki A et al. Optimal dilutions of S-PRG filler eluate for experiments on human gingival fibroblasts in vitro. *Dent Mater J.* 2021; 40(1): 136-42.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM SERES HUMANOS (CEP)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Atividade inibitória de partículas liberadoras de íons (S-PRG) sobre metaloproteinases ligadas ao colágeno e efeito sobre a degradação da matriz dentinária

Pesquisador: JOSIMERI HEBLING COSTA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 32520020.7.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Final

Detalhe:

Justificativa:

Data do Envio: 10/12/2021

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.239.131

Apresentação da Notificação:

Trata-se apresentação de relatório final cujo resumo inicial constava: “Proteases residentes na dentina (endopeptidases) têm sido implicadas em eventos indesejáveis como a progressão de lesões de cárie e de erosão e a degradação da camada híbrida, afetando diretamente a longevidade de restaurações. Portanto, o objetivo desse estudo será avaliar o efeito inibitório in situ de um extrato produzido a partir de partículas liberadoras de íons sobre metaloproteinases da matriz dentinária (MMPs) e sobre a degradação do colágeno. Cinquenta espécimes de dentina (0,5mmx2,0mmx5,0mm) serão obtidos de a partir de trinta terceiros molares humanos hígidos. Esses espécimes (n=50) serão completamente desmineralizados em ácido fosfórico 10% por 24 horas, em refrigerador, para a remoção do conteúdo mineral e obtenção de espécimes de matriz dentinária. A determinação da atividade total inicial de MMPs (Sensolyte) permitirá a divisão desses

Endereço: HUMAITA 1680, SALA 512

Bairro: CENTRO

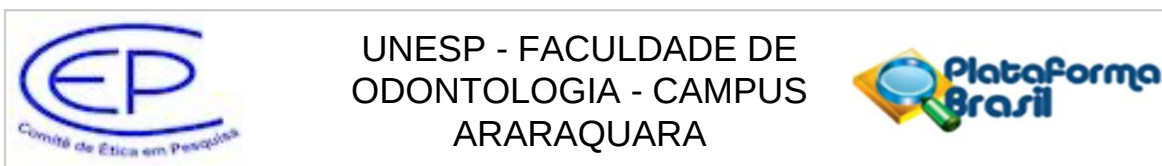
UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

CEP: 14.801-903

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.239.131

espécimes em 5 grupos (n=10), de tal forma que a atividade inicial média de MMPs será semelhante para todos os grupos. Os espécimes de cada grupo serão tratados com (1) água deionizada por 60 s, (2) solução de digluconato de clorexidina 2% por 60 s ou (3) extrato de partículas SPRG (surface pre-reacted glass-ionomer) por 60 s, (4) 5 min ou (5) 30 min. Concluídos os tratamentos, será novamente determinada a atividade total de MMPs de cada espécime e será calculada a porcentagem de redução dessa atividade. Esses espécimes serão então armazenados em solução tampão semelhante a saliva por 7 dias e nessa solução será avaliada a presença de hidroxiprolina (HYP) e de fragmentos de colágeno (Sirius red), ambos biomarcadores de degradação do colágeno. Para a análise estatística dos dados, o tratamento da dentina (5 níveis) será considerado o fator de variação do estudo (variável independente) e a redução da atividade de MMPs, liberação de HYP e de fragmentos de colágeno serão considerados as variáveis de resposta (dependentes). Os dados serão avaliados quanto a sua distribuição e homogeneidade de variâncias para a seleção dos testes estatísticos e as decisões serão tomadas ao nível de significância de 5%."

Objetivo da Notificação:

Avaliar o efeito inibitório in situ de um extrato produzido a partir de partículas liberadoras de íons sobre metaloproteínas da matriz dentinária (MMPs) e sobre a degradação do colágeno dentinário

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Por se tratar da coleta de dentes oriundo do Banco de Dentes, riscos de contaminação dos pesquisadores são assumidos. Em contrapartida, tais riscos serão minimizados por meio do uso de equipamentos de proteção individual (EPIs), seguindo as normas de biossegurança, durante a manipulação dos dentes, reagentes e soluções usadas nos diversos experimentos. Os EPIs utilizados serão: máscara, gorro, luva e avental descartáveis; óculos de proteção e sapato fechado.

Benefícios:

Esperamos que, ao concluirmos o desenvolvimento deste projeto de pesquisa, possamos revelar à comunidade científica se essas partículas avaliadas apresentam algum potencial de inativação de proteases dentinárias, podendo contribuir para a estabilidade da união resina-dentina e, conseqüentemente, para a longevidades de procedimentos restauradores.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Trata-se de um estudo nacional realizado em Araraquara-SP, unicêntrico (Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP; FOAr), do tipo experimental e de caráter acadêmico realizado

Endereço: HUMAITA 1680, SALA 512

Bairro: CENTRO

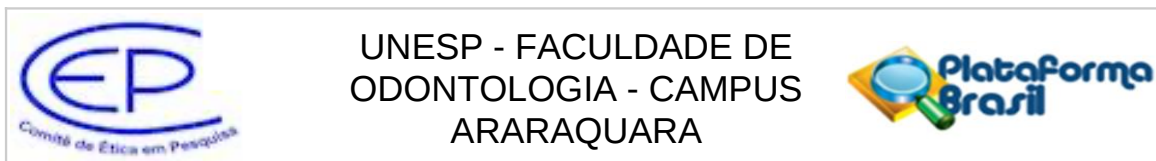
UF: SP

Telefone: (16)3301-6459

Município: ARARAQUARA

CEP: 14.801-903

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.239.131

por bolsista de IC. O trabalho foi financiado com recursos dos próprios pesquisadores e foi contemplado com a bolsa de Iniciação Científica concedida pelo CNPq. Foram utilizados 30 terceiros molares permanentes doados pelo Banco de Dentes da FOAR.

Todas as etapas da pesquisa foram concluídas e não foram relatados fatores negativos ou positivos.

A pesquisa resultou em 4 apresentações em congressos. Destaco que o trabalho foi selecionado e apresentado na 2ª fase do Congresso de Iniciação Científica Unesp de 2021.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentado o relatório final.

Recomendações:

Vide campo conclusões ou pendências e lista de inadequações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugere-se a aprovação do relatório final.

Considerações Finais a critério do CEP:

Relatório Final APROVADO em reunião de 11 de fevereiro de 2022.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

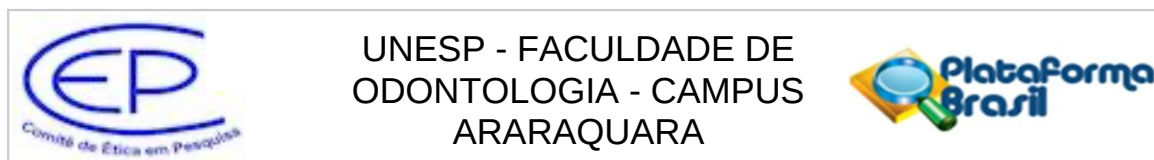
Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Final	Relatorio_final_CEP_10_12.pdf	10/12/2021 11:14:03	JOSIMERI HEBLING COSTA	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não



Continuação do Parecer: 5.239.131

Endereço: HUMAITÁ 1680, SALA 512

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA, 11 de Fevereiro de 2022

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br

Assinado por:
Andréa Gonçalves
(Coordenador(a))

ANEXO B – BOLSA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – PIBIC/CNPq

