



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



Lays Nóbrega Gomes

**Resposta de células pulpares a biomodificação do colágeno pela acroleína e
seu efeito sobre a resistência máxima a tração da matriz dentinária e
resistência da união resina-dentina**

Araraquara

2020



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



Lays Nóbrega Gomes

Resposta de células pulpares a biomodificação do colágeno pela acroleína e seu efeito sobre a resistência máxima a tração da matriz dentinária e resistência da união resina-dentina

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.

Orientadora: Profa. Dra. Josimeri Hebling

Araraquara

2020

Gomes, Lays Nóbrega

Resposta de células pulpares a biomodificação do colágeno pela acroleína e seu efeito sobre a resistência máxima a tração da matriz dentinária e resistência da união resina-dentina / Lays Nóbrega Gomes-- Araraquara: [s.n.], 2020

84 f.; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Josimeri Hebling

1. Acroleína 2. Reagentes para ligações cruzadas 3. Dentina
4. Polpa dentária 5. Resistência à tração 6. Toxicidade I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

Lays Nóbrega Gomes

Resposta de células pulpares a biomodificação do colágeno pela acroleína e seu efeito sobre a resistência máxima a tração da matriz dentinária e resistência da união resina-dentina

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Reabilitação Oral

Presidente e orientadora: Profa. Dra. Josimeri Hebling

2º Examinador: Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade

3º Examinador: Prof. Gelson Luís Adabo

Araraquara, 18 de fevereiro de 2020.

DADOS CURRICULARES

Lays Nóbrega Gomes

NASCIMENTO: 28/12/1993 – Patos – Paraíba

FILIAÇÃO: Antônio Gomes da Costa Netto e Elizandra Oliveira da Nóbrega Gomes.

2012 a 2017 Graduação em Odontologia pela Universidade Federal da Paraíba.

2018 a 2020 Pós-Graduação – Mestrado pelo programa de Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Dedicatória

Dedico este trabalho as molas propulsoras da minha vida. Primeiramente a **Deus**, que me permite enxergar a beleza e o milagre da vida em tudo e através dessa experiência me ensina todos os dias o valor do amor. Dedico também a minha mãe Santíssima, **Maria**, por todas as vezes que me carregou em seus braços e pelo exemplo de mulher que deixou à humanidade.

Aos meus pais e ao meu irmão, **Antônio, Elizandra e Francisco**, que são a base sólida da minha vida e minha fonte primária de amor. Agradeço todos os dias pela família que eu tenho, e por todas as vezes que vocês enxergaram o melhor de mim. Agradeço por ter aprendido em casa, que na vida o que realmente importa é o valor que está intrínseco em casa experiência e não o preço que ela carrega. A vocês todo meu amor e minha eterna gratidão!

Agradecimentos especiais

À minha orientadora **Profª. Drª. Josimeri Hebling**, agradeço pelo seu aceite em partilhar comigo a jornada da pós-graduação e por se fazer tão presente em todos os momentos. Obrigada pelos inúmeros ensinamentos acadêmicos e pessoais, o seu amor pela docência e pela pesquisa nos contagia e faz da senhora um espelho a todos nós. Obrigada por ser mais que uma orientadora.

À **Drª. Giovana Anovazzi**, com quem muito aprendi e compartilhei muitas experiências, agradeço por toda sua doação e por ter me ensinado tanto. A bancada do laboratório fez de nós grandes amigas. Obrigada por tudo, Gi.

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa** que abriu as portas do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais para que eu pudesse executar parte deste trabalho. Agradeço também pelas contribuições prestadas desde o processo de construção deste projeto, o senhor sempre foi muito solícito a todos nós. Obrigada por tudo, professor!

À **Profª. Drª. Fernanda Basso** por sua disponibilidade e por todas as contribuições dadas a este estudo. Obrigada, professora!

Ao meu noivo, **Francisco Paulo A. Maia**, que me acompanhou da graduação ao mestrado, que por tantas vezes foi o meu suporte, minha palavra de força, meu companheiro de fé e de aventuras. Obrigada por todos os valores que você é capaz de agregar a minha vida, eu amo você.

As minhas avós, minhas duas grandes Marias, **Maria de Fátima e Maria Vilani**, e ao meu avô **Bismarck**, obrigada por me permitirem viver o amor sublime de neta, por todo o apoio que sempre me deram, por entenderem minhas ausências. A história de vocês me ensina todos os dias, e me faz ter ainda mais orgulho do sangue que corre em mim. Eu amo vocês com toda a força que há em mim!

Aos meus tios **Marcelo, Isabel, Mara, Erica, Edjane, Marcos, Eliane, Elizabete, Fátima e Gilberto**, obrigada por serem a melhor família que eu poderia ter, uma vida inteira de gratidão à Deus por vocês seria pouco. Eu amo vocês!

A todos os meus primos, especialmente meus pequeninos **Eric e Sara**, obrigada por me permitirem viver todos os dias a pureza e a doçura do amor de uma criança. Vocês fazem de mim um ser humano melhor e eu amo muito vocês.

As minhas grandes amigas, **Carla, Maria Helena e Fabrícia**, por todo o suporte que vocês me deram mesmo na distância. A odontologia me proporcionou o grande presente da amizade de vocês.

Aos amigos e companheiros de laboratório, **Carla, Uxua, Igor, Carol, Fernanda Ali e Isabela**, agradeço por partilharem comigo uma das melhores fases da minha vida. Com vocês aprendi o valor do trabalho em grupo e o quão leve fica a vida quando temos com quem partilhar.

Aos meus irmãos de pós-graduação, **Maria Luísa e Rafael**, sou muito grata por ter vocês. A vida longe de casa se tornou muito mais leve por ter conseguido construir uma outra família. Amigos são a família que nós escolhemos e vocês são incríveis, eu amo vocês!

As alunas de iniciação científica, **Flávia, Lídia e Mariana**, com quem tive a oportunidade de trabalhar lado a lado na construção dos seus projetos. Sou muito grata pelo crescimento pessoal e intelectual que vocês me proporcionaram. Obrigada por me permitirem viver o conceito da horizontalidade das relações, me mostrando o quanto se aprende com quem se tenta ensinar. Obrigada por tudo, sobretudo pela amizade!

Aos meus colegas do Mestrado em Reabilitação Oral, **Luana, Ranulfo e Ana**, obrigada por todas as experiências e conhecimentos compartilhados ao longo desses dois anos. Sentirei saudades.

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP)** representada pela atual diretora Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Sgavioli Massucato e o Vice-Diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos, que através de todos os seus professores, funcionários e alunos, impulsionou meu crescimento pessoal e profissional durante o período da Pós-Graduação.

Ao **Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica Infantil da FOAr-UNESP**, representado pela coordenadora Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling, onde desenvolvi a maior parte desta pesquisa.

Ao **Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da FOAr-UNESP**, do Departamento de Fisiologia e Patologia, representado pelo coordenador Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, onde realizei parte desta pesquisa.

Ao **Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da FOAr-UNESP**. Agradeço a todos os professores e funcionários, pela disponibilidade, presteza e respeito que sempre tiveram comigo e com a minha formação. Muito obrigada por tudo!

Ao **Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral**, da Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp, representado pela Coordenadora Prof^a. Dr^a. Ana Claudia Pavarina e a Vice-Coordenadora Prof^a. Dr^a. Daniela Aparecida de Godoi Gonçalves, por toda presteza durante este período.

Aos professores das **Disciplinas de Prótese Total I e II do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, da Foar-UNESP**, que me aceitaram enquanto estagiária e especialmente a **Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Pero Vizoto** por quem fui supervisionada durante as atividades e com quem muito aprendi. Obrigada pela oportunidade!

Aos professores da **Disciplina de Prótese Fixa Convencional e Sobre Implantes, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, da Foar-UNESP**, agradeço por todos os ensinamentos e experiências que me proporcionaram durante o estágio docência na disciplina.

Aos professores da **Disciplina de Disfunção Temporomandibular, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, da Foar-UNESP**, especialmente a **Prof^a. Dr^a. Daniela Aparecida de Godoi Gonçalves** com quem muito aprendi em um curto período de tempo, obrigada por despertar em mim um amor ainda maior por essa área da Odontologia. Desenvolvi um carinho, respeito e admiração ímpar pela senhora. Obrigada por tudo, professora!

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

À **FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (Processo: 2018/14105-2) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a caminhar”

Paulo Freire

Gomes LN. Resposta de células pulpares a biomodificação do colágeno pela acroleína e seu efeito sobre a resistência máxima à tração da matriz dentinária e resistência da união resina-dentina. [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

Objetivo: Investigar a citotoxicidade transdentinária da acroleína (ACR) sobre células pulpares e a resistência máxima à tração (RMT) da matriz dentinária e resistência da união (RU) resina-dentina após a biomodificação do colágeno dentinário por esse agente promotor de ligações cruzadas. **Métodos:** Discos de dentina (0,4 mm de espessura) foram obtidos de molares humanos hígidos e adaptados em câmaras pulpares artificiais. Células MDPC-23 foram semeadas na superfície pulpar desses discos e a superfície oclusal foi condicionada com ácido fosfórico por 15s. Sobre a dentina condicionada foi aplicado (n=9): água deionizada (controle), ACR 0,02%, 0,01%, 0,005%, glutaraldeído 5% (GD) ou peróxido de hidrogênio 3%. Após 60s, a superfície foi lavada e as câmaras foram incubadas por 24h. Foi avaliada a viabilidade das MDPC-23 (alamarBlue) aderidas na parede pulpar dos discos e os extratos foram aplicados em novas MDPC-23 e HDPCs (células da polpa dental humana) cultivadas em placas de cultura. Após 24h, essas células foram avaliadas quanto a viabilidade, atividade de fosfatase alcalina (ensaio da timolftaleína), presença de nódulos de mineralização (Alizarin red) e expressão gênica de ALPL, DSPP, MMP2, MMP9 e IL1B (PCRq). Vinte cinco molares adicionais foram seccionados para obter espécimes de dentina (n=50) que foram completamente desmineralizados com ácido fosfórico por 24h. Os espécimes de matriz dentinária foram tratados por 60s com: água, ACR 0,02%, 0,01%, 0,005% ou GD 5% e submetidos ao ensaio de resistência máxima à tração. Por fim, superfícies planas de dentina preparadas em 40 dentes foram condicionadas com ácido fosfórico e tratadas por 60s com água, ACR 0,01%, 0,005% ou GD 5%, seguido de lavagem. Single Bond 2 foi aplicado seguido da construção de um bloco de resina, e após 24h, foram obtidos espécimes (0,81 mm²) para o ensaio de microtração e análise de nanoinfiltração. Os dados foram submetidos aos testes de ANOVA e Tukey ($\alpha=0,05$). **Resultados:** Houve redução significativa da viabilidade das MDPC-23 semeadas no disco para a ACR 0,02%, ACR 0,01%, GD e peróxido em comparação ao controle. Entretanto, com exceção do peróxido, a maior redução observada foi de apenas 21% para o GD. Para ambas as linhagens celulares em contato com os extratos, a ACR não interferiu negativamente na viabilidade, atividade de ALP e deposição de nódulos. A expressão gênica de IL1B foi a única que não sofreu influência das soluções de tratamento da dentina. De maneira geral, a ACR 0,005% afetou a expressão de um menor número de genes. A RMT da matriz de dentina foi aumentada após a biomodificação com ACR 0,02% e GD 5%. Contudo, a biomodificação da dentina com ACR ou GD não interferiu na RU imediata, sem diferença significativa entre os grupos. A presença de nanoinfiltração nas camadas híbridas produzidas sobre a dentina tratada com ACR foi comparável a observada na dentina tratada com água (controle). **Conclusão:** A aplicação da ACR sobre a dentina condicionada não exerceu efeito tóxico sobre células odontoblastóides e pulpares

humanas, entretanto, apenas a maior concentração (0,02%) foi capaz de melhorar a resistência mecânica da matriz dentinária. Por fim, a biomodificação do colágeno pela ACR não exerceu influência na resistência de união imediata a dentina.

Palavras-chave: Acroleína. Reagentes para ligações cruzadas. Dentina. Polpa dentária. Resistência à tração. Toxicidade.

Gomes LN. Response of pulp cells to dentin biomodification with acrolein and effect on the ultimate tensile strength of the dentin matrix and the resin-dentin bond. [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

Objective: To investigate the transdentinal cytotoxicity of acrolein (ACR) on pulp cells, as well as the ultimate tensile strength (UTS) of the dentin matrix, and the strength of resin-dentin bonds after dentin collagen biomodification with this cross-linker.

Methods: Dentin disks (0.4 mm thick) were cut from sound human molars and adapted in artificial pulp chambers. MDPC-23 were seeded on the pulpal side of the disks and the occlusal surface was etched with phosphoric acid for 15s. The etched dentin was treated with (n=9): deionized water (control), 0.02%, 0.01%, 0.005% ACR, 5% glutaraldehyde (GD), or 3% hydrogen peroxide. After 60s, the surface was rinsed, and the chambers were incubated for 24h. The viability of MDPC-23 cells seeded on the disk was assessed (alamarBlue) and the extracts were applied on new MDPC-23 and HDPCs (human dental pulp cells) seeded in culture plates. After 24h, the viability of the cells was investigated as well as the activity of alkaline phosphatase, presence of mineralized nodules (Alizarin red) and ALPL, DSPP, MMP2, MMP9 and IL1b gene expression (qPCR). Additional twenty-five human molars were sectioned to obtain dentin specimens (n=50) which were completely demineralized in 10% phosphoric acid for 24h. The specimens were treated for 60s with: water, 0.02%, 0.01%, 0.005% ACR or 5% GD, and then submitted to a mechanical test to determine the UBS. Finally, flat dentin surfaces prepared in 40 human molars were etched with phosphoric acid and treated for 60s with water, 0.01%, 0.005% ACR, or 5% GD, followed by rinsing. Single Bond 2 was applied, and a resin block was buildup. After 24h, the teeth were cut to produce beam specimens (0.81mm²) submitted to the microtensile test and nanoleakage analysis. Datasets were analyzed by ANOVA and Tukey tests ($\alpha=0.05$).

Results: Significant viability reduction was seen for MDPC-23 seeded on the dentin disks for 0.02%, 0.01% ACR, GD and hydrogen peroxide; however, except for the later, the highest reduction was 21% for GD. Conversely, for both cell lines in contact with the extracts, ACR did not interfere with cell viability, ALP activity, and the presence of mineralized nodules. IL1b was the only gene expression not affected by the treatments. Overall, the expression of a lower number of genes was affected by 0.005% ACR in comparison to the other treatments. The UBS of the dentin matrix was significantly improved after the treatment 0.02% ACR and 5% GD. However, dentin biomodification with these cross-linkers did not interfere with the immediate resin-dentin bond strength. Presence of nanoleakage in hybrid layers produced on dentin treated with ACR was comparable to dentin treated with water (control). **Conclusion:** The application of ACR on etched dentin was not toxic to odontoblast-like and pulp cells, however, only 0.02% ACR was able to increase the mechanical resistance of dentin matrices. Lastly, collagen biomodification using ACR did not interfere with the immediate bond strength to dentin.

Keywords: Acrolein. Cross-linking reagents. Dentin. Dental pulp. Tensile strength. Toxicity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 PROPOSIÇÃO	18
2.1 Proposição Geral	18
2.2 Proposições Específicas	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 Complexo Dentino-Pulpar e Características do Tecido Dentinário	19
3.2 Composição da Matriz Dentinária	20
3.2.1 Proteases dentinárias	20
3.2.2 Colágeno tipo I	21
3.3 União Resina-Dentina e Mecanismos de Degradação da Camada Híbrida	23
3.4 Biomodificação do Colágeno Dentinário	25
3.4.1 Agentes promotores de ligações cruzadas	25
3.4.2 Efeito da biomodificação nas propriedades mecânicas do colágeno e na longevidade da união resina-dentina	28
3.4.3 Resposta de células pulpares aos agentes promotores de ligações cruzadas	30
4 MATERIAL E MÉTODO	32
4.1 Aspectos Éticos	32
4.2 Obtenção de Discos de Dentina para as Análises Biológicas	32
4.3 Determinação da Condutância Hidráulica	33
4.4 Cultura Celular	34
4.4.1 Cultura de MDPC-23	34
4.4.2 Cultura de células da polpa dental humana (HDPCs)	35
4.5 Cultivo Celular nos Discos de Dentina	35
4.6 Viabilidade Celular	37
4.7 Atividade de Fosfatase Alcalina (ALP)	38
4.8 Presença de Nódulos Mineralizados	40
4.9 Avaliação da Expressão Gênica (qPCR)	41
4.10 Ensaio de resistência máxima à tração da matriz dentinária	44
4.10.1 Obtenção das matrizes de dentina	44
4.10.2 Tratamento da matriz dentinária	45
4.10.3 Ensaio mecânico de tração	45

4.11 Ensaio Mecânico de Microtração da União Resina-dentina	46
4.11.1 Obtenção de superfícies planas de dentina	46
4.11.2 Tratamento da dentina condicionada e procedimentos adesivos	46
4.11.3 Obtenção dos espécimes e ensaio mecânico de microtração.....	47
4.11.4 Análise do tipo de fratura	48
4.12 Análise da Nanoinfiltração	49
4.13 Análise Estatística	49
5 RESULTADOS	50
5.1 Viabilidade Celular	51
5.2 Atividade de ALP	52
5.3 Presença de Nódulos Mineralizados	54
5.4 Expressão gênica	57
5.5 Resistência Máxima à Tração da Matriz Dentinária	60
5.6 Resistência da União Resina-Dentina	61
5.7 Distribuição dos Tipos De Fraturas	62
5.8 Nanoinfiltração e MEV	63
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	80

1 INTRODUÇÃO

A alta prevalência de cárie e acometimentos traumáticos em elementos dentais na população em geral, faz com que a demanda por tratamentos restauradores seja alta^{1,2}. A perda de tecido dental mineralizado é cumulativa ao longo da vida do indivíduo, tendo em vista que esse tecido não é naturalmente repostado. Estudos mostram que a longevidade de uma restauração de resina composta na cavidade bucal varia em média, de 5 a 7 anos^{3,4}. Com isso, se faz necessário o estudo de estratégias que possam promover um aumento dessa longevidade, proporcionando tratamentos mais duradouros.

É importante considerar a evolução da odontologia restauradora nas últimas décadas, entretanto, mesmo diante de muitos avanços, a estabilidade da união resina-dentina ainda é um desafio, sendo o objeto de muitos estudos⁵⁻⁷. A camada híbrida é a estrutura mais importante no processo de adesão à dentina, sendo responsável pela retenção do material restaurador, bem como pelo selamento dentinário. A camada híbrida se forma pela infiltração dos componentes do sistema adesivo por entre as fibrilas de colágeno, expostas após o condicionamento ácido⁸. No entanto, a infiltração da rede de colágeno pelos monômeros do sistema adesivo ocorre de maneira incompleta, devido ao reduzido espaço disponível entre as moléculas de colágeno que compõem as fibrilas e pela impossibilidade de remoção completa da água presente na matriz dentinária e sua substituição por monômeros resinosos^{9,10}.

A deficiência de infiltração, bem como a presença de água residual, a qual viabiliza a separação de fases devido a diferença de peso molecular e grau de hidrofília dos monômeros que compõem um mesmo adesivo, favorecem a manutenção de colágeno exposto na região basal da camada híbrida^{6,11-13}. O colágeno dentinário desprovido de reforço mineral ou polimérico fica então susceptível aos processos de degradação hidrolítica e enzimática¹⁴⁻¹⁶, mediada por metaloproteínases da matriz (MMPs) e cisteínas catépsinas (CATs), as quais são endopeptidases residentes no tecido dentinário^{17,18}. Considerando que as fibrilas de colágeno são responsáveis pela ancoragem do material restaurador ao substrato dentinário, sua degradação implica na perda de estabilidade da camada híbrida ao longo do tempo^{7,11}.

A resistência da camada híbrida aos processos de degradação é o reflexo da resistência individual de seus componentes, polímero resinoso e colágeno⁶. Objetivando melhorar as propriedades mecânicas do colágeno, tem sido investigada a biomodificação dessa proteína com agentes promotores de ligações cruzadas (cross-linkers)¹⁹⁻²⁴. Dentre os cross-linkers mais investigados estão a carbodiimida (EDC), o glutaraldeído (GD) e as proantocianidinas (PA). Esses agentes induzem a formação de ligações cruzadas exógenas ou secundárias que resultam na melhoria das propriedades mecânicas de resistência máxima à tração e módulo de elasticidade do colágeno e dos tecidos formados por essa proteína^{21,25,26}. Essas novas ligações cruzadas são formadas no interior das moléculas de colágeno (intra-moleculares), entre essas moléculas (inter-molecular) e entre fibrilas de colágeno (inter-fibrilar)²⁵. Paralelamente, esses agentes também são potentes inibidores de MMPs e CATs^{20,27}.

Particularmente, o glutaraldeído tem demonstrado excelentes resultados quando aplicado por períodos clinicamente viáveis, como 30 e 60 segundos. Em 30 segundos, esse cross-linker foi capaz de dobrar o módulo de elasticidade da matriz dentinária²¹ e de inibir em mais de 80% a atividade de MMPs, mesmo quando incorporado em um primer contendo hidroxietil metacrilato (HEMA)²⁸. O rápido efeito observado para o glutaraldeído está provavelmente relacionado ao tipo de reação química que esse agente estabelece com as proteínas²⁹. O glutaraldeído induz ligações covalentes com grupamentos amina (-NH₂) de aminoácidos vizinhos, preferencialmente entre resíduos da lisina e hidroxilisina, e é incorporado nessas novas ligações. O consumo do glutaraldeído ao longo da reação química pode explicar a ausência de citotoxicidade desse agente sobre células pulpares quando aplicado na dentina condicionada^{22,30}.

Recentemente, um novo aldeído foi investigado como agente biomodificador do colágeno dentinário, na concentração de 0,01 %v/v³¹. A acroleína é um aldeído insaturado altamente reativo, que está presente no meio ambiente, na dieta e em alguns processos fisiológicos do organismo humano³²⁻³⁴. Além de não interferir na resistência de união imediata, a acroleína contribuiu para a preservação da mesma ao longo de 12 meses³¹.

Apesar dos agentes promotores de ligações cruzadas apresentarem bons resultados para a manutenção da união resina-dentina ao longo do tempo^{19,21-}

^{24,26}, é importante investigar seus efeitos sobre as células pulpares. Isto porque estas substâncias são aplicadas diretamente sobre a dentina, que por sua vez, é um tecido com alta densidade de túbulos preenchidos pelo fluído dentinário, os quais atuam como canais difusores de substâncias em direção a polpa, podendo evocar uma resposta por parte das células constituintes deste tecido³⁵.

Até o presente momento, e que seja de conhecimento dos autores desse trabalho, o estudo de Maravic et al.³¹ (2018) é o único publicado sobre o efeito da acroleína na resistência da união resina-dentina. Ademais, não há evidências na literatura acerca de sua toxicidade sobre células de origem pulpar nem do seu efeito sobre a resistência máxima à tração da matriz dentinária. Portanto, para que a acroleína possa ser seguramente incorporada aos processos de adesão à dentina, é relevante investigar seu potencial tóxico sobre células da polpa dentária e o seu efeito sobre o colágeno que constitui o tecido dentinário.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Proposição Geral

Investigar a citotoxicidade transdentinária da acroleína sobre células pulpares, assim como a resistência máxima à tração da matriz dentinária e resistência da união resina-dentina após a biomodificação do colágeno por esse agente promotor de ligações cruzadas.

2.2 Proposições Específicas

- A. Determinar a viabilidade celular, atividade de fosfatase alcalina, presença de nódulos mineralizados e expressão gênica de células odontoblastóides imortalizadas e células da polpa dental humana em resposta a aplicação de diferentes concentrações de acroleína sobre a dentina condicionada com ácido fosfórico;
- B. Avaliar a resistência máxima à tração da matriz dentinária biomodificada pelas diferentes concentrações de acroleína;
- C. Avaliar a resistência imediata da união resina-dentina após a biomodificação do colágeno dentinário por diferentes concentrações de acroleína seguido da aplicação de um sistema adesivo convencional simplificado;
- D. Analisar a presença de nanoinfiltração na camada híbrida formada sobre a dentina biomodificada pela acroleína.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Este capítulo contempla os artigos utilizados como fonte científica para respaldar a realização do presente trabalho, e abrange uma breve revisão dos temas: (3.1) Complexo Dentino-Pulpar e Características do Tecido Dentinário (3.2) Composição da Matriz Dentinária, (3.3) União Resina-dentina e mecanismos de degradação da camada híbrida e (3.4) Biomodificação do colágeno dentinário.

3.1 Complexo Dentino-Pulpar e Características do Tecido Dentinário

O tecido pulpar e o tecido dentinário compartilham a mesma origem embrionária, a papila dental, e consequentemente características relacionadas a eventos fisiológicos e patológicos³⁶. No processo de formação da dentina, após a diferenciação de células ectomesenquimais em odontoblastos, tem início a síntese e secreção de matriz orgânica, seguido pela deposição mineral que provoca um deslocamento centrípeto dos odontoblastos aproximando-os e culminando com a formação da camada odontoblástica^{36,37}. Ao passo que esse deslocamento celular ocorre, o prolongamento citoplasmático das células permanece e ao seu redor se formam os túbulos dentinários^{36,37}.

O caráter tubular do tecido dentinário faz dele uma estrutura permeável. Os túbulos dentinários abrigam os prolongamentos odontoblásticos, e são repletos de fluido dentinário, através do qual ocorre a difusão de produtos tóxicos até a polpa^{35,38}. A taxa do transporte difusional de materiais aplicados sobre a dentina até a polpa é altamente dependente da espessura e condutância hidráulica da dentina, isso porque o número e o diâmetro dos túbulos dentinários varia de acordo com a espessura de dentina, sendo de aproximadamente 15.000/mm² na superfície, com diâmetro em torno de 0,8 µm, e de 65.000/mm² em áreas mais próximas a polpa, com diâmetro de até 3 µm³⁵.

Em condições naturais existe um equilíbrio entre a taxa de produtos que conseguem difundir até a polpa e que são eliminados por fatores protetores inerentes ao organismo como a própria pressão e microcirculação pulpar^{35,38}. A pressão pulpar por si só é capaz de reduzir em 50 a 60% a difusão de produtos tóxicos à polpa. Além disso, o fluido contém proteínas plasmáticas (albumina, globulinas) que podem se ligar ou aglutinar componentes advindos de materiais exercendo também um papel protetor^{35,38}.

A dentina é o tecido que está presente em maior volume no elemento dentário, sendo que 40-45% deste volume é formado por matéria inorgânica, 30% por matéria orgânica e 20-25% por água³⁹. A porção inorgânica é composta por cristais irregulares de hidroxiapatita em forma de placa, com dimensões aproximadas de 100 nm de comprimento, 30 nm de largura e 4 nm de espessura, que se situam internamente as fibrilas de colágeno (intrafibrilares) ou entre elas (extrafibrilares)⁴⁰. Na região interfibrilar, o longo eixo desses minerais acompanha as cadeias poliméricas que compõe as fibrilas e moléculas de colágeno⁴¹, sendo um arranjo fundamental para o estabelecimento das propriedades mecânicas do colágeno dentinário⁴². A natureza orgânica e umidade intrínseca faz da dentina uma estrutura mais complexa que o esmalte, com repercussão direta no processo de união substrato/material restaurador⁷.

3.2 Composição da Matriz Dentinária

Dentre os 30% de matéria orgânica que compõe a dentina³⁹, noventa por cento corresponde a colágeno do tipo I e 10% a proteínas não colagenosas, como a sialofosfoproteína dentinária (DSPP), a sialoproteína dentinária (DSP), a fosfoproteína dentinária (DPP), as proteínas da matriz dentinária 1,2,3 (DMP1, DMP2, DMP3), as proteínas morfogenéticas dentinárias (osteopontina, osteonectina, osteocalcina), proteoglicanos, proteínas séricas e proteases (metaloproteinases da matriz e cisteínas catépsinas)^{40,43}. De maneira geral essas proteínas atuam sinergicamente regulando o processo de deposição mineral na dentina^{39,40,44,45}.

3.2.1 Proteases dentinárias

As proteases dentinárias, assim como de outros tecidos, tem o potencial de degradar componentes da matriz extracelular (MEC), incluindo o colágeno, e têm sido diretamente implicadas no processo de degradação da camada híbrida^{5,6,14-16}. Portanto, essas proteases são de especial interesse na área da odontologia restauradora adesiva. Também denominadas de endopeptidases, essas proteases são essenciais para a remodelação da matriz dentinária durante o processo de dentinogênese, seja ele resultante de um estímulo fisiológico ou patológico. Contudo, ficam aprisionadas em estado latente no tecido dentinário à medida que ocorre a mineralização da matriz⁴⁶.

Diante de processos que envolvem a dissolução do conteúdo mineral da dentina, como por exemplo o processo de cárie ou o condicionamento ácido realizado durante procedimentos restauradores adesivos, essas enzimas são liberadas e, uma vez ativas, atuam degradando o colágeno na sua forma nativa ou desnaturada^{14,47}.

Duas classes de proteases fazem parte da matriz orgânica da dentina, as metaloproteinases da matriz (MMPs) e as cisteínas catepsinas (CATs). As MMPs são uma classe de endopeptidases dependentes de íons Ca^{+} e Zn^{+48} . Enquanto o cálcio é fundamental para que a enzima mantenha a sua conformação estrutural, o zinco é essencial para que essas enzimas exerçam a sua ação catalítica de quebra de ligações peptídicas, e está localizado no seu sítio ativo⁴⁹. Na dentina humana já foram identificadas, até o momento, a collagenase MMP-8⁵⁰, as gelatinases MMP-2 e MMP-9⁵¹, a matrilisina MMP-7⁵² e a enamelesina MMP-20⁵³. Contudo, sabe-se que as MMP-2 e -9 são as mais estudadas no que se refere ao processo de degradação da camada híbrida⁵⁴⁻⁵⁷.

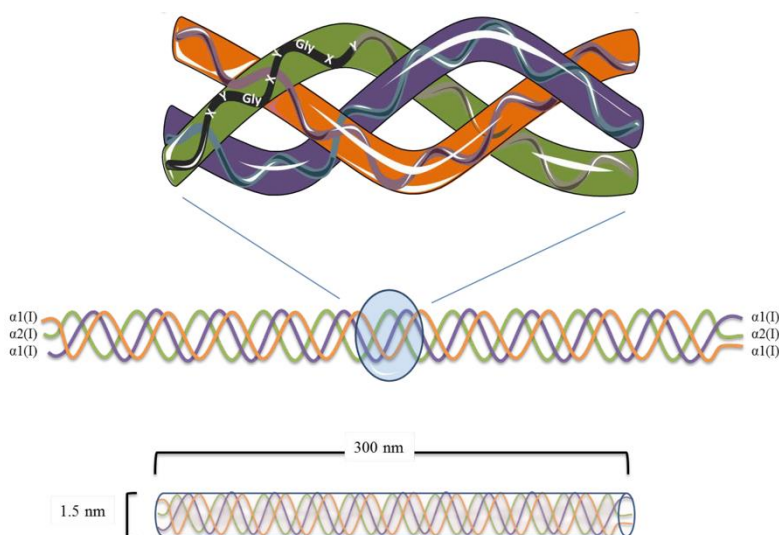
As CATs representam outra classe de endopeptidases que, assim como as MMPs, tem a capacidade de degradar componentes da MEC, especialmente colágeno tipo I, laminina, fibronectina e proteoglicanos⁵⁸⁻⁶⁰. Atualmente são conhecidos 11 membros deste grupo de proteases (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W, X), que apresentam em comum na sua estrutura um sítio ativo formado por resíduos de Cys (cisteína) e His (histidina), aminoácidos fundamentais para sua atividade proteolítica⁶¹. Atualmente foram identificadas na dentina as catepsinas B e K⁶². A co-distribuição das CAT-K, CAT-B e MMPs na dentina humana sadia foi demonstrada por meio de imunohistoquímica¹⁸. Entretanto, nesse tipo de substrato, a atividade enzimática de quebra do colágeno por MMPs parece ser dominante sobre a atividade enzimática das CATs¹⁸.

3.2.2 Colágeno tipo I

A matriz da dentina é composta majoritariamente por colágeno tipo I, embora haja traços dos tipos III e V^{11,39, 63}. A molécula de colágeno tipo I tem uma forma de bastão com 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro, formada por três cadeias polipeptídicas, sendo duas $\alpha 1$ e uma $\alpha 2$. Essas cadeias apresentam uma sequência repetida de três aminoácidos, geralmente Glicina (Gly)-Xxx-Yyy, em que Xxx normalmente é uma prolina e Yyy uma hidroxiprolina (Figura 1)⁶⁴⁻⁶⁶. Essas cadeias sofrem um processo de torção em torno de um eixo central, no sentido horário, de

modo a formar uma estrutura conhecida por super hélice de colágeno, com os resíduos de glicina das cadeias voltados para o centro dessa estrutura^{64,67}. Esses resíduos, por serem moléculas pequenas, permitem a compactação das cadeias na região central, as quais mantem-se unidas por meio de forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio^{62,65}. Dessa forma, a molécula de colágeno apresenta três domínios: a região central da tripla hélice, a região aminoterminal não helicoidal (N-telopectídeo) e a região carboxiterminal (C-telopectídeo), também não helicoidal (Figura 2)⁶⁸⁻⁷⁰.

Figura 1 - Representação da molécula de colágeno



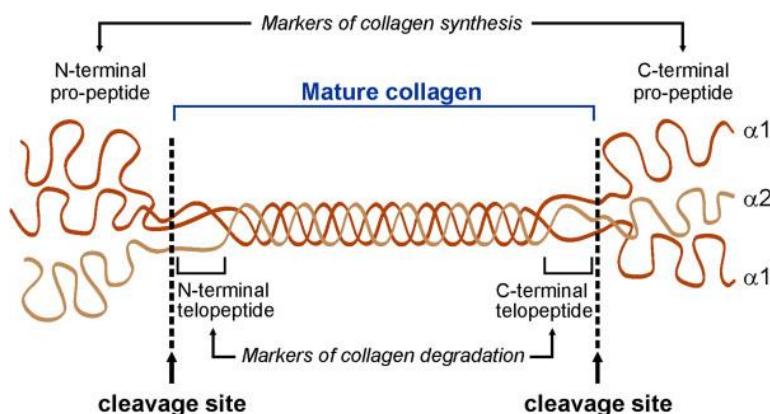
Formada por duas cadeias peptídicas α1 e uma cadeia α2 entrelaçadas em si. Um terço dos aminoácidos que compõem as cadeias é representado pela tríade Glicina (Gly)-Xxx-Yyy, onde Xxx é frequentemente uma prolina e Yyy uma hidroxiprolina. A molécula de colágeno tem cerca de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro.

Fonte: Seseogullari-Dirihan et al⁶⁶ (2016).

O processo de fibrilogênese têm início quando os domínios terminais são clivados por peptidases específicas denominadas pro-colágeno peptidases, dando origem ao tropocolágeno (ou molécula de colágeno)⁷¹. Assim, as moléculas de colágeno estabelecem ligações cruzadas endógenas (*cross-links*) a nível intra e intermolecular, a fim de manter a estrutura molecular e fibrilar^{69,71}. Essas ligações cruzadas endógenas são responsáveis pela estabilidade, viscolasticidade e

resistência mecânica do colágeno, e, conseqüentemente, dos tecidos formados por essa proteína⁷².

Figura 2 - Domínios da molécula de colágeno



A região central da tripla hélice, e as regiões aminoterminal (N-telopeptídeo) e carboxiterminal (C-telopeptídeo), ambas não helicoidais. Os pro-peptídeos N-terminal e C-terminal são clivados por enzimas específicas (pro-colágeno peptidases) para dar origem ao colágeno maduro ou tropocolágeno.

Fonte: reproduzido de Fan et al.⁷⁰ (2012)

No processo de adesão de materiais poliméricos a dentina, essas fibrilas são constituintes fundamentais da camada híbrida⁸, e esse biocomposto, por sua vez, exerce as funções primordiais de retenção do material e selamento da dentina. Contudo, sabe-se que existem regiões da camada híbrida nas quais as fibrilas de colágeno não são protegidas pelo polímero resinoso, e, portanto, permanecem expostas¹³ e susceptíveis aos processos de degradação hidrolítica e enzimática¹¹.

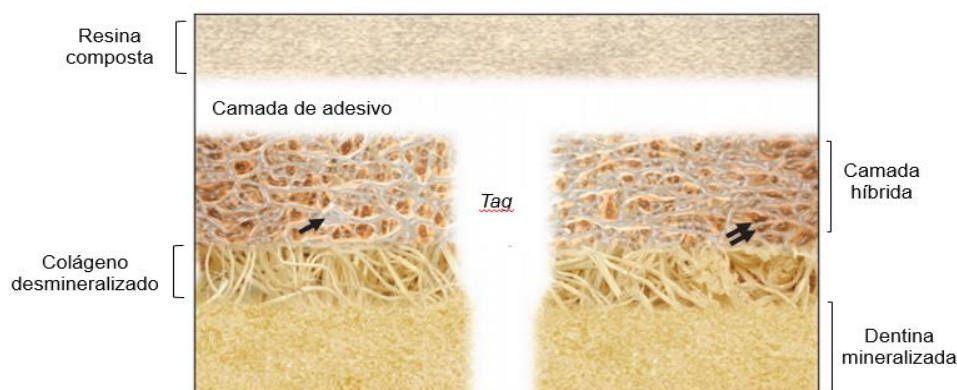
3.3 União resina-dentina e mecanismos de degradação da camada híbrida

A característica orgânica e umidade próprias do tecido dentinário, tornam a adesão a esse substrato um processo desafiador. Desde 1982, sabe-se que a união resina-dentina é estabelecida por meio da formação da camada híbrida⁸. Muitos estudos têm avaliado esta estrutura e contribuído para a compreensão de sua dinâmica de estabelecimento e manutenção em longo prazo^{11,12,73,74}. Especialmente nas últimas duas décadas, tem sido demonstrado que a degradação da camada

híbrida ocorre independentemente da categoria do sistema adesivo utilizado, ou seja, convencional ou autocondicionante^{6,12,75} e que este processo ocorre basicamente em duas frentes (1) a clivagem do colágeno exposto (degradação enzimática) e (2) a hidrólise da porção resinosa da camada híbrida (degradação hidrolítica)^{6,12}.

A infiltração incompleta da rede de colágeno por monômeros adesivos^{11,13,76-79}, é consequência do reduzido espaço disponível para receber o adesivo entre as moléculas de colágeno que compõem as fibrilas⁹. Segundo os autores, a falta de espaço se deve à dois fatores principais: 1) a presença de moléculas de água livres e também ligadas ao colágeno desmineralizado e 2) ao empacotamento denso do colágeno⁹. Esta infiltração deficiente somada à presença de água e a separação de fases promovida pela diferença de peso molecular e grau de hidrofilia dos monômeros que compõem um mesmo adesivo, favorece a manutenção de colágeno exposto na camada híbrida (especialmente em sua base) e gera uma porção resinosa mais instável (Figura 3)^{6,12,80}.

Figura 3- Representação da infiltração incompleta do adesivo na matriz de colágeno



A figura mostra as áreas pobremente infiltradas e saturadas com água (setas) e uma área de colágeno desmineralizado que permanece exposto na base da camada híbrida.

Fonte: Modificado de Betancourt et al., 2019⁸⁰

O colágeno dentinário desprovido de reforço mineral ou polimérico exposto na camada híbrida está susceptível aos fenômenos de degradação que acometem a união resina-dentina^{7,80,81}. O processo de degradação enzimática do colágeno é mediado pela ação de MMPs e CATs, que respondem, em conjunto, pela atividade

proteolítica da dentina, e são responsáveis por aproximadamente 43% da degradação total da interface de união^{17,18}. Embora tenha sido demonstrada a co-ocorrência e distribuição *in situ* de MMPs e CATs na dentina, a maior parte da atividade proteolítica desse substrato é exercida pelas MMPs, sendo sugestivo que essa classe de proteases desempenha um papel mais relevante na degradação da camada híbrida¹⁸.

Além do processo de degradação enzimática, é importante apontar um outro evento que contribui para a degradação da camada híbrida, a hidrólise da porção resinosa. Trata-se de um processo que envolve a quebra de ligações entre os polímeros mediante a adição de uma molécula de água por enzimas denominadas esterases⁸³. Esse fenômeno tem implicações clínicas significativas sobre a longevidade das restaurações tendo em vista que a degradação favorece a perda de selamento marginal, contribuindo para a hipersensibilidade dentinária, a pigmentação marginal e o desenvolvimento de lesões secundárias de cárie⁸⁴.

A biomodificação do colágeno dentinário por agentes promotores de ligações cruzadas tem sido considerada uma estratégia válida para aumentar a longevidade da união resina-dentina. Além de não interferir com a resistência de união imediata de sistemas adesivos à dentina, interfaces produzidas sobre a dentina biomodificada apresentam melhor desempenho mecânico e estabilidade estrutural em longo prazo do que interfaces produzidas pela técnica de adesão úmida convencional^{19,20,85}.

3.4 Biomodificação do Colágeno Dentinário

Neste tópico serão abordados os Agentes promotores de ligações cruzadas (3.4.1), o Efeito da biomodificação nas propriedades mecânicas do colágeno e na longevidade da união resina-dentina (3.4.2) e a Resposta de células pulpares aos agentes promotores de ligações cruzadas (3.4.3).

3.4.1 Agentes promotores de ligações cruzadas

Os agentes promotores de ligações cruzadas (*cross-linkers*) são substâncias capazes de induzir a formação de novas ligações cruzadas (exógenas ou secundária). Na matriz dentinária, essas novas ligações ocorrem no interior das moléculas de colágeno (intramoleculares), no interior das fibrilas de colágeno (intrafibrilares ou intermoleculares) e entre as fibrilas (interfibrilares), melhorando suas propriedades mecânicas e sua resistência à degradação hidrolítica e enzimática^{14,82}. Da mesma

forma, esses agentes induzem a formação de ligações cruzadas em outras proteínas dentinárias, incluindo as MMPs e CTAs, e, portanto, são considerados potentes inibidores dessas proteases^{27,20,66,86}. O aumento do número de ligações cruzadas limita a motilidade molecular da protease e, conseqüentemente, impede ou dificulta sobremaneira o acoplamento do seu sítio ativo ao substrato (no presente contexto, as moléculas de colágeno) para que possa exercer seu papel de clivagem^{81,87}.

Dentre vários, os *cross-linkers* mais investigados são as proantocianidinas (PA), a carbodiimida (1-Etil3-[3-dimetilaminopropil] hidroclorito de carbodiimida ou EDC) e o glutaraldeído. As PAs são polifenóis, da classe dos flavonoides, oriundos de diversas fontes naturais; entretanto, a maioria dos estudos na área da Odontologia adesiva utiliza o extrato produzido a partir da semente da uva *Vitis Vinífera*, a qual contém 95% de PAs^{27,66,88-90}. Essa substância quando aplicada sobre a dentina induz a formação de ligações covalentes, iônicas e de hidrogênio, estabilizando a matriz⁸⁸ e inibindo proteases dentinárias^{27,66,89,90}. De maneira interessante, essa substância apresenta propriedades anti-inflamatória, antiapoptótica, antioxidante e antimicrobiana⁹¹. Além disto, recentemente foi demonstrado o potencial bioativo transdentinário e direto dessa substância sobre células da polpa dental humana⁹². No entanto, apesar das propriedades benéficas, e dos resultados promissores, a PA tem uma coloração acastanhada que pigmenta a dentina, podendo influenciar negativamente na estética final da restauração.

A carbodiimida (EDC) é um *cross-linker* sintético que vem sendo utilizado na área médica para reparo articular, sendo incorporada ao ácido hialurônico na técnica de viscosuplementação, e para o desenvolvimento de *scaffolds* atuantes na regeneração tecidual em geral⁹³. Bons resultados têm sido observados quando da aplicação do EDC por períodos clinicamente viáveis (30 ou 60 segundos), quanto a melhoria das propriedades mecânicas da dentina coronária e radicular e inibição de MMPs^{19-21,54,94,95}. Essa substância é capaz de ativar o grupamento carboxila dos resíduos dos ácidos glutâmico e aspártico que estão presentes nas cadeias polipeptídicas das proteínas, formando *cross-links* sem grupos reativos residuais⁹⁶.

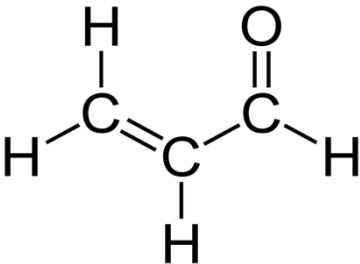
O glutaraldeído é um dialdeído saturado utilizado para fixação de tecidos, o qual tem sido aplicado no campo biomédico como agente *cross-linker*, atuando na melhora da integridade estrutural e estabilidade de biomateriais à base de colágeno, como válvulas cardíacas, enxertos vasculares e pele artificial implantada *in vivo*^{7,97-100}. O glutaraldeído também vem sendo investigado como coadjuvante nos

procedimentos restauradores adesivos como potencial agente *cross-linker*^{22,101,102}. Quando aplicado sobre a matriz dentinária em períodos clinicamente viáveis, como 30 e 60 segundos, esse agente aumenta a sua rigidez por meio da biomodificação do colágeno²¹, promove a remineralização das fibrilas de colágeno¹⁰¹, além de reduzir significativamente a atividade proteolítica geral da dentina, por meio da inibição de MMPs²⁰. Entretanto, o glutaraldeído ainda é temido quanto ao seu potencial tóxico, embora existam estudos in vitro que refutem tal toxicidade sobre células pulpares^{30,103}.

O uso da acroleína como possível agente promotor de ligações cruzadas foi proposto pela primeira vez por Maravic et al. (2018)³¹. Nesse estudo, a acroleína 0,01wt% foi capaz de preservar a estabilidade da união resina dentina por um ano, assim como reduzir a atividade proteolítica da dentina em cerca de 43%. A acroleína, também denominada de 2-propenal, é o mais simples dos aldeídos insaturados (Figura 4). Trata-se de um composto altamente eletrofílico e reativo devido a presença dos grupamentos vinil e aldeído conjugados^{32,104}. A formação de *cross-links* no colágeno promovidos pela acroleína pode ser explicada por duas vias, a formação de base de Schiff que ocorre devido ao ataque nucleofílico de grupos aminoterminais de resíduos de lisina na estrutura proteica ou pela adição de Michael em que ocorre a adição de grupos amino a dupla ligações encontradas na molécula de acroleína¹⁰⁴.

Do ponto de vista de fontes provedoras, por muito tempo a acroleína esteve associada a poluição antropogênica, visto que é gerada em processos de combustão (fumaça de cigarro e queima de biocombustíveis)³⁴. Além disso, também está presente na dieta quando gorduras animais ou vegetais, carboidratos e aminoácidos são aquecidos em alta temperatura^{34,105}. Entretanto, recentemente foi demonstrada a presença dessa substância de maneira natural, em um ambiente inexplorado pelo homem, sendo associada a decomposição de folhas de algumas espécies de árvores¹⁰⁶. No organismo, essa substância também está presente em baixas concentrações na saliva humana, e ainda no metabolismo endógeno, como a peroxidação lipídica, catabolismo das poliaminas e a síntese dos aminoácidos metionina e treonina^{34,105,107}.

Figura 4- Estrutura química e propriedades da acroleína

	Fórmula molecular	C ₃ H ₄ O ₄
	Massa molar	56.064 g.mol ⁻¹
	Aparência	Líquido incolor ou levemente amarelado
	Densidade	0.839 g/mL
	Solubilidade em água	Apreciável (>10%)
	Pressão de vapor	210 mmHg

Fonte: Wikipédia, a enciclopédia livre.

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, a principal fonte de exposição à acroleína é a atmosfera, a qual contém, em média, 14,3 µg/m³ desse dialdeído (CAS Nr. 107-02-8, 2003)¹⁰⁸, e a Organização Mundial da Saúde (OMS)¹⁰⁹ considera 0,0075 mg/kg como a ingestão diária tolerável da acroleína. Essas informações suportam, do ponto de vista toxicológico, o uso da acroleína como coadjuvante no processo de adesão à dentina, desde que em baixas concentrações.

3.4.2 Efeito da biomodificação nas propriedades mecânicas do colágeno e na longevidade da união resina-dentina

A dentina mineralizada apresenta uma rigidez (módulo de elasticidade) de aproximadamente 20 MPa, o que confere a esse substrato uma alta resistência à compressão¹¹⁰. Entretanto, a remoção do seu conteúdo mineral, como ocorre após o condicionamento com ácido fosfórico, reduz drasticamente essa propriedade mecânica. A dentina desmineralizada apresenta módulo de elasticidade de apenas 1 MPa, e, portanto, deve ser mantida úmida para evitar o colapso das fibrilas de colágeno¹¹⁰. Como resultado do aumento do número de ligações cruzadas induzidas pela aplicação de *cross-linkers* sobre a dentina desmineralizada, ocorre um aumento das propriedades mecânicas do colágeno^{21,110,111}, tornando essa proteína mais resistente à degradação^{19,112}. Portanto, alterações do módulo de elasticidade da matriz de dentina podem ser interpretadas como maior ou menor susceptibilidade desse substrato aos mecanismos de degradação¹¹⁰.

A aplicação de 10% glutaraldeído sobre espécimes de dentina desmineralizada aumentou o módulo de elasticidade do colágeno em cerca de 123% quando aplicado por 30 segundos e em 265% quando aplicado por 60 segundos²¹. Da mesma maneira, o tratamento com EDC resultou em aumento da rigidez da matriz dentinária, porém em proporções inferiores as observadas após o uso do glutaraldeído²¹. A avaliação *in situ* do módulo de elasticidade da camada de dentina condicionada também permitiu verificar aumento significativo após o tratamento com EDC por 60 segundos¹¹⁰.

A resistência máxima à tração (RMT) é uma das propriedades mecânicas que permitem investigar o efeito de diferentes tratamentos sobre o colágeno. Bedran-Russo et al. (2010)¹⁹ observaram um aumento significativo na RMT de espécimes tratados com EDC (29,5 MPa) em comparação com espécimes tratados apenas com água (5,2 MPa), assim como maior resistência dos espécimes tratados com EDC à degradação pela colagenase de origem bacteriana. A RMT da matriz dentinária também foi significativamente aumentada após o tratamento com dois extratos ricos em proantocianidinas, um obtido da semente de uvas (GSE, *grape seed extract*) e outro da semente do cacau. Os espécimes tratados com água apresentaram uma RMT de cerca de 12 MPa, enquanto espécimes tratados com os extratos da semente de uvas e cacau, apresentaram RMT de 19,5 MPa e 16,3 MPa, respectivamente. Esse aumento na RMT tornou os espécimes tratados com os *cross-linkers* resistentes a degradação pela colagenase, enquanto os espécimes não tratados foram completamente degradados⁹⁰.

O aumento da rigidez da molécula de colágeno dificulta sobremaneira a sua clivagem pelas proteases dentinárias. O diâmetro da molécula de colágeno é de 1,5 nm (Figura 1), enquanto a abertura do sítio ativo das MMPs e CTAs é de aproximadamente 0,5 nm. Assim, para que essas proteases possam degradar o colágeno, elas precisam inicialmente separar e clivar individualmente cada uma das cadeias polipeptídicas que constituem essa proteína⁸¹. Consequentemente, o colágeno exposto nas camadas híbridas produzidas sobre a dentina biomodificada é mais resistente aos processos de degradação e, portanto, essas camadas são mais estáveis longitudinalmente.

A biomodificação da dentina condicionada com produtos comerciais contendo glutaraldeído foi capaz de reduzir a taxa de degradação da camada híbrida após seis meses²³. Citta¹⁰² (2019) utilizou a mesma metodologia para avaliar a estabilidade de uniões produzidas após a biomodificação do colágeno dentinário por GSE 5%,

solução de glutaraldeído 5% e Gluma Desensitizer. Após um ano de envelhecimento foi verificado, para os grupos que receberam tratamento com os cross-linkers avaliados, que os valores de resistência de união se mantiveram estáveis e também houve redução na atividade proteolítica evidenciada no teste de zimografia *in situ*¹⁰².

Estudos avaliaram o potencial do EDC a 0,5 M²² ou 0,3 M⁸⁵ quando aplicado por 60 segundos sobre a dentina condicionada. Foi verificado que, independente da concentração utilizada, esse *cross-linker* se mostrou efetivo quanto a manutenção da estabilidade da união resina-dentina. Scheffel et al²². (2015) confirmaram estes achados no teste de nanoinfiltração no qual um menor número de íons prata foram identificados nas interfaces produzidas após a biomodificação com o EDC. Mazzoni et al (2018)⁸⁵ identificaram ainda uma inativação quase completa da atividade gelatinolítica da dentina após o tratamento com este *cross-linker*.

Quanto a acroleína, alvo de investigação desse estudo, além de não interferir com a resistência de união imediata de um sistema adesivo convencional simplificado, favoreceu a estabilidade da união resina-dentina no período de 12 meses³¹. Esse *cross-linker* também reduziu significativamente a atividade proteolítica da união resina-dentina, demonstrada por meio de zimografia *in situ*³¹.

3.4.3 Resposta de células pulpares aos agentes promotores de ligações cruzadas

Ao contrário dos muitos trabalhos desenvolvidos sobre as propriedades mecânicas da dentina biomodificada e da união resina-dentina após a aplicação de agentes promotores de ligações cruzadas e sobre a capacidade inibitória de MMPs e CATs, o número de trabalhos acerca da resposta pulpar a aplicação desses agentes sobre a dentina condicionada são poucos^{30,92,103}.

A característica tubular do tecido dentinário favorece o transporte de substâncias aplicadas sobre este tecido até a polpa. Dessa forma, para que uma substância possa vir a ser aplicada sobre a dentina é necessário que se conheça o seu efeito sobre células da polpa dental humana. Nesse aspecto, as PAs se destacam sobre os demais *cross-linkers*, isto porque além das conhecidas propriedades anti-inflamatória, antiapoptótica, antioxidante e antimicrobiana, apresentam ainda potencial bioativo transdentinário e direto sobre células da polpa dental humana^{91,92}.

Embora o EDC e o glutaraldeído não apresentem bioatividade sobre células da polpa, sabe-se que a depender da concentração não são tóxicos a este tecido^{30,103}.

Scheffel et al.¹⁰³ (2015) demonstraram que o EDC nas concentrações 0,1, 0,3 e 0,5 M não apresenta efeitos tóxicos sobre células odontoblastóides MDPC-23. Em relação ao glutaraldeído, apesar dos resultados encorajadores de sua utilização no processo de adesão à dentina, sua toxicidade ainda é muito discutida. Scheffel et al.³⁰ (2015) avaliaram a citotoxicidade transdentinária do glutaraldeído (2,5%, 5% e 10%) e do Gluma Desensitizer sobre células odontoblastóides. Nas diferentes concentrações investigadas, o glutaraldeído não apresentou efeitos deletérios às células, mesmo aplicado em uma espessura de dentina de apenas 0,4 mm.

Em relação à acroleína, e que seja do conhecimento dos autores do presente estudo, não existem, até o momento, informações sobre a sua segurança de uso no processo de adesão a dentina, e sua possível toxicidade sobre células pulpares deve ser investigada.

4 MATERIAL E MÉTODO

Esse capítulo será apresentado em tópicos referentes a cada etapa de execução deste estudo.

4.1 Aspectos Éticos

Para o desenvolvimento do estudo, cento e dezenove (n=119) terceiros molares humanos foram doados pelo Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr. Destes, cinquenta e quatro foram utilizados para avaliação da resposta de células pulpares a biomodificação do colágeno pela acroleína, vinte e cinco para a avaliação da resistência máxima à tração do colágeno e quarenta para avaliação da resistência de união resina-dentina. Adicionalmente, três molares hígidos foram coletados imediatamente após a cirurgia para obtenção de uma cultura primária de células da polpa dental humana (HDPCs). Os protocolos do estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da FOAr sob o CAAE 18752419.6.0000.5416 (Anexo). Foram selecionados dentes íntegros e sem alteração de cor indicativa de cárie ou hipoplasia/hipomineralização do esmalte. Os dentes selecionados foram submetidos a profilaxia com pedra pomes em água, lavados copiosamente, armazenados em timol 0,1% e mantidos em refrigerador à 4°C até o momento de sua utilização. Os terceiros molares utilizados para obtenção de HDPCs, foram coletados após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido e transportados ao laboratório em solução salina tamponada de fosfato (PBS) contendo antibiótico e antifúngico.

4.2 Obtenção de Discos de Dentina para as Análises Biológicas

Para as análises biológicas foram necessários 54 terceiros molares humanos com coroas dentárias hígidas. Um disco de dentina com 0,5 mm de espessura foi obtido da região média da coroa de cada dente por meio de cortes transversais ao seu longo eixo sob refrigeração constante, utilizando uma cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltda., Lake Bluff, IL, EUA) equipada com disco diamantado (ref.11-4254, 4"x 0,012", série 15LC, Diamond

Wafering Blade, Buehler Ltda.). As superfícies oclusais desses discos foram desgastadas manualmente com papel abrasivo de carbeto de silício de granulação 600 (T469-SF-Norton; Saint-Gobain Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil), até a espessura final de 0,4 mm, aferida por meio de paquímetro digital (Mitutoyo Sul América Ltda., Suzano, SP, Brasil). As superfícies foram inspecionadas em lupa estereoscópica 4x (Modelo SZX7, Olympus, São Paulo, Brasil) para confirmar a ausência de remanescente de esmalte na superfície oclusal, ou defeitos referentes a projeção dos cornos pulpaes na superfície pulpar.

4.3 Determinação da Condutância Hidráulica

As características morfológicas da dentina, tais como o número e o diâmetro dos túbulos dentinários, variam no próprio dente de acordo com a proximidade com a polpa, e também de um dente para outro, assim essa característica pode atuar como fator de confundimento nos modelos de avaliação de citotoxicidade que utilizam barreira dentinária. Assim, para reduzir o risco de viés se faz necessária a verificação da condutância hidráulica de todos os discos de dentina. Para tanto, a *smear layer* formada sobre ambas as superfícies dos discos (oclusal e pulpar) foi removida pela aplicação de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 0,5 M, por trinta segundos, seguido de lavagem com água deionizada pelo mesmo período^{30,103}.

Cada disco foi posicionado em uma câmara de filtração conectada, por meio de uma cânula metálica e um tubo de poliestireno (sonda nasogástrica nº 8), a uma coluna de água de 180 cm de altura (pressão 132,4 mmHg ou 2,56 psi), que força a passagem (filtração) de água deionizada através dos túbulos dentinários continuamente. Uma vez acionado o sistema, a dentina foi filtrada por 5 minutos para que eventuais restos presentes no interior dos túbulos dentinários pudessem ser deslocados pelo efeito físico da passagem de água sob a alta pressão. Decorrido esse período inicial, outros 5 minutos (tempo de filtração) foram cronometrados, e em seguida foi induzida a formação de uma bolha de ar no tubo de poliestireno, o movimento dessa bolha foi a partir do momento em que ela entrou em um tubo de vidro colocado sobre uma régua, em 30 e 60 segundos. O deslocamento da bolha foi determinado em milímetros e representou o valor de permeabilidade da dentina.

Com base nos dados de permeabilidade dentinária, os 54 discos foram alocados em 6 grupos experimentais (n=9), de tal forma que não houve diferença estatisticamente significativa entre a permeabilidade média de cada grupo (ANOVA; $p=1,000$) e os coeficientes de variação foram semelhantes. Em seguida, os discos de dentina foram removidos das câmaras de filtração e reduzidos a um diâmetro final de 8 mm. O desgaste foi realizado com auxílio de ponta diamantada cilíndrica (#1095 - KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) em alta rotação e irrigação constante.

Sobre a superfície oclusal do disco foi produzida uma nova *smear layer* por meio da abrasão dessa superfície em lixa de carbetto de silício de granulação 320. A superfície foi abundantemente enxaguada com água deionizada e os discos foram adaptados, individualmente, em câmaras pulpares artificiais (CPAs)^{113,114}. Os conjuntos CPA/disco de dentina foram submetidos a esterilização a óxido de etileno (ACECIL; Central de Esterilização Com. Ind. Ltda., Campinas, SP, Brasil).

4.4 Cultura Celular

Para realização deste estudo, foram utilizados dois tipos celulares, células odontoblastóides (MDPC-23) e células da polpa dental humana (HDPCs).

4.4.1 Cultura de MDPC-23

Células imortalizadas da linhagem odontoblastóide MDPC-23 foram cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm² (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco, Grand Island, NY, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Grand Island, NY, EUA), 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, EUA). As células foram mantidas em uma atmosfera umedecida à 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar, e foram subcultivadas a cada três dias na densidade de 3 x 10⁴ células/cm², até a obtenção de número suficiente de células para o início os ensaios.

4.4.2 Cultura de células da polpa dental humana (HDPCs)

Células de polpa dental humana (HDPCs, *human dental pulp cells*) foram coletadas de 3 molares humanos hígidos recém extraídos de pacientes na faixa etária de 18 a 20 anos, que procuraram atendimento na Clínica de Cirurgia da FOAr, UNESP e após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Após a extração, os dentes foram imediatamente acondicionados em tubos falcon contendo solução salina tamponada de fosfato (PBS, *phosphate buffered saline solution*), suplementada com antibiótico e antifúngico (100 IU/mL de penicilina, 100 g/mL de estreptomicina e 0,25 g/mL de anfotericina B; Gibco, Grand Island, NY, EUA). No laboratório, o dente foi removido do recipiente coletor e envolto por gaze esterilizada umedecida em PBS. Cada dente foi fraturado com auxílio de um “martelo” esterilizado, e o tecido pulpar foi removido de forma asséptica com auxílio de curetas e limas endodônticas. Em seguida, o tecido foi fragmentado com auxílio de lâmina de bisturi. Os fragmentos de tecido foram submetidos à desagregação enzimática em solução de collagenase tipo 1 (3 mg/mL; Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EUA) por 4 horas, a 37°C, em incubadora (5% de CO₂ e 95% de ar).

Foi utilizada a técnica de células aderentes. Para tanto, as amostras foram incubadas em placas de 6 compartimentos contendo meio de cultura α -MEM completo (*Minimum Essential Medium Eagle Apha*, suplementado com 10% de SFB, L-glutamina e 1% penicilina/estreptomicina), por 3 horas. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células que permaneceram aderidas no fundo dos compartimentos foram cultivadas em garrafas contendo o meio de cultura α -MEM completo, até que o número necessário de células para o desenvolvimento dos diferentes ensaios laboratoriais foi atingido. As células obtidas foram congeladas a -80°C e foram utilizadas até a 7ª passagem.

4.5 Cultivo Celular nos Discos de Dentina

Cada conjunto CPA/disco de dentina (CPAd) foi posicionado em um compartimento de placas de cultura de 24 compartimentos, com a parede pulpar voltada para cima, e o compartimento foi preenchido com 1 mL de DMEM completo. A placa foi mantida em incubadora por 24 horas, à 37°C, com 5% de

CO₂ e 95% de ar. Em seguida, o meio de cultura foi aspirado para expor a parede pulpar do disco sobre a qual foram semeadas 10⁵ células MDPC-23 em 40 µL de meio de cultura. Após o plantio, a placa foi novamente incubada nas mesmas condições mencionadas acima, durante 30 minutos, para a aderência celular à dentina. Concluído esse período, mais 1 mL de DMEM acrescido de 10% de SFB foi adicionado em cada compartimento, e então a placa de cultura foi incubada novamente, por 48 horas.

Decorridas as 48 horas, o meio de cultura foi aspirado e foram adicionados 2 mL de DMEM sem SFB. As CPAdS foram girovertidas no sentido vertical para que a superfície oclusal da dentina pudesse receber os tratamentos. A rotação da CPAd foi realizada de maneira lenta, no interior do compartimento da placa de cultura, para evitar a formação de bolhas e garantir que o meio de cultura permanecesse em íntimo contato com toda a extensão da dentina pulpar onde as células MDPC-23 foram cultivadas. Uma vez girovertida, um mL de meio foi removido, expondo a dentina da superfície oclusal do disco. Essa superfície foi lavada por 60 segundos com água deionizada concomitante a aspiração, e ao final, seca com papel absorvente. A superfície de dentina exposta foi condicionada com ácido fosfórico a 35% (Ultra Etch, Ultradent, Utah, EUA) por 15 segundos e o ácido foi removido por lavagem com água deionizada durante 30 segundos, com aspiração concomitante. Após a remoção do excesso de água com papel absorvente, a dentina condicionada foi saturada com uma das soluções apresentadas na Tabela 1.

Cada solução foi aplicada em um volume de 20 µL com auxílio de uma pipeta, e mantida em contato com a dentina por 60 segundos, sem agitação. Decorrido esse período, a superfície foi lavada com 5 mL de água destilada e o excesso de umidade foi removido com papel absorvente, mantendo-se a superfície com aspecto úmido. Finalizados os tratamentos, a placa de cultura foi incubada novamente por um período de 24 horas. Durante esse período, componentes das soluções capazes de se difundir por toda espessura de dentina entram em contato com as células MDPC-23 cultivadas na superfície pulpar dos discos e, na sequência, se difundem no meio de cultura, dando origem ao então denominado meio condicionado ou extrato. Decorridas as 24 horas, as CPAdS foram removidas dos compartimentos, e todo extrato (~1 mL) foi coletado. A viabilidade das MDPC-23 semeadas sobre a parede pulpar dos discos de dentina foi analisada.

Tabela 1 - Distribuição dos 54 discos de dentina de acordo com a solução de tratamento da dentina oclusal, após o condicionamento com ácido fosfórico

Grupos (n=9)	Solução de tratamento da dentina condicionada	Fabricante
C	Água deionizada (controle)	Êxodo científica, Sumaré, SP, Brasil
PH	Peróxido de hidrogênio 3%	
ACR 0,02%	Acroleína 0,02%	Hefei TNJ Chemical Industry Co., Ltd., Anhui Province, China
ACR 0,01%	Acroleína 0,01%	
ACR 0,005%	Acroleína 0,005%	
GD	Glutaraldeído 5%	Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, EUA

Fonte: Elaboração própria.

Cem microlitros dos extratos coletados foram aplicados sobre novas células MDPC-23 e HDPCs previamente semeadas (1×10^4 células/mL) em placas de 96 compartimentos, as quais foram incubadas à 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar, por 24 horas. Na sequência, os extratos foram aspirados e substituídos por DMEM completo para as MDPC-23 e α -MEM completo suplementado com 10% SFB, ácido ascórbico e betaglicerofosfato para HDPCs, até o momento da realização de cada protocolo (Figura 5).

4.6 Viabilidade Celular

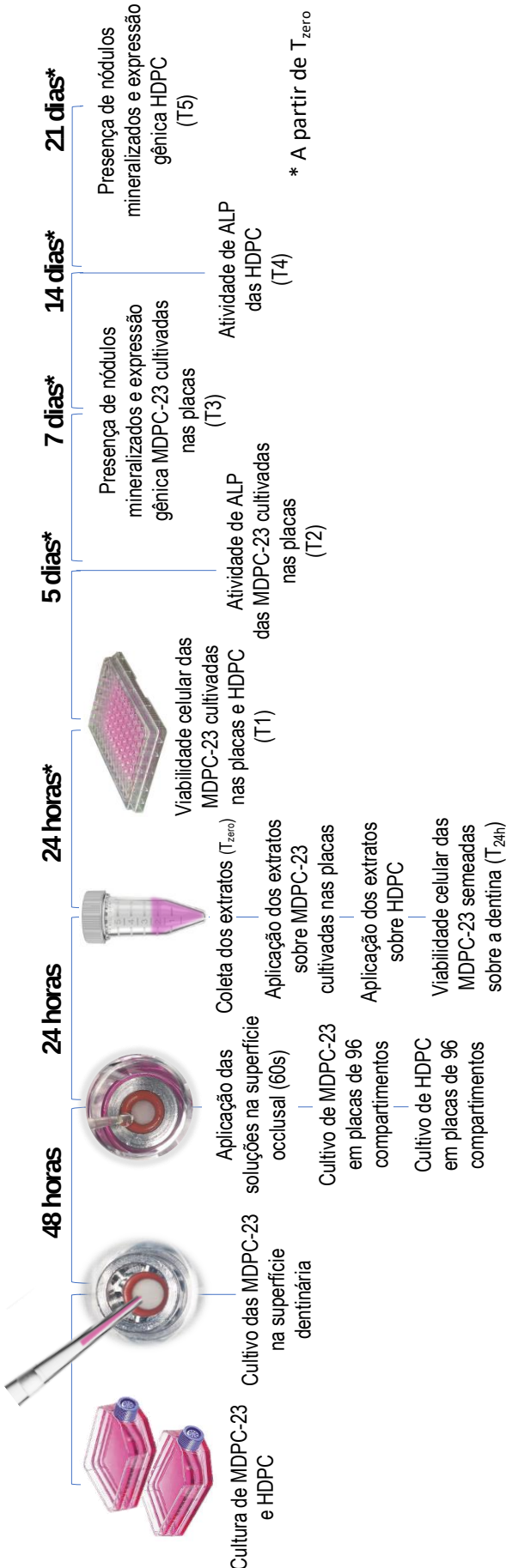
O teste de viabilidade celular foi realizado para as MDPC-23 semeadas sobre os discos de dentina e para ambas as linhagens celulares cultivadas nas placas de cultura. Para as células MDPC-23 semeadas no disco de dentina, este ensaio foi realizado no período de 24 (T_{24h}), contados a partir da aplicação dos materiais, enquanto que para as MDPCs e HDPCs semeadas na placa, foram realizados no período de 24 horas após a coleta dos extratos e a aplicação dos mesmos sobre as células (T1). Para as células semeadas no disco, as CPAs que foram removidas da placa de cultura inicial, foram transferidas para uma nova placa

de 24 compartimentos, porém em posição invertida, isto é, com a superfície pulpar do disco voltada para cima. Meio de cultura DMEM sem SFB suplementado com alamarBlue (10:1) foi adicionado em cada compartimento (1 mL) e a placa incubada por 3 horas a 37 °C e 5% CO₂. Para a análise da viabilidade celular em T1, o extrato foi aspirado e as células foram incubadas com meio de cultura contendo alamarBlue, como descrito acima. Decorrido o período de incubação, o sobrenadante foi transferido para placas de 96 compartimentos e analisado em leitor de fluorescência (540 nm excitação; 590 nm emissão) (Synergy H1, Biotek, Winooski, EUA). O valor de fluorescência obtido para o grupo controle negativo (água deionizada) foi considerado como 100% de viabilidade celular. Todos os demais valores foram transformados em porcentagem do grupo controle aplicando-se uma regra de três básica. Para esse protocolo foram avaliados três espécimes por grupo em três momentos diferentes, o número final de dados para análise estatística foi igual a 9.

4.7 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de ALP foi avaliada após 5 dias (T2) para as MDPC-23 e 14 dias (T4) para HDPCs. O teste de timolftaleína monofosfato (n=9/grupo) foi realizado por meio do protocolo do Kit de Fosfatase Alcalina – Ensaio de Ponto Final (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Para esse protocolo, o meio de cultura foi aspirado, e as amostras lavadas por três vezes com 1 mL de PBS a temperatura de 37°C. Um mililitro (1 mL) de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA) foi aplicado sobre as células e mantido por 40 minutos para promover a lise celular. Durante esse período foram preparados tubos Falcon, identificados como testes, padrão e blank. Em cada um dos tubos foram adicionados 50 µL do substrato (timolftaleína monofosfato 22 mmol/L - reagente nº 1 do Kit) e 500 µL de tampão (300 mmol/L, pH 10,1 - reagente nº 2 do Kit), com exceção do tubo padrão, no qual foram adicionados 50 µL da solução padrão 45 UI/L (reagente nº 4 do Kit). Decorrido o período para a lise celular, os tubos foram colocados em banho-maria (Fanem, Guarulhos, SP, Brasil) a 37°C por 2 minutos. Então, 50 µL da amostra de cada compartimento foram transferidos para os tubos testes, seguido de homogeneização manual e aquecimento em banho-maria por 10 minutos em agitador orbital (Quimis, Diadema, SP, Brasil). A

Figura 5. Linha do tempo dos protocolos laboratoriais para a determinação da citotoxicidade da acroleína



Abreviaturas: MDPC-23, células odontoblastóides imortalizadas; HDPCs, células da polpa dentária humana; T, tempo; ALP, fosfatase alcalina.

Fonte: Elaboração própria

reação foi concluída com a adição de 2 mL do reagente de cor (carbonato de sódio 94 mmol/L e hidróxido de sódio 250 mmol/L – reagente nº 3 do Kit) em cada tubo. Três alíquotas de 100 µL de cada tubo foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) e a absorbância lida em leitor de ELISA (Tp Reader; Thermo Plate, Nanshan District, Shenzhen, China) no comprimento de onda de 655 nm. A média dos três valores foi calculada para a análise estatística dos dados. A atividade de fosfatase alcalina foi calculada por meio da obtenção de uma curva padrão, com concentrações pré-determinadas desta enzima, que variaram de 0 - 8,65 µ/L para MDPC-23 e 0-0,25 µ/L para HDPC.

Para a normalização da ALP, foi necessário realizar a quantificação de proteína total presente no extrato. Assim, outra alíquota de 50 µL da reação de lise foi transferida para tubos contendo Solução de Reagente de Lowry (Sigma Chemical Co., Sant Louis, MO, EUA), mantida em contato com as células por 20 minutos, em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Em seguida, a solução de Folin e Ciocalteu's Phenol Reagent (Sigma Chemical Co., Sant Louis, MO, EUA) foi adicionada, e após 30 minutos, a absorbância foi mensurada a 655 nm. A dosagem de proteína total foi obtida a partir de uma curva padrão construída com concentrações conhecidas de 0 a 160 mg/mL de albumina, e o valor da atividade de ALP foi calculado a partir da divisão dos valores da dosagem da ALP pelo da proteína total. Estes valores foram transformados em porcentagem, considerando-se o grupo CN no período de 5 dias para MDPC-23 e 14 dias para HDPC como 100% de atividade de ALP. Esse protocolo foi realizado em três momentos e o número final de dados para análise estatística foi igual a 9.

4.8 Presença de Nódulos Mineralizados

A presença de nódulos mineralizados foi determinada pelo ensaio de Alizarin red (n=9/grupo). Após 24 horas das células em contato com o extrato (T1), as células MDPC-23 foram mantidas por 7 dias (T3) e as HDPCs por 21 dias (T5) em meio cultura específico para cada tipo celular. Após este período, as células foram fixadas em etanol 70% por 1 hora, seguido de lavagem com água deionizada, e incubação com 100 µL da solução de Alizarin Red (40 mM, pH 4.2; Sigma Chemical Co., Sant Louis, MO, EUA) por 15 min, sob agitação. Então, as células foram lavadas 3 vezes com água deionizada para a remoção do agente

corante, e os compartimentos foram fotografados individualmente em microscópio de luz (Olympus BX51TF, Tóquio, Japão) a um aumento de 4x. Após as tomadas fotográficas (análise qualitativa), foram adicionados 100 µL de solução de cloreto de cetilpiridíneo (10 mM, pH 7.0; Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA), mantidos por 15 min, para a dissolução dos nódulos mineralizados. A absorbância da solução resultante foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 560 nm (análise quantitativa). Os dados de absorbância foram transformados em porcentagem do controle negativo e o ensaio foi realizado em três momentos, como já mencionado nos protocolos anteriores.

4.9 Avaliação da Expressão Gênica (qPCR)

A avaliação da expressão foi realizada após 7 dias (T3) para as MDPC-23 e após 21 dias para as HDPCs (T5), contados a partir de T1. Para a avaliação da expressão gênica foram adicionados controles específicos para essa avaliação e tipo celular. Assim, foi utilizado 1 µg/mL de LPS de *Escherichia coli* (*E.coli*) nas células MDPC-23, e 100 ng/mL de Fator de Necrose Tumoral (TNF) nas HDPCs, os quais foram aplicados diretamente no meio de cultura das células que foram previamente semeadas em placas de 96 compartimentos. Após o período de 24 horas de estímulo, as MDPC-23 foram mantidas em DMEM completo por 7 dias e as HDPCs em α -MEM por 21 dias. As células foram lisadas pela adição de 100 µL da “Lysis/Binding Solution” (Kit RNAqueous®, Ambion, Austin, TX, EUA) e congeladas em alíquotas para posterior extração do RNA (ácido ribonucleico). Os genes de interesse para o presente estudo, cujas proteínas codificadas estão descritas na Tabela 2, estão apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente para as MDPC-23 e para as HDPCs.

A partir das alíquotas congeladas, o RNA total foi isolado utilizando um sistema de colunas de afinidade para o isolamento e purificação dessa fita, incluindo tratamento com DNase (Kit RNAqueous®) com subsequente verificação da pureza e quantidade de RNA em espectrofotômetro UV para microvolumes (Synergy H1 - Take 3, Biotek, Winooski, EUA).

Tabela 2- Proteínas codificadas por cada gene estudado e sua função nos processos biológicos do complexo dentino-pulpar

Gene	Proteína codificada	Função
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Essencial no processo de glicólise e glicogênese, catalisa a fosforilação oxidativa do substrato gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase em 1,3- bifosfoglicerato e também a reação inversa.
IL1B	Interleucina 1-β	Importante mediadora da resposta inflamatória, está envolvida em uma variedade de atividades celulares, incluindo proliferação, diferenciação e apoptose.
ALPL	Fosfatase alcalina	Responsável por catalisar a hidrólise de fosfomonoésteres no tecido intestinal, renal, hepático, placentário, ósseo e dentinário. Está diretamente relacionada ao metabolismo do tecido e é essencial no processo de mineralização.
DSPP	Sialofosfoproteína da dentina	Crítica para formação e mineralização do tecido dentinário. Para exercer sua função é clivada em três formas funcionais: DSP (sialoproteína da dentina), DGP (glicoproteína da dentina) e DPP (fosfoproteína da dentina).
MMP2	Metaloproteinase de Matriz 2 (MMP-2) (gelatinase)	Degrada o colágeno na sua forma nativa ou denaturada, desempenha um papel importante na angiogênese e neovascularização.
MMP9	Metaloproteinase de Matriz 9 (MMP-9) (gelatinase)	Degrada fragmentos de colágeno, regula a migração de neutrófilos através da membrana basal, desempenha um papel importante na angiogênese, neovascularização e reparação tecidual.

Fonte: elaboração própria.

Tabela 3. Gene, código de ensaio e especificações dos conjuntos de primers/sonda TaqMan utilizados nas reações de RT-qPCR para MDPC-23.

Gene	Cód. Ensaio	Acession #	Cobertura (exons)	Amplicon (pb)
<i>Gapdh</i>	Rn01775763_g1	NM_017008.4	8-8	174
<i>Il1b</i>	Rn00580432_m1	NM_031512.2	5-6	74
<i>Alpl</i>	Rn01516028_m1	NM_013059.1	9-10	68
<i>Dspp</i>	Rn02132391_s1	NM_012790.2	4-4	87
<i>Mmp2</i>	Rn6422	NM_031054.2	2-3	63
<i>Mmp9</i>	Rn10209	NM_031055.1	12-13	72

Fonte: Dados obtidos no site do fabricante: <https://www.thermofisher.com>

Tabela 4. Gene, código de ensaio e especificações dos conjuntos de primers/sonda TaqMan utilizados nas reações de RT-qPCR para células HDPCs.

Gene	Cód. Ensaio	Acession #	Cobertura (exons)	Amplicon (pb)
GAPDH	Hs02788624_g1	NM_002046.5	3-4	157
IL1B	Hs01555410_m1	NM_000576.2	3-4	91
ALPL	Hs01029144_m1	NM_000478.5	7-8	79
DSPP	Hs00171962_m1	NM_014280.3	-	67
MMP2	Hs01548727_m1	NM_001127891.3	2-3	65
MMP9	Hs00234579_m1	NM_004994.2	12-13	54

Fonte: Dados obtidos no site do fabricante: <https://www.thermofisher.com>

A síntese de cDNA foi realizada utilizando 300 ng de RNA total por meio de primers random hexamers e moloney leukemia vírus reverse transcriptase, segundo as instruções do fornecedor do kit (High CapacityRT kit, Applied

Biosystems, Foster City, CA, EUA). A reação de PCR quantitativo foi realizada utilizando conjuntos de primers e sondas pré-desenhados (Gene expression assays, Applied Biosystems) para detecção dos genes-alvo: IL1B, ALPL, DSPP, DMP1, MMP2, MMP9 e do gene constitutivo (GAPDH) por meio do sistema TaqMan (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems) com o equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems) e utilizando as condições de ciclagem otimizadas pelo fabricante (10 min a 95°C para desnaturação inicial, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 min a 60°C). Os valores cycle threshold (Ct) de cada poço foram calculados pelo software da termocicladora e analisados pelo método Ct. Os resultados foram normalizados pela expressão do gene constitutivo e expressos como $\Delta\Delta Ct$ em relação ao controle.

4.10 Ensaio de Resistência Máxima à Tração da Matriz Dentinária

Vinte e cinco molares humanos hígidos foram selecionados para o desenvolvimento desse protocolo. Um disco de 1,0 mm de espessura foi obtido do terço médio da coroa de cada dente por meio de cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA) equipada com disco diamantado de 0,3 mm de espessura (Diamond Wafering Blade, Buehler Ltd.), sob irrigação constante. Em seguida, esses discos foram seccionados em espécimes com dimensões de 1,0mmx1,0mmx5,0mm (n=50 espécimes). As dimensões de todos os espécimes foram averiguadas com paquímetro digital com resolução de 0,01 mm (Mod. 500-144b, Mytutoyo Sul Americana Ltda., SP, Brasil) e então foram armazenados em placa de 96 compartimentos, em solução timol 0,1% e refrigeração à 4 °C, até a sua utilização.

4.10.1 Obtenção das matrizes de dentina

Todos os espécimes foram completamente desmineralizados em ácido fosfórico a 10% (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA), por 24 horas sob agitação constante em temperatura de 4°C. Para tanto, cinco espécimes foram inseridos em um tubo falcon contendo 10 mL de solução de ácido fosfórico à 10%. Os tubos foram posicionados em homogeneizador rotatório de soluções (Phoenix-Luferco, Araraquara, São Paulo, Brasil) e permaneceram sobre agitação por 24

horas em refrigerador à 4°C. Decorrido esse período, o ácido fosfórico foi substituído por 10 mL de água deionizada e os tubos voltaram a ser agitados por 30 min em temperatura de 4°C. Essa lavagem foi repetida 4 vezes, com troca da água deionizada a cada 30 min, totalizando 2 horas de lavagem.

4.10.2 Tratamento da matriz dentinária

Os espécimes foram tratados com as soluções apresentadas na Tabela 5. Para tanto, cada espécime foi removido do seu recipiente de armazenamento, levemente seco com papel absorvente e colocado individualmente em eppendorf. Em seguida, foram imersos em 2 mL da solução de tratamento durante 60 segundos, sob agitação constante, seguindo com a lavagem com água deionizada também por 60 segundos e secagem com papel absorvente para a remoção do excesso de água. Por fim, o espécime foi preparado para a análise da resistência máxima à tração.

Tabela 5. Soluções utilizadas para o tratamento da matriz de dentina

Grupos (n=10)	Solução de tratamento da matriz de dentina
C	Água deionizada (controle)
ACR 0,02%	Acroleína 0,02%
ACR 0,01%	Acroleína 0,01%
ACR 0,005%	Acroleína 0,005%
GD	Glutaraldeído 5%

Fonte: elaboração própria.

4.10.3 Ensaio mecânico de tração

Concluídos os tratamentos, cada espécime foi fixado em um dispositivo metálico com adesivo de cianoacrilato (Super Bonder Gel e Ativador 7456, Henkel Loctite Ltda., São Paulo, Brasil). Em seguida, o espécime foi reidratado com água deionizada por 5 minutos antes que o dispositivo metálico fosse adaptado à máquina de ensaios mecânicos para o teste de tração com célula de carga de capacidade máxima de 100 N, a uma velocidade de 1,0 mm/min. Os movimentos

de tração foram iniciados por meio de um programa computadorizado específico (Tesc-Test Script, EMIC Equipamentos de ensaio Ltda., São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) até que o espécime fosse rompido, e os valores de carga máxima registrados (N) foram divididos pela área de cada espécime (mm²) para a obtenção dos valores de resistência máxima à tração em megapascal (MPa).

4.11 Ensaio Mecânico de Microtração da União Resina-Dentina

Para este ensaio inicialmente foram obtidas superfícies planas de dentina (4.11.1), o tratamento da dentina condicionada e procedimentos adesivos (4.11.2), a obtenção dos espécimes para o ensaio mecânico de microtração e a análise do tipo de fratura (4.11.3).

4.11.1 Obtenção de superfícies planas de dentina

Para esta etapa foram utilizados 40 terceiros molares humanos. Com auxílio de um disco diamantado acoplado a uma cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buheler, Lake Bluff, IL, EUA), a metade oclusal da coroa dentária foi removida por meio de um corte no sentido transversal da coroa, resultando em uma superfície plana de dentina, circundada em sua periferia por esmalte. Essa superfície foi examinada em lupa estereoscópica (Modelo SZX7, Olympus, São Paulo, Brasil) para ratificar a inexistência de restos de esmalte dentário sobre a dentina. Quando o esmalte ainda permanecia recobrendo alguma área da dentina, a superfície era manualmente desgastada com lixa de carbetto de silício de granulação 320 e novamente inspecionada na lupa até que todo esmalte tivesse sido removido.

4.11.2 Tratamento da dentina condicionada e procedimentos adesivos

As superfícies de dentina foram condicionadas com ácido fosfórico 35% (Ultradent Products INC, South Jordan, Utah, EUA), durante 15 s, seguido de lavagem abundante com *spray* ar/água por 10 segundos e secagem com papel absorvente para a manutenção da superfície de dentina úmida. A dentina condicionada foi tratada com uma das seguintes soluções (n=10): água deionizada (controle), acroleína nas concentrações 0,01%, 0,005% ou

glutaraldeído 5%. Vinte microlitros (20 µL) da solução foram aplicados sobre a superfície de dentina condicionada com ácido fosfórico, com auxílio de uma pipeta. A solução foi mantida sobre a superfície por 60 segundos, sem agitação, quando então foi lavada com 5 mL de água deionizada. O excesso de umidade foi removido com papel absorvente e a superfície de dentina foi mantida úmida.

O sistema adesivo Single Bond 2 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) foi aplicado com auxílio de um microbrush saturado do produto, em seguida a área foi seca com jato de ar (80 psi) por 5 segundos a uma distância de 10 cm, e então foi aplicada mais uma camada do produto de maneira ativa por 15 segundos e novamente seca por mais 5 segundos. Em seguida, foi fotoativado por 10 segundos por meio do aparelho de luz LED Valo Cordless (Ultradent, South Jordan, Utah, EUA), cuja irradiância foi avaliada com auxílio de um radiômetro (2000 mW/cm²; Kerr Corporation, Orange, CA, EUA,) imediatamente antes de seu uso. Finalizada a aplicação do sistema adesivo, foi confeccionado um bloco de resina composta (Filtek Z350, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) na cor A 3,5, pela aplicação de três incrementos de 1 mm, os quais foram individualmente fotoativados por 20 segundos. Os dentes restaurados foram então armazenados por 24 horas imersos em água deionizada, à 37°C. Dos dez dentes preparados para cada grupo, oito foram utilizados para o ensaio mecânico de microtração, enquanto os 2 dentes restantes foram preparados a análise de nanoinfiltração.

4.11.3 Obtenção dos espécimes e ensaio mecânico de microtração

Cada dente restaurado foi fixado em base de madeira com auxílio de godiva de baixa fusão e levado a cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA) para ser seccionado transversalmente na altura do primeiro terço radicular com disco diamantado de 0,3 mm de espessura (Diamond Wafering Blade, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA), sob constante irrigação. Em seguida, a porção coronária foi posicionada na máquina de tal forma que a interface adesiva ficasse perpendicular a face de corte do disco diamantado. Cortes seriados com 0,9 mm de espessura foram realizados, iniciando-se junto a uma das faces proximais até a face oposta. Após rotação do dente em 90°, uma nova série de cortes foi feita, também com 0,9 mm de espessura. Ao final, os espécimes obtidos tinham a forma de paralelogramos (palitos) com área

transversal de secção de $0,81 \text{ mm}^2$. Todos os espécimes foram inspecionados em lupa estereoscópica com 30 vezes de aumento. Aqueles que apresentaram defeitos como bolhas ou irregularidades nas proximidades da união resina-dentina foram excluídos da amostra. Os espécimes selecionados foram individualmente mensurados com paquímetro digital (Mod. 500- 144b, Mytutoyo Sul Americana Ltda., SP, BR), com resolução de $0,01 \text{ mm}$, para determinação da área de secção transversal (mm^2).

O ensaio mecânico de microtração foi realizado em máquina de ensaios mecânicos (DL-Digital Line, EMIC, Paraná, Brasil) ajustada para forças de tração com célula de carga de capacidade máxima de 100 N . Os espécimes foram individualmente fixados a um dispositivo metálico com adesivo de cianoacrilato associado a um acelerador à base de cianoacrilato (Super Bonder Gel e Ativador 7456, Henkel Loctite Ltda, São Paulo, Brasil). Este dispositivo metálico foi adaptado à máquina de ensaios mecânicos para o teste de microtração, com velocidade de $1,0 \text{ mm/min}$. Os movimentos de tração foram iniciados por meio de um programa computadorizado específico (Tesc-Test Script, EMIC Equipamentos de ensaio Ltda., São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) até que o espécime foi rompido, e os valores de carga máxima registrados (N) foram divididos pela área de cada espécime (mm^2) para a obtenção dos valores em megapascal (MPa). A média dos valores de resistência de união dos espécimes pertencentes ao mesmo dente foi calculada e o dente foi considerado como unidade experimental ($n=8$).

4.11.4 Análise do tipo de fratura

Imediatamente após o ensaio mecânico de microtração, as metades obtidas para cada espécime foram armazenadas em recipientes devidamente identificados, em 100% de umidade, até a leitura do tipo de fratura. A análise foi realizada em estereomicroscópio (Mod. SZX7, Olympus, São Paulo, Brasil), em aumentos que permitiam a classificação das fraturas em: adesiva, mista, coesiva em dentina ou coesiva em resina. As leituras foram repetidas após um intervalo mínimo de 7 dias, e o coeficiente de reprodutibilidade foi igual a 80% ($Kappa \geq 0,8$). Os dados foram apresentados graficamente como valores absolutos e porcentagens e submetidos ao teste exato de Fisher.

4.12 Análise da Nanoinfiltração

O protocolo de nanoinfiltração seguido de análise em MEV foi realizado após 24 horas do estabelecimento da união resina-dentina, conforme descrito por Tay et al. (2002)¹¹⁵. Foram obtidas duas fatias da região central de cada dente (n=4). As fatias foram lavadas por 2 min em água deionizada e imersas em solução amoniacal marcadora de nitrato de prata (pH = 9,5) por 24 horas, na ausência de luz. Posteriormente, esses espécimes foram cuidadosamente enxaguados com água deionizada por 60 s e imersos em solução reveladora (Revelador Kodak, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) por 8 horas sob uma luz fluorescente, resultando na redução dos íons prata em grãos de prata metálicos no interior dos espaços vazios presentes ao longo da interface adesiva. Após essa etapa, os espécimes foram novamente lavados em água deionizada por 60 s e polidos com sequência de lixa de carbetto de silício com granulações de 400, 600, 800, 1200, 2400 e 4000, seguido da desidratação e análise em microscópio eletrônico de varredura utilizando um detector de elétrons retroespalhados (MEV, DSM 960, Zeiss, West German). Imagens com $\times 1500$ de aumento foram obtidas da união resina-dentina.

4.13 Análise Estatística

O conjunto de dados das variáveis resposta (viabilidade celular, atividade de ALP, nódulos mineralizados, expressão gênica, resistência máxima a tração da matriz dentinária e resistência da união resina-dentina) apresentaram distribuição normal (Kolmogorov-Smirnov, $p > 0,05$) e homogeneidade de variâncias (Levene, $p > 0,05$). Assim, esses dados foram submetidos ao teste estatístico de análise de variância (ANOVA) a um critério fixo, seguido pelo teste de Tukey para comparação dos grupos aos pares. A possível associação entre o tratamento da dentina condicionada e o tipo de fratura foi avaliada pela aplicação do teste exato de Fisher. Todos os testes foram realizados com o software Graphpad Prism®, versão 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), considerando-se o nível de significância de 5% para as inferências estatísticas.

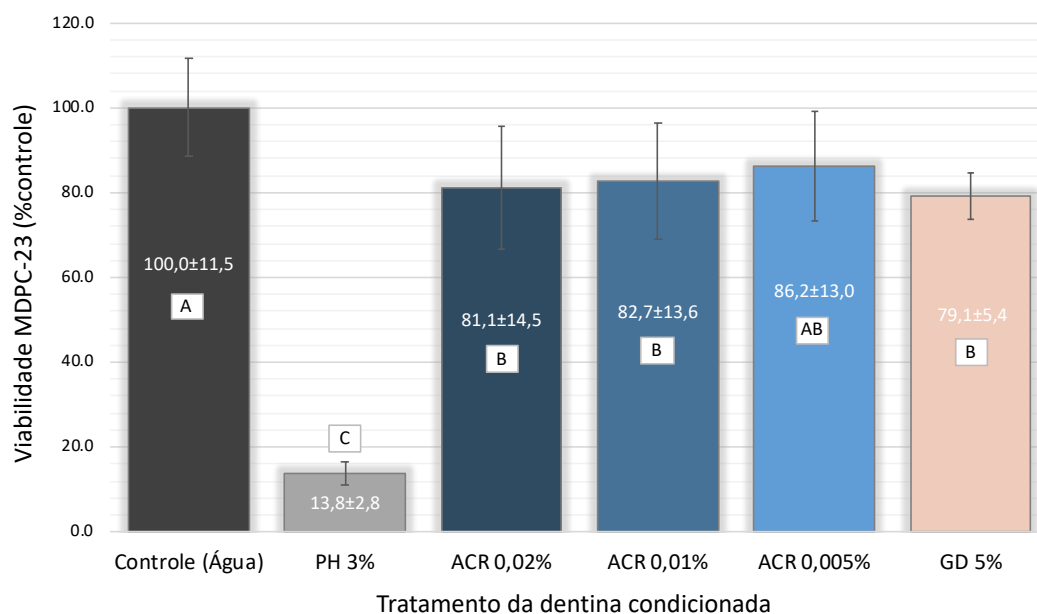
5 RESULTADOS

Este capítulo será apresentado nos seguintes tópicos: (5.1) Viabilidade Celular, (5.2) Atividade de ALP, (5.3) Presença de Nódulos de Mineralização, (5.4) Expressão gênica. (5.5) Resistência máxima à tração da matriz dentinária, (5.6) Resistência da União Resina-Dentina, (5.7) Distribuição dos tipos de fratura e (5.8) Nanoinfiltração e MEV.

5.1 Viabilidade Celular

A viabilidade das células MDPC-23 aderidas na superfície pulpar do disco de dentina, após 24 horas da aplicação de ACR, GD ou peróxido de hidrogênio 3% sobre a dentina condicionada com ácido fosfórico, está representada na Figura 6. Com exceção da ACR 0,005%, todos os demais tratamentos resultaram em redução significativa da viabilidade celular em comparação ao grupo controle. A redução da viabilidade variou de 13,8% (ACR 0,005%) a 86,2% (peróxido de hidrogênio 3%).

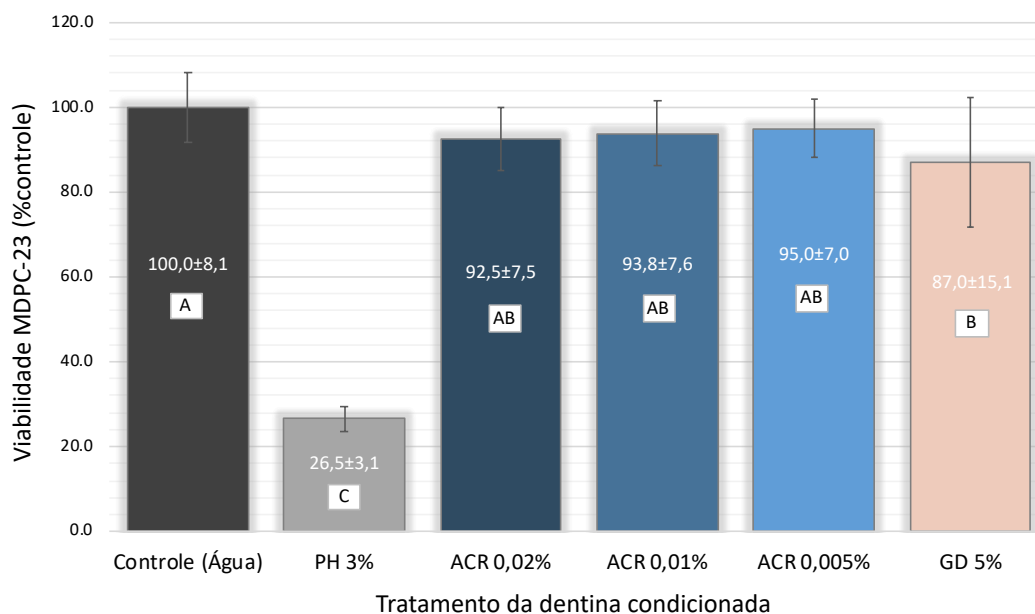
Figura 6 - Viabilidade das células MDPC-23 aderidas ao disco de dentina de 0,4 mm de espessura, 24 horas após a aplicação das soluções de tratamento sobre a dentina condicionada com ácido fosfórico



Colunas representam médias e barras de erro representam desvios-padrões, n=9. Colunas identificadas por letras iguais não diferem estatisticamente (Tukey, $p > 0,05$). PH: peróxido de hidrogênio; ACR: acroleína; GD: glutaraldeído.
Fonte: elaboração própria.

Quando avaliada a viabilidade das MDPC-23 (Figura 7) e HDPCs (Figura 8) cultivadas em placa de 96 poços e estimuladas pelo extrato por 24 horas, foi observado que apenas os extratos produzidos pela aplicação de GD e peróxido de hidrogênio sobre a dentina condicionada resultaram em redução significativa dessa viabilidade em comparação ao controle. Entretanto, mesmo diferindo do controle, a redução promovida pelo extrato contendo GD foi de apenas 13% para as MDPC-23 e 19,5% para as HDPCs.

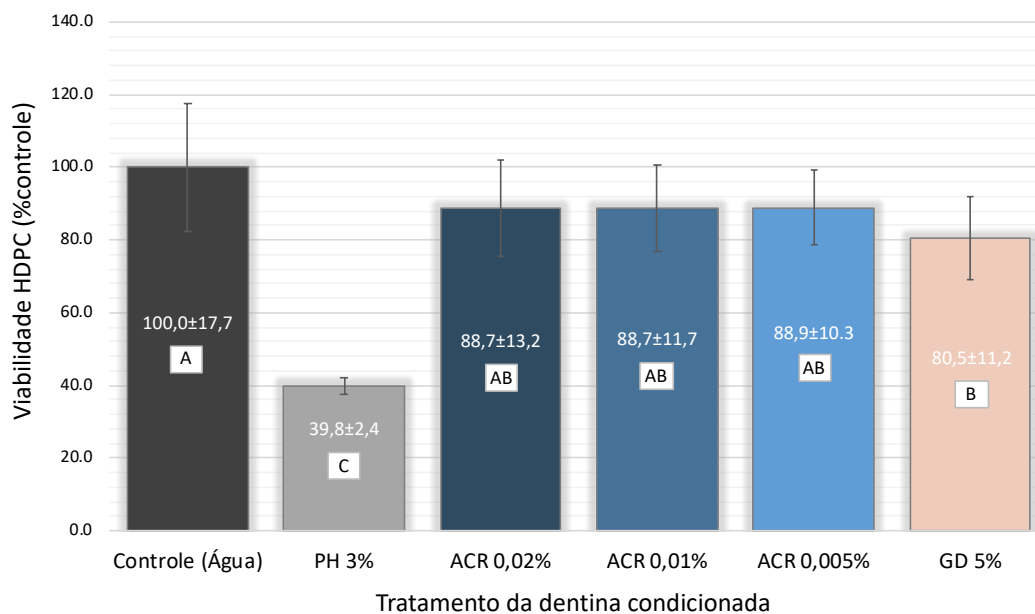
Figura 7 - Viabilidade das células MDPC-23 semeadas em placa de cultura após 24 horas de contato direto com o extrato produzido pela aplicação de ACR, GD ou peróxido de hidrogênio sobre a dentina condicionada com ácido fosfórico



Colunas representam médias e barras de erro representam desvios-padrões, n=9. Colunas identificadas por letras iguais não diferem estatisticamente (Tukey, $p>0,05$). PH: peróxido de hidrogênio; ACR: acroleína; GD: glutaraldeído.

Fonte: elaboração própria.

Figura 8 - Viabilidade das células HDPCs após 24 horas de contato direto com o extrato produzido pela aplicação de ACR, GD ou peróxido de hidrogênio sobre a dentina condicionada com ácido fosfórico



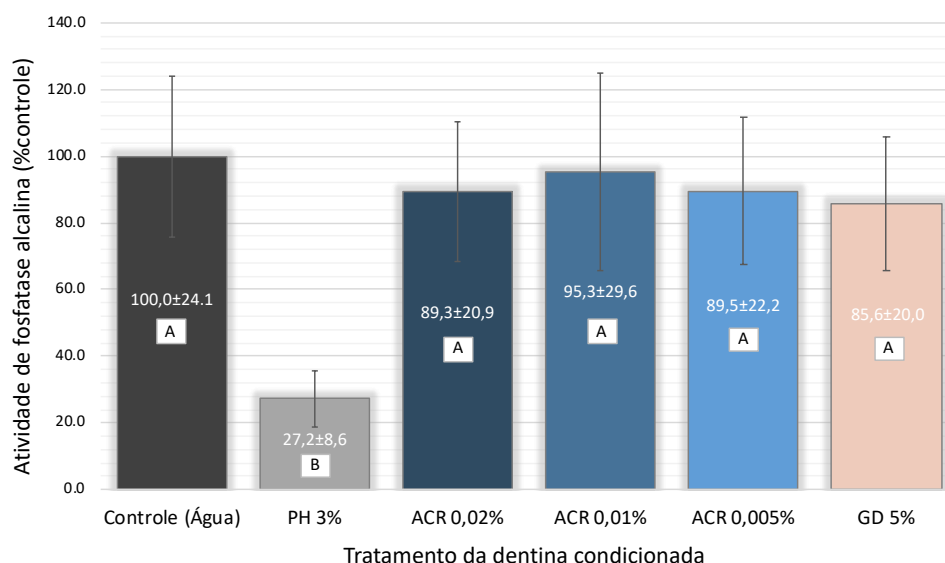
Colunas representam médias e barras de erro representam desvios-padrões, n=9. Colunas identificadas por letras iguais não diferem estatisticamente (Tukey, $p>0,05$). PH: peróxido de hidrogênio; ACR: acroleína; GD: glutaraldeído.

Fonte: elaboração própria.

5.2 Atividade de ALP

A resposta das células MDPC-23 e HDPCs quanto a atividade de ALP está demonstrada nas Figuras 9 e 10, respectivamente. Para ambos os tipos celulares, não houve diferença estatística entre as concentrações de ACR avaliadas ou 5% de GD, em relação ao controle ($p>0,05$). Inversamente, redução significativa da atividade dessa proteína foi observada para o grupo peróxido de hidrogênio, para ambas as linhagens celulares.

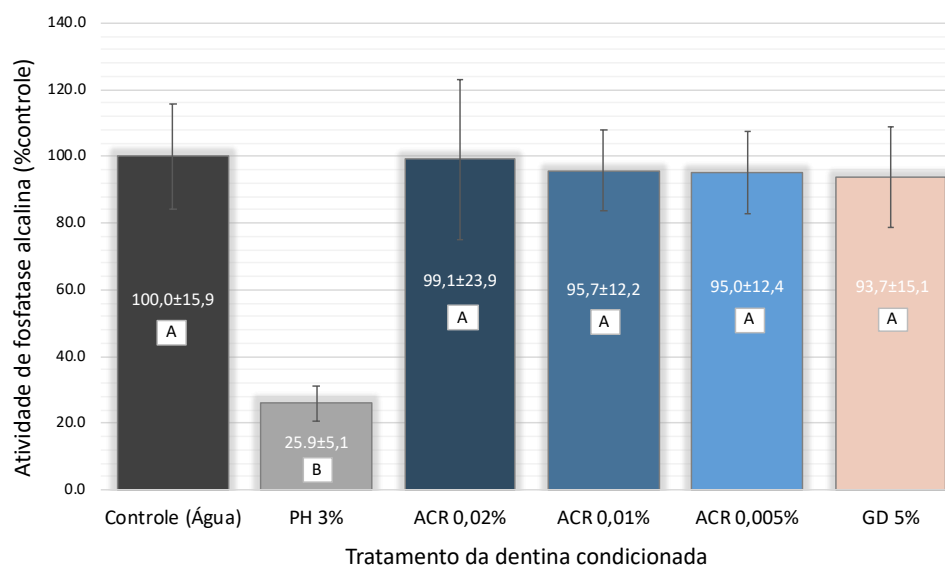
Figura 9 - Atividade de fosfatase alcalina das células MDPC-23 após 5 dias do contato direto com o extrato produzido pela aplicação de ACR, GD ou peróxido de hidrogênio sobre a dentina condicionada com ácido fosfórico



Colunas representam médias e barras de erro representam desvios-padrões, n=9. Colunas identificadas por letras iguais não diferem estatisticamente (Tukey, $p > 0,05$). PH: peróxido de hidrogênio; ACR: acroleína; GD: glutaraldeído.

Fonte: elaboração própria.

Figura 10 - Atividade de fosfatase alcalina das HDPCs após 14 dias do contato direto com o extrato produzido pela aplicação de ACR, GD ou peróxido de hidrogênio sobre a dentina condicionada com ácido fosfórico



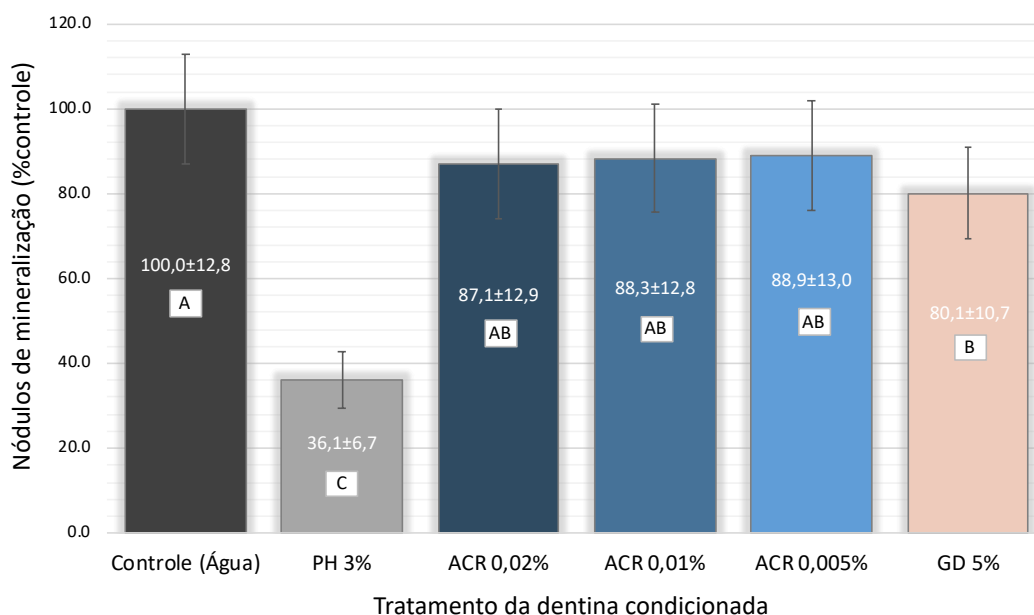
Colunas representam médias e barras de erro representam desvios-padrões, n=9. Colunas identificadas por letras iguais não diferem estatisticamente (Tukey, $p > 0,05$). PH: peróxido de hidrogênio; ACR: acroleína; GD: glutaraldeído.

Fonte: elaboração própria.

5.3 Presença de Nódulos Mineralizados

Os valores relativos à quantificação de nódulos mineralizados para as MDPC-23 em 7 dias e HDPCs em 21 dias após o contato com os extratos estão apresentados nas Figuras 11 e 12 respectivamente. Imagens representativas da presença dos nódulos de mineralização nos períodos de análises podem ser vistas na Figura 13.

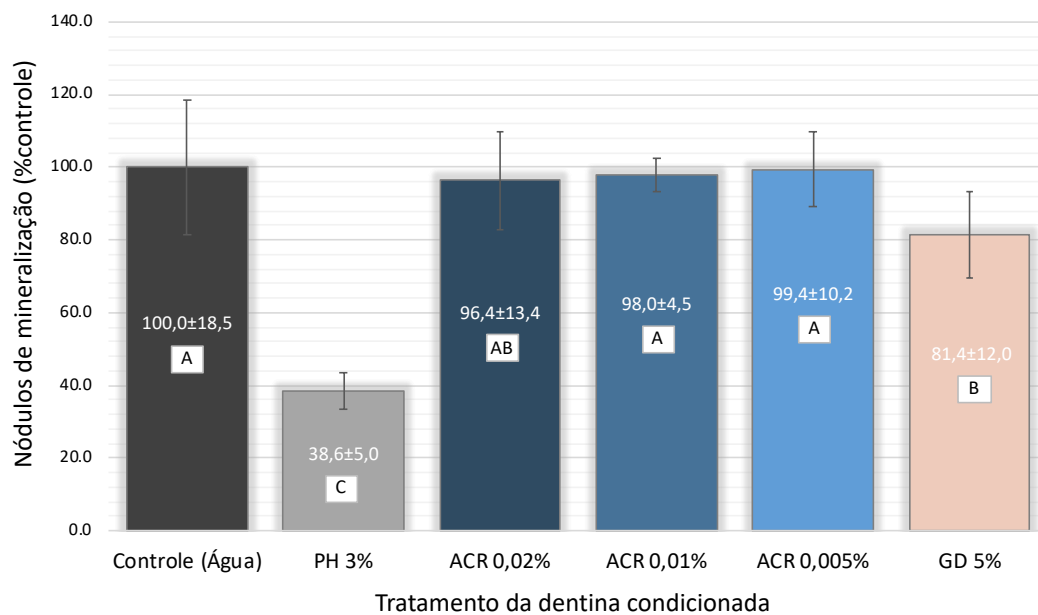
Figura 11 - Nódulos de mineralização da matriz depositada pelas MDPC-23 após 7 dias do contato direto com o extrato produzido pela aplicação de ACR, GD ou peróxido de hidrogênio sobre a dentina condicionada com ácido fosfórico



Colunas representam médias e barras de erro representam desvios-padrões, n=9. Colunas identificadas por letras iguais não diferem estatisticamente (Tukey, $p>0,05$). PH: peróxido de hidrogênio; ACR: acroleína; GD: glutaraldeído.

Fonte: elaboração própria.

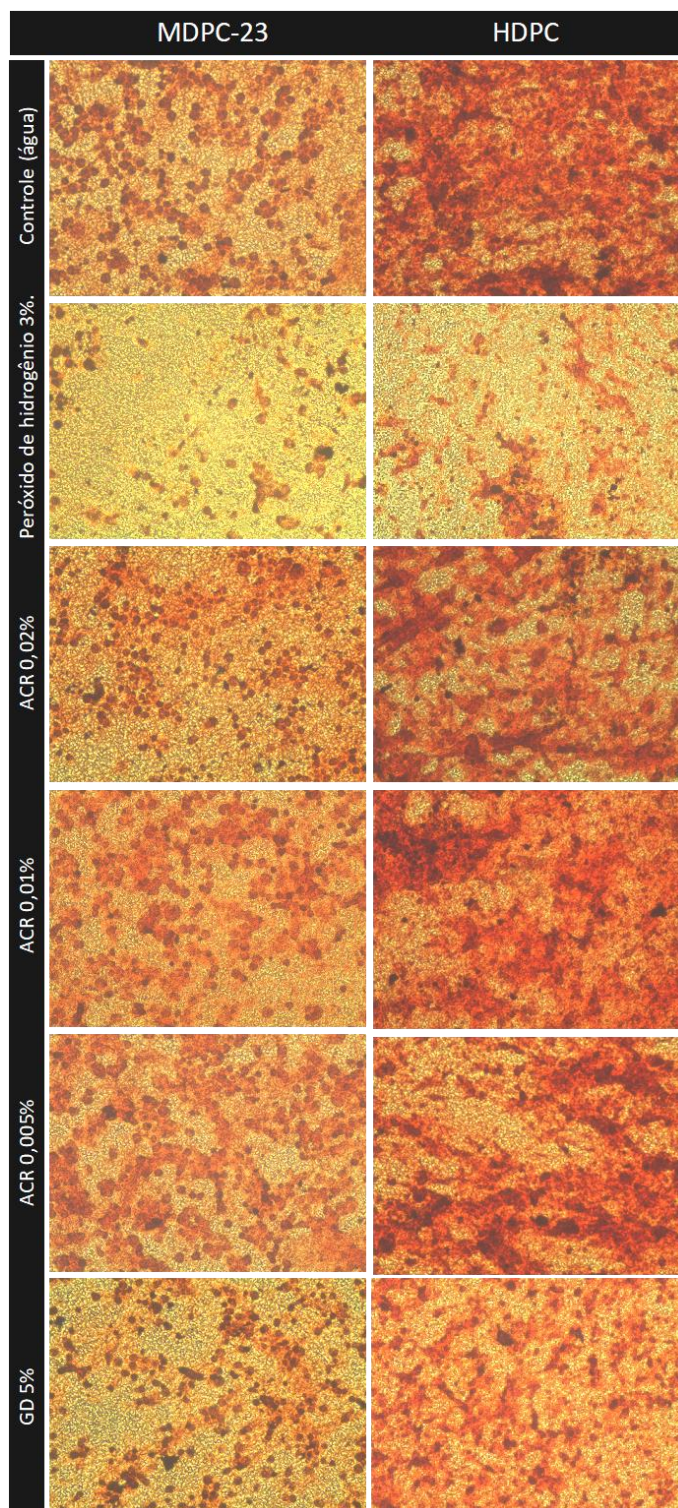
Figura 12 - Nódulos de mineralização da matriz depositada pelas HDPCs após 21 dias do contato direto com o extrato produzido pela aplicação de ACR, GD ou peróxido de hidrogênio sobre a dentina condicionada com ácido fosfórico



Colunas representam médias e barras de erro representam desvios-padrões, n=9. Colunas identificadas por letras iguais não diferem estatisticamente (Tukey, $p>0,05$). PH: peróxido de hidrogênio; ACR: acroleína; GD: glutaraldeído.

Fonte: elaboração própria.

Figura 13 - Imagens obtidas em microscópio de luz invertida evidenciando a presença de nódulos mineralizados, corados por Alizarin red



Essa análise foi realizada após 7 dias do contato das MDPC-23 e 21 dias do contato das HDPCs com os extratos obtidos pela aplicação de acroleína (ACR), glutaraldeído (GD) ou 3% peróxido de hidrogênio sobre a dentina condicionada. Aumento de 4x.

Fonte: elaboração própria.

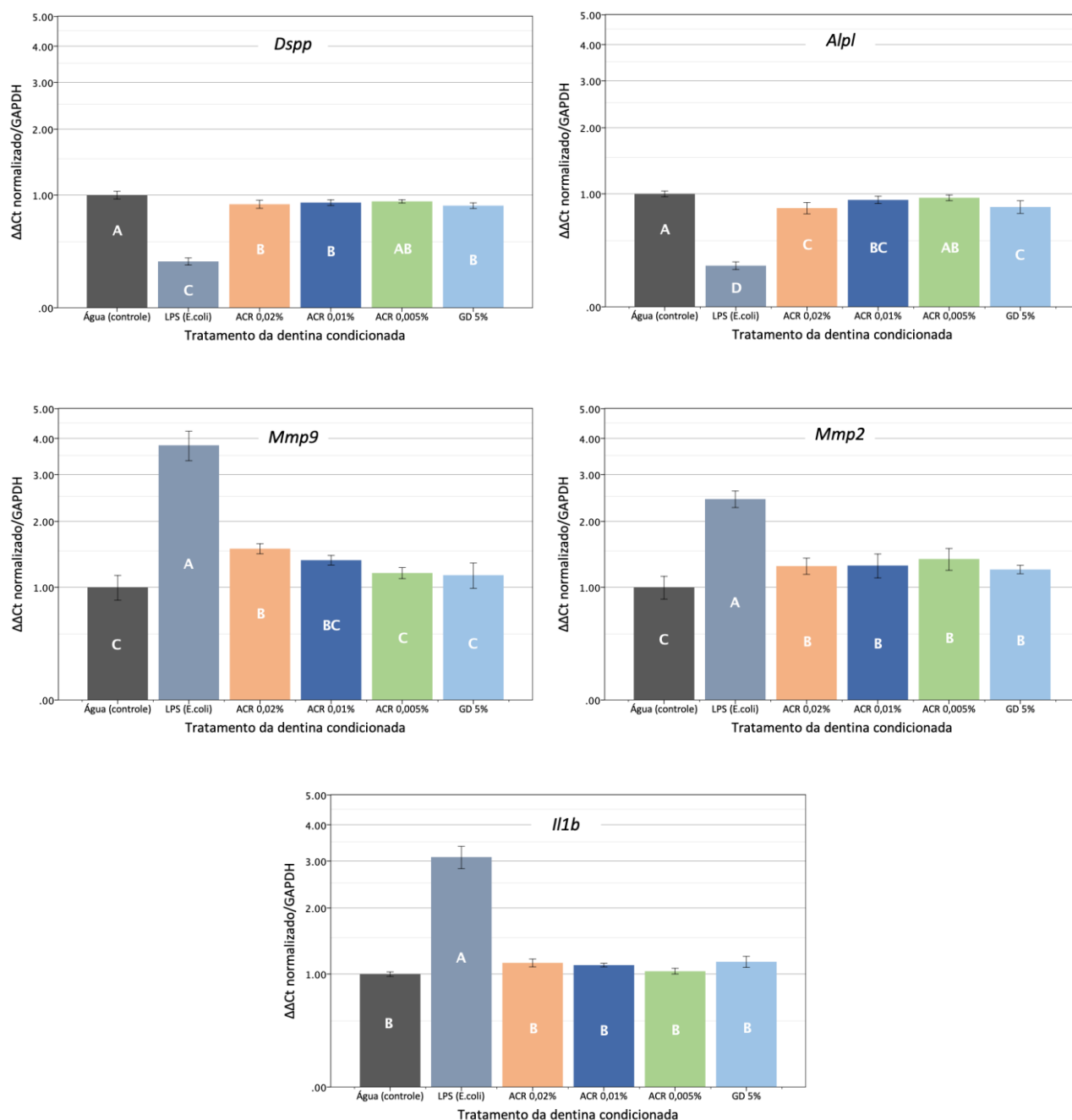
5.4 Expressão Gênica

Os dados de expressão gênica estão apresentados em $\Delta\Delta C_t$ normalizados pelo gene constitutivo GAPDH. Os valores observados para MDPC-23 após 7 dias e HDPCs após 21 dias do contato com os extratos, estão apresentados graficamente nas Figuras 14 e 15, respectivamente. Para as células MDPC-23 foi observado que a expressão de *Dspp* e *Alpl* foram estatisticamente não diferentes do controle água no grupo ACR 0,005%, enquanto nos grupos ACR 0,02%, ACR 0,01% e GD 5% foi menor. Houve ainda um aumento na expressão dos genes *Mmp2* em todos os grupos avaliados e *Mmp9* apenas para ACR 0,02%. Em relação a expressão de *Il1b* não houve diferença estatística entre os grupos experimentais e controle.

Quando analisada a expressão pelas HDPCs dos mesmos genes supracitados, foi observado que a expressão do gene DSPP foi semelhante ao controle água nos grupos ACR 0,01% e 0,005%, enquanto o ACR 0,02% e GD 5% expressaram menos que o controle. Para o ALPL, a expressão nos grupos ACR 0,01% e ACR 0,005% foram estatisticamente não diferentes do controle, enquanto nos demais grupos foi inferior. Observou-se ainda um aumento na expressão para MMP9 em ACR 0,02% e ACR 0,01%, contudo, os grupos ACR 0,005% e GD 5% expressaram de maneira semelhante ao controle. O gene MMP2 foi expresso nos grupos ACR 0,01 e 0,005% de maneira semelhante ao controle, enquanto nos demais grupos a expressão foi estatisticamente maior. Todos os grupos experimentais expressaram o gene IL1B de maneira semelhante ao controle ($p > 0,05$).

O comportamento dos grupos LPS (Figura 14) e TNF (Figura 15) seguiu o padrão esperado, ou seja, redução significativa da expressão de DSPP e ALPL, e superexpressão de MMP2, MMP9 e IL1B, com diferença estatisticamente diferente de todos os demais grupos experimentais.

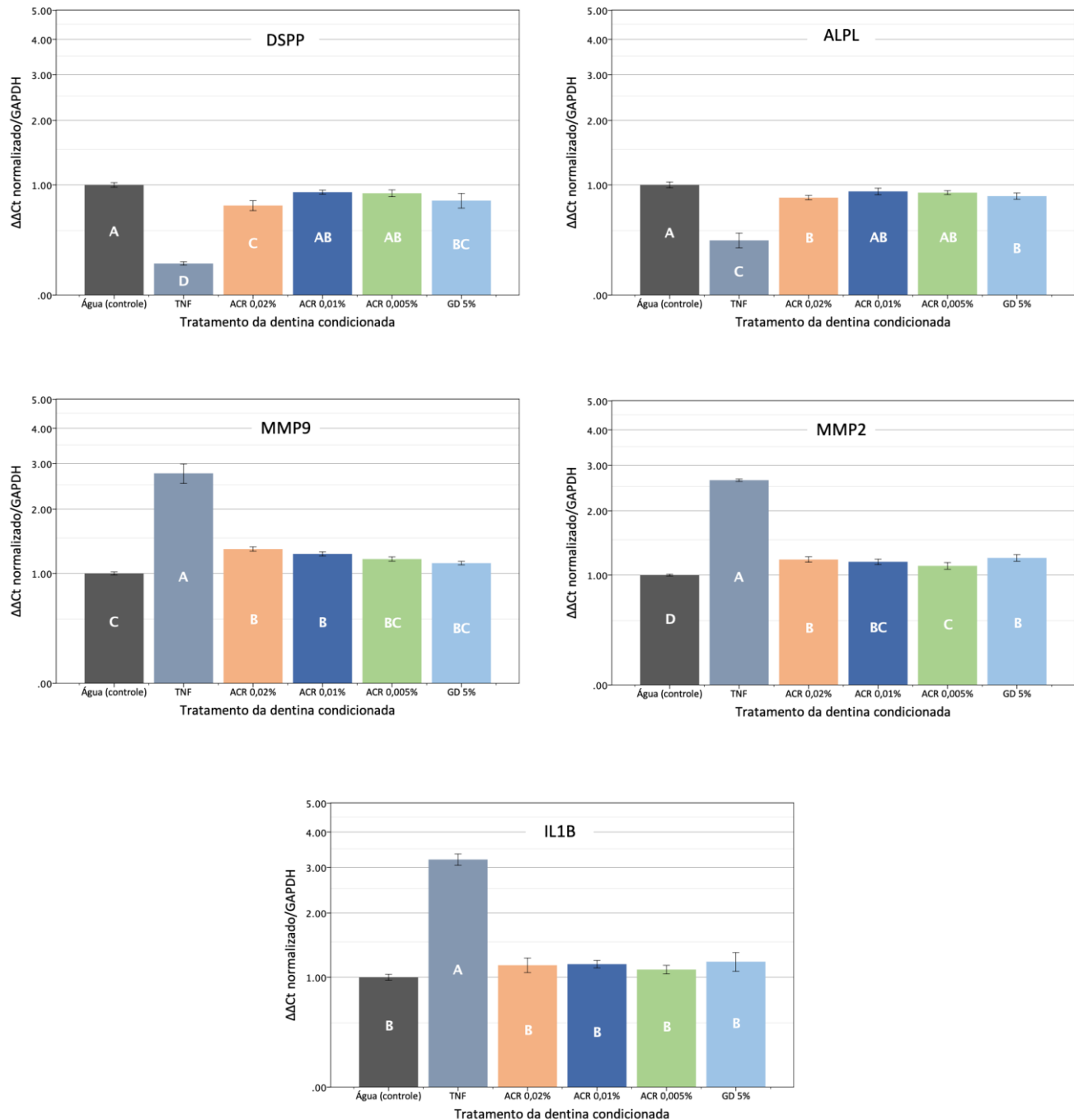
Figura 14 - Expressão gênica de *Dspp*, *Alpl*, *Mmp2*, *Mmp9* e *Il1b* em MDPC-23 após 7 dias do contato com os extratos produzidos pela aplicação de ACR ou GD sobre a dentina condicionada. O grupo LPS representa células que foram mantidas em meio de cultura contendo esse produto bacteriano e foi delineado como controle positivo



Colunas representam médias e barras de erro representam desvios-padrões, n=9. Colunas identificadas por letras iguais não diferem estatisticamente (Tukey, $p>0,05$). LPS: lipopolissacarídeo; ACR: acroleína; GD: glutaraldeído.

Fonte: elaboração própria.

Figura 15 - Expressão gênica de DSPP, ALPL, MMP2, MMP9 e IL1B em HDPCs após 21 dias do contato com os extratos produzidos pela aplicação de ACR, GD ou LPS na dentina condicionada. O grupo TNF representa células que foram mantidas em meio de cultura contendo esse fator e foi delineado como controle positivo



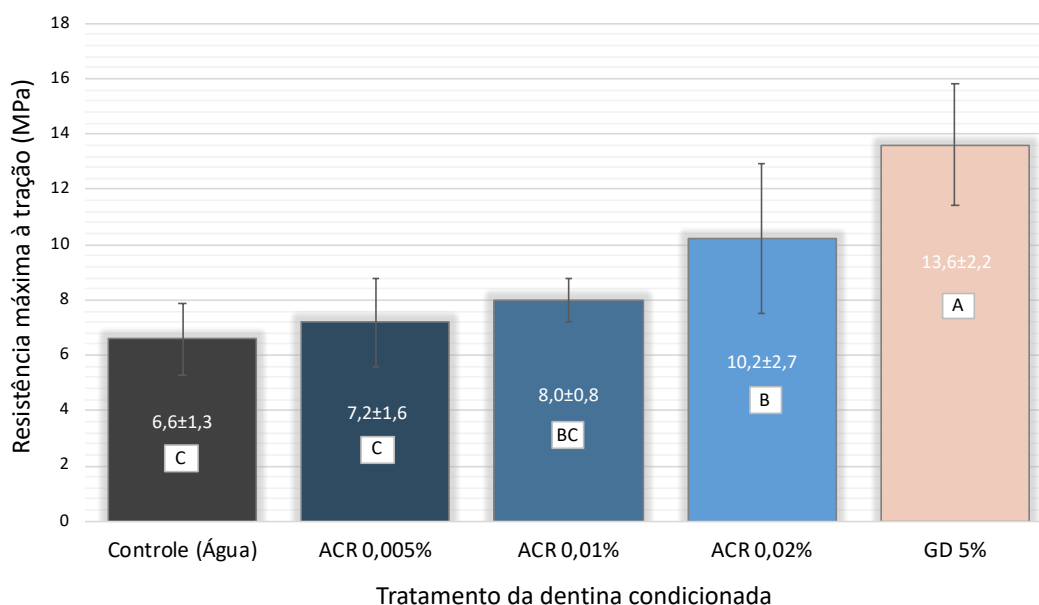
Colunas representam médias e barras de erro representam desvios-padrões, n=9. Colunas identificadas por letras iguais não diferem estatisticamente (Tukey, $p>0,05$). TNF: fator de necrose tumoral; ACR: acroleína; GD: glutaraldeído.

Fonte: elaboração própria.

5.5 Resistência Máxima à Tração da Matriz Dentinária

Os valores de resistência máxima a tração (RMT) da matriz dentinária em função da substância utilizada para a biomodificação do colágeno estão apresentados na Figura 16. Aumento significativo da RMT foi observado apenas após o tratamento com ACR 0,02% e GD 5%.

Figura 16 - Resistência máxima à tração da matriz de dentina (MPa) após biomodificação da dentina com diferentes concentrações de ACR ou GD 5%.



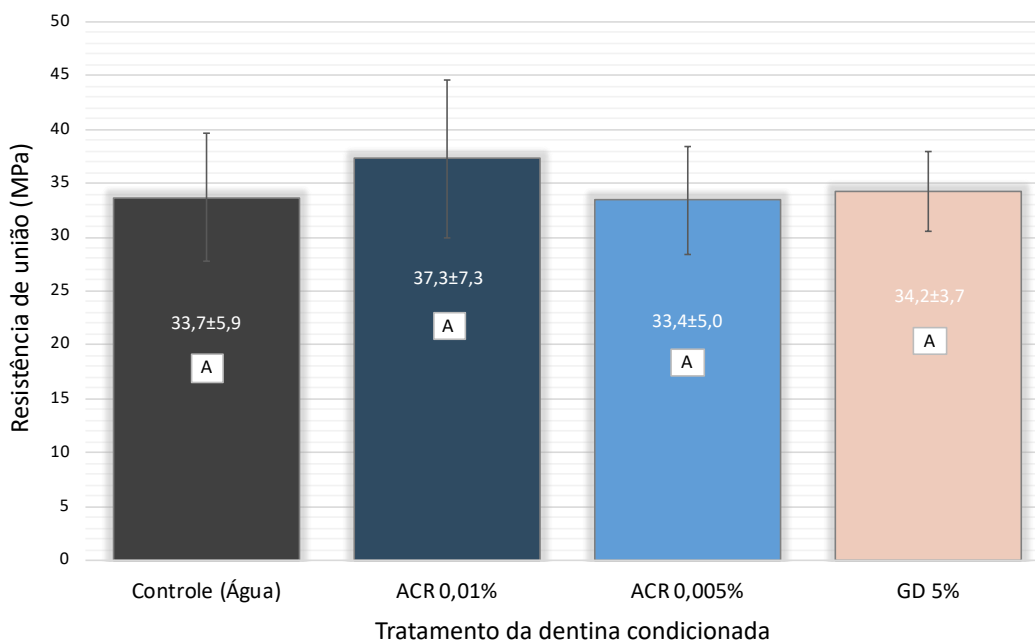
Colunas representam médias e barras de erro representam desvios-padrões, n=8. Colunas identificadas pela mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey, p>0,05). ACR: acroleína; GD: glutaraldeído.

Fonte: elaboração própria.

5.6 Resistência da União Resina-Dentina

Na Figura 17 estão apresentados os valores de resistência da união do sistema adesivo Single Bond 2 aplicado sobre a dentina condicionada com ácido fosfórico e biomodificada com diferentes concentrações de acroleína ou com glutaraldeído. Nenhum dos tratamentos interferiu com os valores de resistência de união imediata, os quais foram comparáveis ao grupo controle, ou seja, sem biomodificação do colágeno.

Figura 17 - Resistência de união imediata (MPa) após aplicação do sistema adesivo Single Bond 2 sobre a dentina condicionada e tratada com diferentes concentrações ACR ou GD 5%



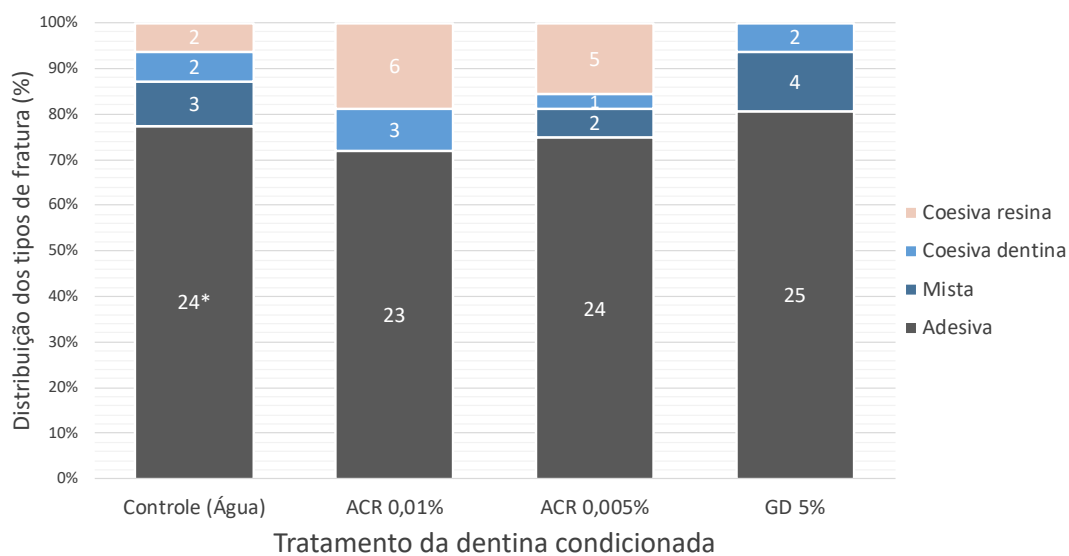
Colunas representam médias e barras de erro representam desvios-padrões, n=8. Colunas identificadas pela mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey, $p>0,05$). ACR: acroleína; GD: glutaraldeído.

Fonte: elaboração própria.

5.7 Distribuição dos Tipos de Fratura

As duas metades dos espécimes tracionados foram examinadas em estereomicroscópio e a distribuição dos tipos de fratura observados para cada tratamento da dentina condicionada está apresentada na Figura 18. Fraturas adesivas foram as predominantes no grupo controle 77,4%. Esse fenômeno se repetiu quando a dentina foi biomodificada com ACR 0,01% (71,8%), ACR 0,005% (75%) e GD (80,6%). Fraturas coesivas em resina não foram observadas apenas para o grupo GD. O teste exato de Fisher revelou não haver associação entre o tratamento da dentina e o tipo de fratura ($p=0,218$).

Figura 18 - Distribuição das fraturas em função do tipo de tratamento da dentina condicionada com ácido fosfórico



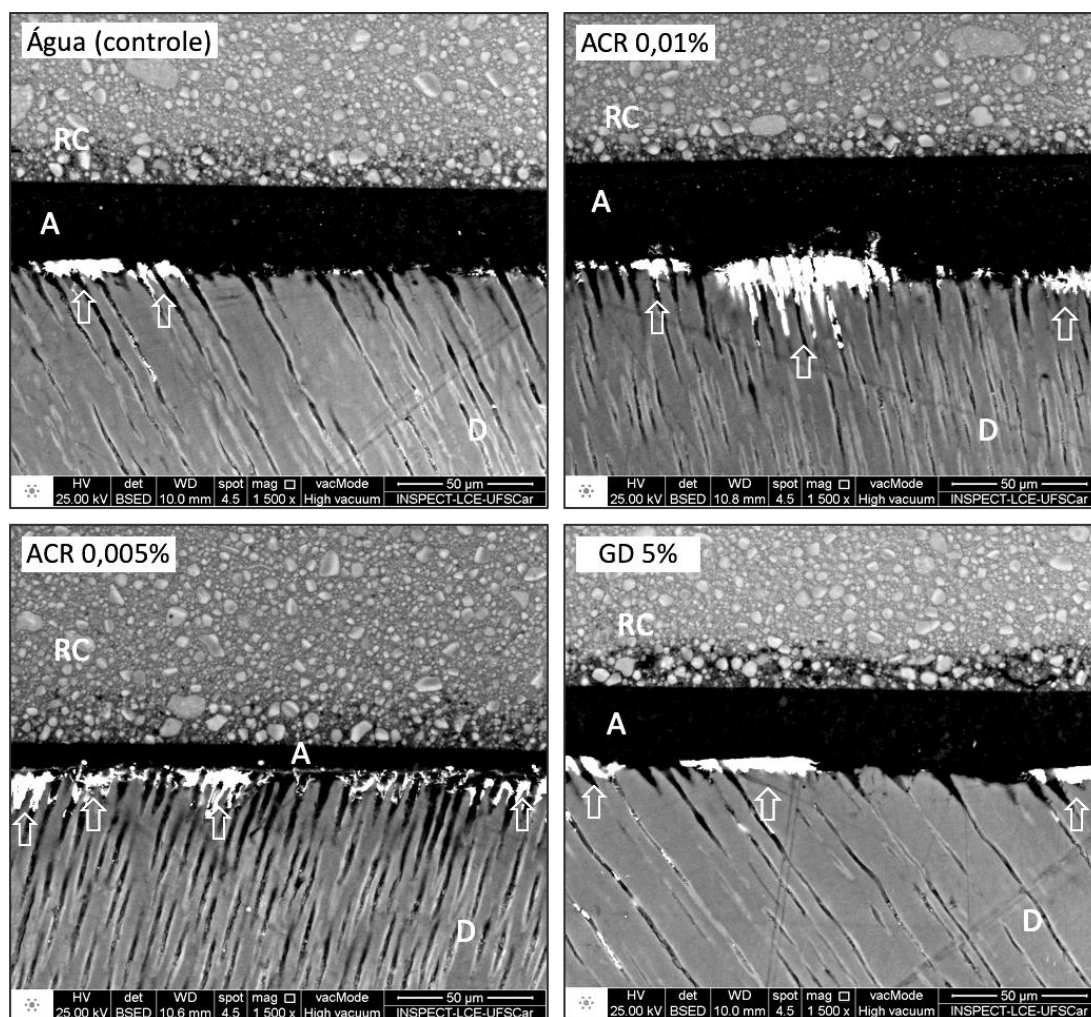
*Números incluídos nas colunas representam valores absolutos (Teste exato de Fisher, $p=0,218$). ACR: acroleína; GD: glutaraldeído.

Fonte: elaboração própria.

5.8 Nanoinfiltração e MEV

Fotomicrografias representativas da infiltração de íons prata nas interfaces produzidas pela aplicação do adesivo Single Bond 2 em superfícies de dentina tratadas com água (grupo controle), ACR 0,01%, ACR 0,005% ou GD 5% estão apresentadas na Figura 19. Nanoinfiltração foi observada em todas as interfaces, assim, a biomodificação do colágeno dentinário previamente a aplicação do sistema adesivo não favoreceu a formação de camadas híbridas menos defeituosas.

Figura 19 - Fotomicrografias em MEV de interfaces produzidas sobre a dentina condicionada e tratada com água (controle), acroleína (ACR) ou glutaraldeído (GD) previamente a aplicação do sistema adesivo Single Bond 2.



RC: resina composta; A: adesivo; D: dentina; seta: presença de íons prata. x1.500

Fonte: elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Os túbulos dentinários configuram vias de difusão de substâncias até o tecido pulpar³⁵ e, portanto, quando indicadas para aplicação direta sobre a dentina, essas substâncias devem ser avaliadas quanto ao seu potencial tóxico sobre as células pulpares. No presente estudo, a citotoxicidade da acroleína, um novo *cross-linker* utilizado como estratégia anti-degradação da camada híbrida³¹, foi avaliada em um modelo de barreira dentinária que simulou um desafio extremo. A espessura dos discos de dentina foi de 0,4 mm, ou seja, inferior aos 0,5 mm considerados seguro para a proteção do tecido pulpar frente à difusão de componentes liberados de materiais dentários^{114,116}. Entretanto, mesmo sendo aplicada sob essa condição desafiadora, as diferentes concentrações de acroleína não apresentaram toxicidade sobre ambas as linhagens celulares, células odontoblastóides MDPC-23 e células da polpa dental humana (HDPCs).

A fim de aproximar as condições experimentais deste estudo *in vitro* de um modelo *in vivo*, foram utilizados dois tipos de células. MDPC-23 são células odontoblastóides imortalizadas¹¹⁷ que foram semeadas sobre a parede pulpar dos discos de dentina para simular a camada de odontoblastos do tecido pulpar. HDPCs, por outro lado, representam células da zona rica em células, entre elas, as células tronco pulpares. Os odontoblastos são as primeiras células a entrarem em contato com substâncias capazes de difusão via túbulos dentinários e a resposta celular está diretamente relacionada com a toxicidade dessas substâncias. No presente estudo, a viabilidade das MDPC-23 semeadas diretamente no disco de dentina foi reduzida em cerca de 19%, 17%, 14% e 21% para a ACR 0,02%, ACR 0,01%, ACR 0,005% e GD 5%, respectivamente. Embora essa redução tenha sido estatisticamente significativa para as duas maiores concentrações de ACR e para o GD quando comparada ao grupo controle, manteve-se abaixo de 30%, valor máximo estabelecido pela *International Organization for Standardization* (ISO)¹¹⁸ como parâmetro para definir uma substância ou material como citotóxicos. Não existem outros estudos avaliando o efeito da acroleína sobre células pulpares, entretanto, utilizando metodologia semelhante, alguns trabalhos também observaram uma redução inferior a 30% para células MDPC-23 após a aplicação de GD 5% sobre a dentina condicionada com ácido fosfórico^{30,103}.

A viabilidade de ambas as linhagens celulares mantidas em contato com os extratos por 24 horas não foi afetada pela acroleína, independentemente da concentração aplicada sobre a dentina condicionada. Da mesma forma, nenhum efeito indesejável proveniente da aplicação da acroleína nas diferentes concentrações foi observado para a atividade de fosfatase alcalina e presença de nódulos mineralizados. Considerando que a fosfatase alcalina é uma enzima que desempenha papel fundamental no processo de mineralização da matriz dentinária⁴⁴ e que foram formados nódulos de mineralização, os dados do presente estudo permitem assumir que a capacidade de defesa do complexo dentino-pulpar não seria prejudicada pela aplicação da acroleína como *cross-linker*. Algumas hipóteses para a ausência de efeito tóxico da acroleína seriam as baixas concentrações utilizadas, o seu consumo à medida que reage com o colágeno dentinário para a formação de ligações cruzadas e a lavagem realizada após os 60 segundos de aplicação, a qual removeu as moléculas não reagidas.

O potencial citotóxico da ACR em baixas concentrações ainda é pouco conhecido e, como mencionado anteriormente, não existem trabalhos sobre o efeito desse agente sobre células pulpares. Quando aplicada sobre células epiteliais basais de adenocarcinoma (A549) em concentrações crescentes de 2% a 8%, a acroleína foi considerada tóxica a partir da concentração de 3%¹¹⁹. Contudo, é importante lembrar que o limiar de compatibilidade a uma mesma substância é específico para cada linhagem celular. No presente estudo, por exemplo, quando ambas as linhagens celulares foram sensibilizadas pelos extratos, foi possível observar que as HDPCs tenderam a ser menos sensíveis as substâncias investigadas em comparação as MDPC-23.

Aumento da expressão do gene que codifica a síntese de MMP-2 foi observado para todos os grupos avaliados e de MMP-9 para ACR 0,02% e 0,01%, para ambas as linhagens celulares. MMP-2 e MMP-9 tem sido diretamente implicadas no processo de degradação enzimática da camada híbrida^{5,6,54,55}, a qual culmina com redução significativa da resistência da união resina-dentina^{13,22,23,74,82}. Se essa superexpressão gênica for acompanhada pelo aumento da síntese dessas proteínas, essas endopeptidases poderiam, via fluído dentinário, alcançar a camada híbrida e servir como fonte de potencialização da degradação desse biocomposto. Recentemente, a atividade gelatinolítica da camada híbrida foi acompanhada em tempo real e os autores sugerem que células da polpa dental podem contribuir com a atividade

proteolítica na camada híbrida mais do que as endopeptidases dentinárias¹²⁰. Entretanto, maior evidência deve ser construída para que essa suposição seja definitivamente aceita.

Sialofosfoproteína da dentina e fosfatase alcalina, codificadas respectivamente pelos genes DSPP e ALPL, são proteínas essenciais para a mineralização da matriz dentinária^{39,44,45}. A expressão gênica de ALP não foi influenciada pela aplicação das diferentes concentrações de acroleína ou glutaraldeído, enquanto algum efeito foi observado sobre a expressão de DSPP. Entretanto, a despeito da pequena redução observada na expressão de DSPP por MDPC-23 em resposta a todos os tratamentos, e redução da expressão desse gene por HDPC em resposta a acroleína 0,02%, esse efeito não foi suficiente para interferir na síntese dessa proteína, uma vez que as diferentes concentrações de acroleína não interferiram na formação de nódulos mineralizados. Por outro lado, o efeito negativo exercido pelo GD 5% sobre a expressão gênica de DSPP e ALP foi acompanhado por uma pequena redução (ca. 20%) na formação de nódulos mineralizados por ambas as linhagens celulares.

A expressão do gene IL1B, que codifica a Interleucina 1β, uma importante citocina marcadora do processo inflamatório¹²¹ também não foi alterada em função dos tratamentos aplicados para as linhagens celulares avaliadas. Assim, embora não seja o único fator envolvido no processo inflamatório do tecido pulpar, esses resultados ratificam que a utilização da acroleína sobre a dentina condicionada não causaria exacerbação da inflamação tecidual, prejudicando o processo de defesa do complexo dentino-pulpar. Entretanto, essa hipótese precisaria ser investigada em estudos *in vivo*.

O GD é considerado o agente promotor de ligações cruzadas mais efetivo devido a características próprias como número de carbonos em sua cadeia ($C_5H_8O_2$) e a rápida reação com grupos amina, mesmo em pH neutro²⁹. Quando aplicado sobre a dentina desmineralizada, esse agente reage rapidamente com o colágeno, sem produzir subprodutos tóxicos^{30,103}. Ademais, nas condições experimentais reproduzidas, foi realizada a lavagem do *cross-linker* decorrido o tempo de aplicação de 60 segundos para a remoção do excedente não reagido. Portanto, assim como conjecturado anteriormente para a acroleína, a ausência de citotoxicidade do GD poderia ser atribuída a esses fatores^{30,103}. A ACR por sua vez, apresenta apenas três carbonos em sua cadeia (C_3H_4O) e, portanto, pode não ser um *cross-linker* tão efetivo quanto o GD²⁹.

A resistência máxima à tração da matriz dentinária é uma característica indicativa do efeito de *cross-linkers*, uma vez que o aumento do número de ligações cruzadas melhora as propriedades mecânicas do colágeno^{21,110,111}. Aumento significativo dessa propriedade foi observado apenas para a acroleína na concentração de 0,02% e para o glutaraldeído. Não existem dados na literatura acerca do efeito da acroleína sobre as propriedades mecânicas da dentina. A acroleína é o aldeído bi-insaturado com maior reatividade para nucleófilos, como as proteínas¹⁰⁴. O seu mecanismo de promoção de ligações cruzadas baseia-se na reação entre os grupos nucleofílicos presentes em uma sequência peptídica com a ligação dupla eletrofílica da acroleína (reação de Michael) ou por adições nucleofílicas no grupo carbonil para formar bases de Schiff¹⁰⁴.

O glutaraldeído vem sendo utilizado em diferentes concentrações e tempos de aplicação para aumentar as propriedades mecânicas de tecidos e biomateriais utilizados na engenharia tecidual^{99,100,122}. Foi observado, por exemplo, que o tratamento de amostras de pericárdio com 0,6% de glutaraldeído por 10 minutos foi capaz de aumentar a resistência máxima a tração deste tecido¹⁰⁰ e que scaffolds contendo colágeno quando tratados com glutaraldeído apresentam melhoria de suas propriedades mecânicas^{97,98}. Assim como em estudos prévios^{30,103}, no presente trabalho o glutaraldeído foi utilizado na concentração de 5% e foi aplicado pelo período de 60 segundos sobre a dentina condicionada. Nessas condições, o glutaraldeído tem sido considerado seguro quanto a sua toxicidade sobre células pulpares^{30,103}. Ademais, existe um sistema adesivo disponível comercialmente que contém 5% glutaraldeído em sua composição (atualmente comercializado como Gluma Bond5; Heareus Kulzer GmbH, Hanau, Alemanha) e a toxicidade desse sistema adesivo, quando aplicado em discos de dentina com 0,4 mm de espessura, foi atribuída a presença de 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) em sua composição, e não ao glutaraldeído³⁰.

O efeito da acroleína na longevidade da união resina-dentina foi avaliado por um único trabalho até o presente momento³¹. No estudo de Maravic et al.³¹, foi observada ausência de interferência na resistência de união imediata e manutenção da estabilidade mecânica da união resina-dentina ao longo de 12 meses após a biomodificação do colágeno dentinário com acroleína 0,01%. Os dados do presente trabalho ratificam os achados de Maravic et al.³¹ quanto à resistência de união imediata, embora não tenha sido observado aumento significativo da resistência

máxima à tração da matriz dentinária quando a acroleína foi aplicada na concentração de 0,01%. A neutralidade do glutaraldeído na resistência de união imediata à dentina vista no presente estudo também está de acordo com estudos previamente publicados^{23,86,102}. Nanoinfiltração foi detectada em todas as interfaces adesivas, independentemente da sua biomodificação ou não previamente a aplicação do sistema adesivo. Isso denota que a biomodificação do colágeno com acroleína ou glutaraldeído não exerceu influência sobre a qualidade inicial das camadas híbridas, as quais apresentaram defeitos intrínsecos assim como as camadas híbridas produzidas no grupo controle^{11,74,76,76}.

Assim, uma vez demonstrado que a acroleína, em baixas concentrações, pode ser aplicada sobre a dentina condicionada sem exercer efeito tóxico as células pulpares, e devido ao fato de que pouca evidência foi construída sobre a efetividade da acroleína como agente promotor de ligações cruzadas e como estratégia de estabilização da camada híbrida, novos estudos devem ser realizados para fomentar os benefícios desse *cross-linker* no desafiador processo de adesão à dentina.

7 CONCLUSÃO

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

- A. A aplicação de acroleína a 0,02, 0,01 ou 0,005% sobre a dentina condicionada com ácido fosfórico não foi tóxica às células odontoblastóides e pulpares humanas;
- B. A biomodificação da matriz dentinária pela ACR foi capaz de aumentar a sua resistência máxima à tração apenas quando esse agente foi aplicado na concentração de 0,02%;
- C. Independente da concentração, a biomodificação da matriz dentinária pela ACR não interferiu na resistência de união imediata do sistema adesivo Single Bond 2 à dentina;
- D. A presença de nanoinfiltração nas camadas híbridas produzidas sobre a dentina tratada com ACR foi comparável a observada para a dentina tratada com água, sugerindo que a biomodificação do colágeno por esse *cross-linker* não exerceu influência na quantidade de imperfeições presentes na camada híbrida.

REFERÊNCIAS*

1. GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017; 390(10100): 1211-59.
2. Lan R. Epidemiology and outcomes of traumatic dental injuries: a review of the literature. *Aust Dent J*. 2016; 6(1): 4-20.
3. Da Viegua AM, Cunha AC, Ferreira DM, da Silva Fidalgo TK, Chianca TK, Reis KR et al. Longevity of direct and indirect resin composite restorations in permanent posterior teeth: A systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2016; 54: 1-12.
4. Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health (CADTH). Composite resin versus amalgam for dental restorations: a health technology assessment — project protocol. Ottawa: Health Technology Assessments; 2017.
5. Perdigão J, Reis A, Loguercio A. Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. *J Esthet Restor Dent*. 2013; 25(4): 219-41.
6. Tjaderhane L. Dentin bonding: can we make it last. *Oper Dent*. 2015; 40(1): 4-18.
7. Breschi L, Maravic T, Cunha SR, Comba A, Cadenaro M, Tjardehane L, et al. Dentin bonding systms: from dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. *Dent Mater*. 2018; 34(1): 78-96.
8. Nakabayashi N, Kojima K and Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res*. 1982; 16(3): 265-73.
9. Bertassoni LE, Orgel JPR, Antipova O, Swain MV. The dentin organic matrix- limitations of restorative dentistry hidden on nanometer scale. *Acta Biomater*. 2012; 8(7): 2419-33.
10. Agee KA, Prakki A, Abu-Haimed T, Naguib GH, Nawareg MA, Tezvergil-Mutluay A, et al Water distribution in dentin matrices: bound vs. unbound water. *Dent Mater*. 2015; 31(3): 205-16.
11. Hashimoto M, Ohno H, Endo K, Kaga M, Sano H, Oguchi H. The effect of hybrid layer thickness on bond strength: demineralized dentin zone of the hybrid layer. *Dent Mater*. 2000; 16(6): 406-11.

* 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>

12. Pashley DH, Tay FR, Imazato S. How to increase the durability of resin-dentin bonds. *Compend Contin Educ Dent*. 2011; 32(7): 60-4.
13. Ricci HA, Sanabe ME, De Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Chlorhexidine increases the longevity of in vivo resin-dentin bonds. *Eur J Oral Sci*. 2010; 118(4): 411-6.
14. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res*. 2004; 83(3): 216-21.
15. Zang SC, Kern M. The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bond of resin adhesives. *Int J Oral Sci*. 2009; 1(4): 163-76.
16. Chaussain C, Boukpepsi T, Kaddan M, Tjaderhane L, George A, Menashi S. Dentin matrix degradation by host matrix metalloproteinases: inhibition and clinical perspectives toward regeneration. *Front Physio*. 2013; 4(308): 1-8.
17. Hu L, Xiao YH, Fang M, Gao Y, Huang L, Jia AQ, et al. Effects of type I collagen degradation on the durability of three adhesive systems in the early phase of dentin bonding. *PLoS One*. 2015; 10(2): e0116790.
18. Scaffa PM, Breschi L, Mazzoni A, Vidal CM, Curci R, Apolonio F, et al. Co-distribution of cysteine cathepsins and matrix metalloproteinases in human dentin. *Arch Oral Biol*. 2017; 74: 101-7.
19. Bedran-Russo AKB, Vidal CMP, Dos Santos PH, Castellan CS. Long-term effect of carbodiimide on dentin matrix and resin dentin bonds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010; 94: 250-5.
20. 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.
21. 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.
22. Scheffel DL, Delgado CC, Soares DG, Basso FG, de Souza Costa CA, Pashley DH, et al. Increased durability of resin-dentin bonds following cross-linking treatment. *Oper Dent*. 2015; 40(5): 533-9.
23. Lee J, Sabatini C. Glutaraldehyde collagen cross-linking stabilizes resin-dentin interfaces and reduces bond degradation. *Eur J Oral Sci*. 2017; 125(1): 63-71.
24. De Souza LC, Rodrigues NS, Cunha DA, Feitosa VP, Santiago SL, Reis A, et al. Two-year clinical evaluation of proanthocyanidins added to a two-step etch and-rinse adhesive. *J Dent*. 2019; 81: 7-16.

25. Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, McAlpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, et al. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. *Dent Mater.* 2014; 30(1): 62-76.
26. Aydin B, Leme-Kraus AA, Vidal CMP, Aguiar TR, Phansalkar RS, Nam J, et al. Evidence to the role of interflavan linkages and galloylation of proanthocyanidins at sustaining long-term dentin biomodification. *Dent Mater.* 2019; 35(2): 328-34.
27. Epasinghe DJ, Yiu CKY, Burrow MF, Hiraishi N, Tay FR. The Inhibitory effect of proanthocyanidin on soluble and collagen-bound proteases. *J Dent.* 2013; 41(9): 832-9.
28. Sabatini C, Scheffel DL, Agee KA, Pashley DH. Inhibition of endogenous human dentin MMPs by Gluma. *Dent Mater.* 2014; 30(7): 752-8.
29. Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, Waldron KC. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques.* 2004; 37(5): 790-802.
30. 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.
31. Maravic T, Breschi L, Comba A, Cunha SR, Angeloni V, Nucci C, et al. Experimental use of an acrolein-based primer as collagen cross-linker for dentine bonding. *J Dent.* 2018; 68: 85-90.
32. Arntz D, Fischer A, Höpp M, Jacobi S, Sauer J, Ohara T, et al. Acrolein and Methacrolein. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.* 2012.
33. Ehrlich J, Cahill TM. Identification of broadleaf and coniferous trees as a primary source of acrolein. *Atmos. Environ.* 2018, 191: 414-19.
34. Stevens JF, Maier CS. Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol Nutr Food Res.* 2008; 52(1): 7-25.
35. Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996; 7(2): 104-33.
36. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 45: 679-728.
37. Katchburian E, Ararana V. *Histologia e embriologia oral: texto, atlas, correlações clínicas.* 3. ed. rev. e atual. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
38. Mjor IA. Dentin permeability: the basis for understanding pulp reactions and adhesive technology. *Braz Dent J.* 2009; 20(1): 3-16.
39. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed).* 2011; 3(1): 711-35.

40. Bertassoni LE. Dentin on the nanoscale: hierarchical organization, mechanical behavior and bioinspired engineering. *Dent Mater.* 2017; 33(6): 637-49.
41. Märten A, Fratzl P, Paris O, Zaslansky P. On the mineral in collagen of human crown dentine. *Biomaterials.* 2010; 31(20): 5479-90.
42. 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.
43. 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 I: proteoglycans and glycoproteins. *Endod Topics.* 2009; 21(1): 169-79.
44. Golub EE, Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr Opin Orthop.* 2007; 18(5): 444–48.
45. 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.
46. Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjaderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci.* 2003; 111: 117-27.
47. Tezvergil-Mutluay A, Mutluay M, Seseogullari-Dirihan R, Agee KA, Key WO, Scheffel DL, et al. Effect of phosphoric acid on the degradation of human dentin matrix. *J Dent Res.* 2013; 92(1): 87-91.
48. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Hoshika T, Carrilho M, Breschi L, Tjäderhane L, et al. The requirement of zinc and calcium ions for functional MMP activity in demineralized dentin matrices. *Dent Mater.* 2010; 26(11): 1059- 67.
49. Zitka O, Kukacka J, Krizkova S, Huska D, Adam V, Masarik M et al. Matrix Metalloproteinases. *Curr. Med. Chem.* 2010; 17: 3751-68.
50. 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.
51. Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggieri A Jr., et al. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis. *J Biomed Mater Res A.* 2009; 88(3): 697-703.
52. Mazzoni A, Maravic T, Tezvergil-Mutluay, Tjaderhane, L, Scaffa PMC, Seseogullari-Dirihan R, et al. Biochemical and immunohistochemical identification of MMP-7 in human dentin. *J Dent.* 2018, 79: 90-5.

53. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20, enamelysin in mature human teeth. *J Dent Res.* 2002; 81(9): 603-7.
54. Mazzoni A, Scaffa P, Carrilho M, Tjäderhane L, Di Lenarda R, Polimeni A, et al. Effects of etch-and-rinse and self-etch adhesives on dentin MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res.* 2013; 92(1): 82–6.
55. 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.
56. Apolonio FM, Mazzoni A, Angeloni V, Scaffa PMC, Santi S, Saboia VPA, et al. Effect of a one-step self-etch adhesive on endogenous dentin matrix metalloproteinases. *Eur J Oral Sci.* 2017; 125(2): 168–72.
57. Kang J, Izutani N, D'Angelo M, Buis W, Blatz M, Imazato S, et al. Assaying endogenous matrix metalloproteinases (MMPs) in acid-etched dentinal cavity walls. *Dent Mater J.* 2019, 38(6): 934-9.
58. Burleigh MC, Barrett AJ, Lazarus GS. Cathepsin B1. A lysosomal enzyme that degrades native collagen. *Biochem J.* 1974; 137(2): 387-98.
59. Buck MR, Karustis DG, Day NA, Honn KV, Sloane BF. Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochem J.* 1992; 282(Pt 1): 273-278.
60. Nguyen Q, Mort JS, Roughley PJ. Cartilage proteoglycan aggregate is degraded more extensively by cathepsin L than by cathepsin B. *Biochem J.* 1990; 266(2): 569-73.
61. Fonovic M, Turk B. Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1840(8): 2560-70.
62. Tersariol IL, Geraldini S, Minciotti CL, Nascimento FD, Pääkkönen V, Martins MT, et al. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *J Endod.* 2010; 36(3): 475-81.
63. Butler WT, Munksgaard EC, Richardson WS. Dentin proteins: chemistry, structure and biosynthesis. *J Dent Res.* 1979; 58: 817-24.
64. Nelson DL, Cox MM, Termignoni C, Pereira MLS. *Princípios de bioquímica de Lehninger.* 7ed. São Paulo: Artmed. 2019.
65. Brinckmann J, Norbohm J, Muller PK. *Collagen: primer in structure, processing and assembly.* Amsterdam NL: Springer-Verlag Heidelberg. 2005.
66. Seseogullari-Dirihan R. *Effect of collagen crosslinkers on dentin protease activity [Finnish Doctoral Program in Oral Sciences].* Turku: University of Turku; 2016.

67. Shoulders MD, Rauners RT. Collagen structure and stability. *Annual Rev Biochem.* 2009; 78(1): 929-58.
68. Orgel JP, Wess TJ, Miller A. The *in situ* conformation and axial location of the intermolecular cross-linked non-helical telopeptides of type I collagen. *Structure.* 2000; 8(2): 137-42.
69. Yamauchi M, Shiiba M. Lysine hydroxylation and cross-linking of collagen. *Methods Mol Biol.* 2008; 446: 95-108.
70. Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z. Cardiac fibroblast, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012; 5(1): 5-15.
71. Mouw JK, Ou G, Weaver VM. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15(12): 771-85.
72. Charulatha V, Rajaram A. Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. *Biomater.* 2003; 24(5): 759– 67.
73. Hashimoto M, Ohno H, Endo K, Kaga M, Sano H, Oguchi H. The effect of hybrid layer thickness on bond strength: demineralized dentin zone of the hybrid layer. *Dent Mater.* 2003; 16(6):406-11.
74. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res.* 2005; 84(8): 741-6.
75. Anchieta RB, Machado LS, Martini AP, Santos PH, Giannini M, Janal M, et al. Effect of long-term storage on nanomechanical and morphological properties of dentin- adhesive interfaces. *Dent Mater.* 2015; 31(2): 141-53.
76. 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.
77. Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res.* 2003; 82(2): 141-5.
78. 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.
79. Spencer P, Wang Y, Katz JL. Identification of collagen encapsulation at the dentin/adhesive interface. *J Adhes Dent.* 2004; 6(2): 91-5.
80. Betancourt DE, Baldion PA, Castellanos JE. Resin-dentin bonding interface: mechanism of degradation and strategies for stabilization of hybrid layer. *Int J Biomater.* 2019; 2019: 1-11.

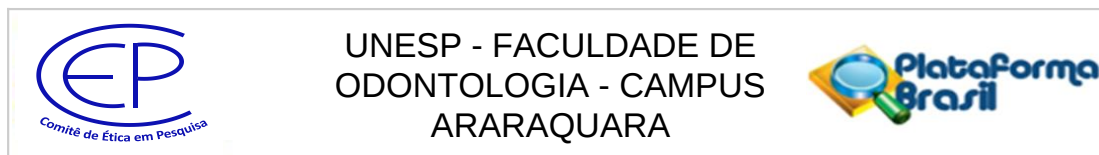
81. Tjaderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol ILS, Geraldeli S, et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer - a review. *Dent Mater.* 2013; 29(10): 999-1011.
82. Sabatini C, Pashley DH. Mechanisms regulating the degradation of dentin matrices by endogenous dentin proteases and their role in dental adhesion. A review. *Am J Dent.* 2014; 27(4): 203-14.
83. Shokati B, Tam LE, Santerre JP, Finer Y. Effect of salivary esterase on the integrity and fracture toughness of the dentin-resin interface. *J Biomed Mater Res.* 2010, 94B(1): 230–37.
84. Kermanshahi S, Santerre JP, Cvitkovitch DG, Finer Y. Biodegradation of resin-dentin interfaces increases bacterial microleakage. *J Dent Res.* 2010; 89(9): 996–1001.
85. Mazzoni A, Apolonio FN, Saboia VP, Santi S, Angeloni V, et al. Carbodiimide inactivation of MMPs and effect on dentin bonding. *J Dent Res.* 2014; 93(3): 263-8.
86. Hass V, Luque-Martinzes IV, Guiterrez MF, Moreira CG, Gotti VB, Feitosa VP, et al. Collagen cross-linkers on dentin bonding: stability of the adhesive interfaces, degree of conversion of the adhesive, cytotoxicity and in situ MMP inhibition. *Dent Mat.* 2016; 32(6): 732-41.
87. 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.
88. Xie Q, Bedran-Russo AK, Wu CD. In vitro remineralization effects of grape seed extract on artificial root caries. *J Dent.* 2008; 36(11): 900-6.
89. Ekabaram M, Yiu CK, Mantinlinna JP. Effect of solvents on dentin collagen cross-linking potential of carbodiimide. *J Adhes Dent.* 2015; 17(3): 2019-6.
90. Castellan CS, Pereira PN, Grande RH, Bedran-Russo AK. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. *Dent Mater.* 2010; 26(10): 968-73.
91. Cos P, Bruyne T, Hermans N, Apers S, Berghe D, Vlietinck A. Proanthocyanidins in Health Care: Current and New Trends. *Curr Med Chem.* 2003; 11(10): 1345-59.
92. Dos santos AF, Pacheco JM, Silva PAO, Bedran-Russo AK, Rezende TMB, Pereira PNR, Ribeiro APD. Direct and transdental biostimulatory effects of grape seed extract rich in proanthocyanidin on pulp cells. *Int Endod J.* 2019; 52(4): 424-38.
93. Gu L, Shan T, Tay FR, Niu L. Novel Biomedical Applications of crosslinked collagen. *Trends Biotechnol.* 2019; 37(5): 464-91.

94. Tezvergil-Multluay A, Multluay MM, Agee KA, Seseogullari-Dirihan R, Hoshika T, Cadenaro M, et al. Carbodiimide cross-linking inactivates soluble and matrix-bound MMPs, in vitro. *J Dent Res*. 2012, 91(2): 192-6.
95. Alonso JRL, Basso FG, Scheffel DLS, de-Souza-Costa CA, Hebling J. Effect of crosslinkers on bond strength stability of fiber posts to root canal dentin in situ proteolytic activity. *J Prosthet Dent*. 2018; 119(3): 494-e1-494e9.
96. 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. *Biomater*. 1996; 17(7): 679-84.
97. Yang Y, Ritchie AC, Everitt NM. Comparison of glutaraldehyde and procyanidin cross-linked scaffolds for soft tissue engineering. *Mat Sci Eng C-Mater*. 2017;80: 263–73.
98. 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. *Mat Sci Eng C-Mater*. 2017; 71: 891–900.
99. Perez-Puyana V, Romero A, Guerrero A. Influence of collagen concentration and glutaraldehyde on collagen-based scaffold properties. *J Biomed Mater*. 2016; 104(6): 1462-8.
100. Yamashita H, Ozaki S, Iwasaki K, Kawase I, Nozara Y, Umezumi M. Tensile strength of human pericardium treated with glutaraldehyde. *Ann Thorac Cardiovasc surg*. 2012; 18(5): 434-7.
101. Chen C, Mao C, Sun J, Chen Y, Wang W, Pan H et al. Glutaraldehyde-induced remineralization improves the mechanical properties and biostability of dentin collagen. *Mater Sci Eng C*. 2016; 67: 657–65.
102. Citta M. Estabilidade mecânica e atividade proteolítica de interfaces produzidas com a técnica de adesão seca à dentina biomodificada [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.
103. 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.
104. Ishii T, Yamada T, Mori T, Shigenori K, Uchida K, Nakayama T. Characterization of acrolein-induced cross-links. *Free Radic Res*. 2007; 41(11): 1253-60.
105. Annovazzi L, Cattaneo V, Vigli S, Perani E, Zanone C, Rota C, et al. High-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis: Methodological challenges for the determination of biologically relevant low-aliphatic aldehydes in human saliva. *Electrophoresis*. 2004; 25(9): 1255–63.

106. Ehrlich J, Cahill TM. Identification of broadleaf and coniferous trees as a primary source of acrolein. *Atmos Environ*. 2018; 191:414-19.
107. Uchida K, Kanematsu M, Morimitsu Y, Osawa T, Noguchi N, Niki E. Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins. *J Biol Chem*. 1998; 273(26):16058-66.
108. United States Environmental Protection Agency. Toxicological review of acrolein. Washington, DC: 2003. CAS Nr. 107-02-8.
109. Organização Mundial da Saúde. Concise International Chemical Assessment Document 43 (Acrolein). Geneva, 2002
110. Ryou H, Turco G, Breschi L, Tay FR, Pashley DH, Arola D. On the stiffness of demineralized dentin matrices. *Dent. Mater*. 2016; 32(2):161-70.
111. Bedran-Russo AK, Pereira PNR, 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.
112. Xu S, Dong D, Wang W, Fu L, Xu A. Transferable crosslinked chitosan membranes for human melanocyte culture. *J Biomed Mater Res*. 2011; 100(3): 673-83.
113. Lanza CR, de Souza Costa CA, Furlan M, Alécio A, Hebling J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol* 2009; 25: 533-43.
114. Hanks CT, Craig RG, Diehl ML, Pashley DH. Cytotoxicity of dental composites and other materials in a new in vitro device. *J Oral Pathol*. 1988; 17(8): 396–403.
115. Tay FR, DH Pashley, Yoshiyama M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. *Journal of Dental Research*. 2002; 81(7): 472-76.
116. Hebling J, Ribeiro APD, Costa CAS. Relação entre Materiais Dentários e o Complexo Dentino-Pulpar. *Rev Odontol Bras Central*. 2010; 18(48): 1-9.
117. Hanks CT, Fang D, Sun Z, Edwards CA, Butler WT. Dentin-specific proteins in MDPC-23 cell line. *Eur J Oral Sci*. 1998; 106(1): 260–66.
118. International Standard ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for invitro cytotoxicity. Geneva: International Organization for Standardization, 2009.
119. Zhang S, Chen H, Wang A, Liu Y, Hou H, Hu Q. Combined effects of co-exposure to formaldehyde and acrolein mixtures on cytotoxicity and genotoxicity in vitro. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018; 25(25): 25306-14.

120. França CM, Tahayeri A, Rodrigues NS, Ferdosian S, Rontani RMP, Sereda G, et al. The tooth on-a-chip: a microphysiologic model system mimicking the biologic interface of the tooth with biomaterials. *Lab Chip*. 2019.
121. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011; 117(14): 3720-32.
122. Bordini EAF, Cassiano FB, Silva ISP, Usberti FR, Anovazzi G, Pacheco LE. Synergistic potential of 1 α ,25-dihydroxy vitamin D3 and calcium-aluminate-chitosan scaffolds with dental pulp cells. *Clin Oral Investig*. 2019; 22. DOI: 10.1007/s00784-019-02906-z

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Resposta de células pulpares a aplicação de acroleína e seu efeito na estabilidade mecânica da união resina-dentina

Pesquisador: JOSIMERI HEBLING COSTA

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 18752419.6.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.729.296

Apresentação do Projeto:

A camada híbrida é considerada o elo mais frágil da união resina-dentina, a despeito de seu importante papel na retenção do material restaurador e no selamento dentinário. A resistência da camada híbrida aos processos de degradação hidrolítica e enzimática é o reflexo da resistência individual de seus componentes, resina e colágeno. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivos: (1) avaliar a citotoxicidade da acroleína sobre células pulpares e (2) seu efeito biomodificador do colágeno sobre a estabilidade mecânica da união resina-dentina. Para realização deste estudo serão necessários 97 terceiros molares humanos, 54 deles para obtenção de discos de dentina e avaliação da citototoxicidade da acroleína, 40 para obtenção de superfícies planas e avaliação do efeito biomodificador da substância, e 3 coletados imediatamente após a cirurgia para obtenção da cultura primária de células. Para responder ao primeiro objetivo, discos de dentina com 0,4 mm de espessura (n=54) serão obtidos de molares humanos hígidos e individualmente adaptados em câmaras pulpares artificiais (CPAs). Células odontoblastóides MDPC-23 serão semeadas na superfície pulpar desses discos, em meio de cultura DMEM. A superfície oclusal será condicionada com ácido fosfórico por 15 segundos, seguido de lavagem e remoção do excesso de umidade com papel absorvente. Sobre a dentina condicionada serão aplicadas as seguintes soluções (n=9): água deionizada (controle negativo), 0,005% acroleína, 0,01% acroleína, 0,02% acroleína, 5% glutaraldeído ou 3% peróxido de hidrogênio (controle positivo). Decorridos 60 segundos de contato com a dentina, o excesso das soluções será

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

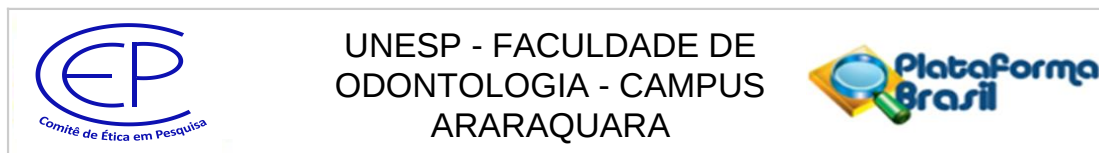
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.729.296

removido e as CPAs mantidas em incubadora por 24 horas. Em seguida, será avaliada a viabilidade das MDPC-23 (alamarBlue) aderidas na parede pulpar dos discos e será coletado o meio condicionado (extrato) para aplicação em novas células MDPC-23 e sobre células HDPC (human dental pulp cells) previamente cultivadas em placas de cultura. Essas células serão utilizadas para análises de viabilidade celular (alamarBlue), atividade de fosfatase alcalina (ensaio da timolftaleína), formação de matriz mineralizada (Alizarin red), análise do estresse oxidativo e expressão gênica de ALPL, DSPP, DMP1, MMP2, MMP9 e IL1b (RTqPCR). Para responder ao segundo objetivo, quarenta superfícies planas de dentina produzidas em molares humanos hígidos serão distribuídas de acordo com o tratamento da dentina (n=10): água deionizada (controle), acroleína (cuja concentração será selecionada a partir dos testes biológicos) ou glutaraldeído 5%. As soluções serão aplicadas sobre a dentina condicionada com ácido fosfórico, mantidas por 60 segundos, enxaguadas com água deionizada e o excesso de umidade será removido com papel absorvente. Sobre a superfície úmida, será aplicado o sistema adesivo Single Bond 2 seguido da construção de um bloco de resina composta. Espécimes na forma de palitos com área de secção transversal de 0,81 mm² serão obtidos de cada dente, os quais serão aleatoriamente divididos em 2 grupos. Em um grupo, os espécimes serão submetidos ao ensaio mecânico de microtração imediatamente após sua obtenção. No outro grupo, os espécimes serão envelhecidos em solução do tipo saliva por 6 meses antes de serem tracionados. Na sequência do ensaio de microtração, as fraturas serão classificadas em adesiva, mista, coesiva em dentina ou coesiva da resina. Desde 1982, quando a camada híbrida foi descrita pela primeira vez como um biocomposto formado pela mescla de fibrilas de colágeno dentinário e componentes do sistema adesivo (Nakabayashi et al., 1982), muitos estudos tem avaliado esta estrutura e contribuído para a compreensão de sua dinâmica de estabelecimento e manutenção em longo prazo. Especialmente nas últimas duas décadas, tem sido demonstrado que a degradação da interface adesiva pode ser observada independentemente da categoria do sistema adesivo, ou seja, convencional ou autocondicionante (Pashley et al., 2011; Tjäderhane et al., 2015; Anchieta et al., 2015) e que este processo ocorre basicamente em duas frentes (1) a clivagem do colágeno exposto e (2) a hidrólise da porção resinosa da camada híbrida (Pashley et al., 2011; Tjäderhane et al., 2015). A infiltração incompleta da rede de colágeno desmineralizado por monômeros adesivos, fenômeno esse repetidamente observado Nakabayashi et al., 1998; Hashimoto et al., 2000; Wang e Spencer, 2003; Oliveira et al., 2004; Spencer et al., 2004), é consequência do reduzido espaço disponível para receber o adesivo entre as moléculas de colágeno que compõem as fibrilas (Bertassoni et al., 2012). Segundo os autores, a falta de espaço se deve à dois fatores principais: 1) a presença de moléculas de água

Endereço: HUMAITA 1680**Bairro:** CENTRO**CEP:** 14.801-903**UF:** SP**Município:** ARARAQUARA**Telefone:** (16)3301-6459**E-mail:** cep@foar.unesp.br



UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CAMPUS
ARARAQUARA



Continuação do Parecer: 3.729.296

livres e também ligadas ao colágeno desmineralizado e 2) ao empacotamento denso do colágeno. Esta infiltração deficiente somada à presença de água e a separação de fases promovida pela diferença de peso molecular e grau de hidrofília dos monômeros que compõem um mesmo adesivo, favorece a manutenção de colágeno exposto no biocomposto colágeno-resina e gera uma porção resinosa mais instável (Pashley et al., 2011; Tjäderhane et al., 2015). O colágeno dentinário desprovido de reforço mineral ou polimérico exposto na camada híbrida está susceptível aos fenômenos de degradação que acometem a união resina-dentina (Tjäderhane et al., 2013; Sabatini e Pashley, 2014; Breschi et al., 2018). A resistência da camada híbrida aos processos de degradação é o reflexo da resistência individual de seus componentes, polímero resinoso e colágeno (Tjäderhane et al., 2015). Objetivando melhorar as propriedades mecânicas do colágeno e torná-lo mais resistente aos processos de degradação, tem sido investigada a biomodificação dessa proteína com agentes formadores de ligações cruzadas (cross-linkers) (Bedran-Russo et al., 2010;

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a citotoxicidade transdentinária da acroleína sobre células pulpares e a estabilidade mecânica da união resina-dentina produzida após a biomodificação do colágeno dentinário por esse agente promotor de ligações cruzadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos inerentes ao doador serão os mesmos decorrentes do procedimento cirúrgico. Serão tomadas todas as medidas que poderão prevenir as principais complicações durante e após a cirurgia, incluindo medidas de biossegurança. Será possível sentir algum desconforto e dor na região após a cirurgia, situação que poderá ser minimizada com a administração de medicamentos receitados pelo cirurgião. Caso os pacientes apresentem complicações pós-operatórias como edema, dor, infecção ou alveolite, eles serão atendidos por cirurgiões-dentistas da clínica de cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, que tomarão as devidas providências para sanar os problemas. Em relação aos pesquisadores, os mesmos estarão sujeitos a riscos relacionados a manipulação dos dentes obtidos para o estudo. Esses riscos serão minimizados por meio da utilização de EPIs adequados para a manipulação das amostras em todas as etapas do estudo (luvas, jaleco, gorro, máscara e óculos de proteção).

Benefícios: Apesar da acroleína ser proposta como um potencial cross-linker, o efeito dessa substância sobre células pulpares humanas não é conhecido. É importante que se conheça a resposta celular frente a aplicação dessa substância, além de ratificar seu efeito benéfico no

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

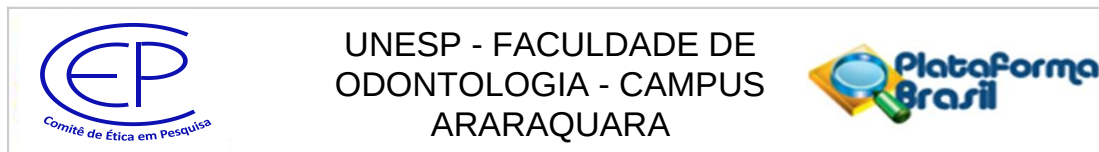
UF: SP

Telefone: (16)3301-6459

Município: ARARAQUARA

CEP: 14.801-903

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.729.296

aumento da estabilidade de união resina-dentina, para que essa substância possa ser incorporada a procedimentos restauradores adesivos, propiciando a formação de uma camada híbrida mais resistente e consequentemente menos susceptível à degradação ao longo do tempo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está apresentado de maneira satisfatória e justificada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo APROVADO em 27 de novembro de 2019.

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1198969.pdf	20/11/2019 11:49:35		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_LAYS.pdf	20/11/2019 11:48:39	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito
Outros	Cartaresposta_pendencia.pdf	19/11/2019 12:00:32	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Banco_de_dentes.jpg	19/11/2019 11:46:28	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	21/10/2019 09:52:57	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_reformulado_Lays_2.pdf	01/10/2019 10:09:39	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_cirurgia.pdf	14/09/2019 18:02:29	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

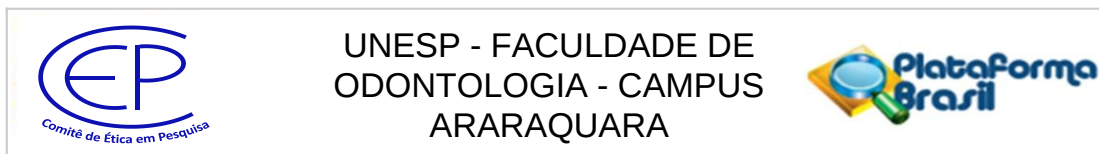
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.729.296

Orçamento	Orcamento.pdf	24/07/2019 10:42:11	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	SolicitacaodedispensadeTCLE.pdf	24/07/2019 10:41:48	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracaodecompromisso.pdf	24/07/2019 10:40:39	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaolabPediatria.pdf	24/07/2019 10:37:39	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoBeto.pdf	24/07/2019 10:36:51	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 27 de Novembro de 2019

Assinado por:
Andréa Gonçalves
(Coordenador(a))

Endereço: HUMAITA 1680**Bairro:** CENTRO**CEP:** 14.801-903**UF:** SP**Município:** ARARAQUARA**Telefone:** (16)3301-6459**E-mail:** cep@foar.unesp.br

Não autorizo a publicação deste trabalho até 18 de Fevereiro de 2022.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 18 de Fevereiro de 2020.