



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



CLÁUDIA CRISTINA DELGADO

**EFEITO DE UM PRIMER EXPERIMENTAL CONTENDO CARBODIIMIDA NA
ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES, DEGRADAÇÃO DO COLÁGENO E DA
UNIÃO RESINA-DENTINA**

Araraquara
2015

Delgado, Cláudia Cristina

Efeito de um primer experimental contendo carbodiimida na atividade de metaloproteinases, degradação do colágeno e da união resina-dentina / Cláudia Cristina Delgado. -- Araraquara: [s.n.], 2015.

84 f.; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra Josimeri Hebling

Co-orientadora: Profa. Dra. Débora Lopes Scheffel

1. Colágeno 2. Dentina 3. Metaloproteinases da matriz
4. Etildimetilaminopropil carbodi-imida 5. Resistência à tração I.
Título



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



CLÁUDIA CRISTINA DELGADO

**EFEITO DE UM PRIMER EXPERIMENTAL CONTENDO CARBODIIMIDA NA
ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES, DEGRADAÇÃO DO COLÁGENO E DA
UNIÃO RESINA-DENTINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Josimeri Hebling

Co-orientadora: Profa. Dra. Débora Lopes Scheffel

Araraquara
2015

CLÁUDIA CRISTINA DELGADO

**EFEITO DE UM PRIMER EXPERIMENTAL CONTENDO CARBODIIMIDA NA
ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES, DEGRADAÇÃO DO COLÁGENO E DA
UNIÃO RESINA-DENTINA**

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre

Presidente e orientador: Profa. Dra. Josimeri Hebling

2º Examinador: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

3º Examinador: Profa. Dra. Mariane Emi Sanabe

Araraquara, 14 de setembro de 2015

DADOS CURRICULARES

Cláudia Cristina Delgado

Nascimento: 28/01/1988, Nova Granada, SP

Filiação: João Luis Delgado
Carmem Patricia de Souza Delgado

2008 a 2012: Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista – UNESP

2013 a 2015: Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria, Nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista - UNESP

DEDICATÓRIA

*”O amor recíproco entre quem aprende e quem ensina é o primeiro e mais importante degrau para se chegar ao conhecimento.”
(Erasmus de Rotterdam)*

À minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling**, uma mulher admirável em todos os sentidos. Obrigado por todas as oportunidades que me foram dadas, pela confiança depositada e por todo o conhecimento que me foi transmitido. Sua orientação vai além da Odontologia, e eu me sinto lisonjeada por fazer parte do seu “time”. Saiba que vejo em você a profissional que almejo ser um dia. A você minha eterna gratidão!

À minha co-orientadora e amiga, **Prof^a. Dr^a. Débora Scheffel**, que muito me ensinou durante todo o tempo que trabalhamos juntas. Exemplo de sabedoria, paciência, bondade e perseverança. Obrigada por sempre estar disposta a ajudar com um sorriso no rosto e com uma solução para todos os problemas. Você tem um coração de ouro enorme!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*“Há pessoas que nos falam e nem as escutamos;
Há pessoas que nos ferem e nem cicatrizes deixam;
Mas há pessoas que simplesmente aparecem em nossas vidas
e nos marcam para sempre.”
(Cecília de Meireles)*

Aos meus pais, **João e Carmem**, pelo amor incondicional, por acreditarem e confiarem em mim, por serem meus primeiros e mais importantes mestres, que me deram a vida e me ensinaram que nela, o importante não é o que temos e sim o que somos. Obrigado por me ensinarem o valor do respeito, dignidade, humildade e amor a Deus. Vocês me permitiram sonhar, e com a ajuda de vocês as pedras ficaram mais fáceis de carregar. Amo muito vocês!

Ao meu irmão, **João Luis**, pela verdadeira amizade, confiança e apoio em todos os momentos da minha vida. O amor de nossos pais nos fez irmãos, por escolha nos tornamos amigos.

Às minhas avós, **Encarnação e Maria** (*in memoriam*), por participarem de forma tão carinhosa de cada etapa da minha vida. Obrigada pelo cuidado e incentivo a mim dispensados em todos os momentos.

Ao **Jailton**, meu namorado, confidente, cúmplice, companheiro e amigo. Agradeço todos os dias à Deus por ter colocado você no meu caminho. Muito obrigado por todas as vezes que calmamente me ouviu e me aconselhou, por sempre estar ao meu lado, pela preocupação, pelo cuidado, pelo carinho e pelo respeito com que sempre me tratou. Te amo, meu amor!

Ao meu sogro **Osmar** e minha sogra **Antônia**, fazer parte da família de vocês é uma dádiva de Deus. Vocês me acolheram com muito carinho e amor. Muito obrigado pelas orações e por torcerem pelo meu sucesso.

Às minhas queridas amigas e irmãs por opção, **Danielle Wajngarten, Jéssica Hayakawa e Patrícia Nakata**, por estarem ao meu lado e me ajudarem em tudo o que preciso. Agradeço todos os dias a oportunidade de compartilhar esses momentos com vocês. Obrigada por nunca terem faltado comigo!

Aos meus amigos e “família araraquense”, **Régis, Débora, Leandro, Evelin, Jéssica, Simone, Smirna e Miriã**, por terem suprido a falta que eu sentia da minha família e por terem feito minha estadia em Araraquara mais feliz. Obrigado pela amizade e carinho. Cada um de vocês tem uma importância fundamental e única na minha vida. Vocês vão estar sempre dentro do meu coração!

À **Juventina Lopes**, por ser uma segunda mãe e por abrir as portas de seu lar para me acolher durante a realização deste trabalho.

À minha colega e parceira de clínica, **Ana Carolina Mendes**, pela amizade, pela cumplicidade e pelos momentos de descontração e desabafos.

AGRADECIMENTOS

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”
(Madre Teresa de Calcutá)*

À Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho”, em nome do magnífico Reitor Prof. Dr. Júlio César Durigan e Vice-Reitora Profa. Dra. Marilza Vieira Cunha Rudge.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista, representados pela digníssima Diretora Profa. Dra. Andréia Affonso Barretto Montandon e pela Vice-Diretora Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato, pelas oportunidades proporcionadas aos alunos desta faculdade.

Ao Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP representada pelo Chefe de Departamento Prof.Dr. Cyneu Aguiar Pansani e Vice-Chefe Profa. Dra. Lídia Parsekian Martins.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAR - UNESP, Ângela Cristina Cilense Zuanon, Cyneu Aguiar Pansani, Elisa Maria Aparecida Giro, Fábio César Braga de Abreu e Lima, Josimeri Hebling, Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto, Fernanda Lourenção Brighenti e Rita de Cássia Loiola Cordeiro, pela oportunidade de desenvolver conhecimentos na área que escolhi seguir e, principalmente, por incentivarem o crescimento profissional, com ética, respeito e dignidade.

À Coordenação de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAR– UNESP, representados pelo Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Júnior e Profa. Dra. Lídia Parsekian Martins.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAR – UNESP, Mara Cândida Munhoz do Amaral e José Alexandre Garcia, pela atenção a mim dispensada em todos os momentos.

Ao Laboratório de Patologia Experimental do Departamento de Patologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, pela disponibilidade de sua estrutura física, materiais e equipamentos. Agradeço aos técnicos do laboratório, Juliana e José Antonio por me ajudarem em várias etapas deste trabalho.

Ao Laboratório de Biologia Molecular, do Departamento de Fisiologia e Patologia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, coordenado pela Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio, por permitir a utilização de equipamentos e materiais para realização do protocolo de indução artificial de cárie.

Ao Laboratório Experimental de Fisiologia, do Departamento de Fisiologia e Patologia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, coordenado pela Profa. Dra. Patricia Maria de Paula e em especial ao técnico do laboratório Silas, pela ajuda e apoio recebido na execução de parte desse trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Flávia de Annunzio, Odete Amaral, Dulce Helena de Oliveira, Sônia Maria Tircaillo (Soninha), Pedro César Alves, Diego Cardoso Pendenza e Antônio Parciaseppe pela amizade, convívio harmonioso, apoio, incentivo, carinho e disposição em sempre ajudar.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas, Marley Cristina Chiusoli Montagnoli, Disleide Silvia Valério Gounella, Adriano Ferreira Luiz, Eliane Maria Sanches Scarso, Maria Inês Carlos, Ana Cristina Jorge, Denise Floriano da Silva, Laudicélia Martins Arantes e Maria Aparecida Capella Carvalho, pela amizade, receptividade, orientação, eficiência e disponibilidade com que sempre me atenderam. Vocês são fundamentais!

Aos membros da banca do Exame Geral de Pré-Qualificação e Qualificação: Prof. Dr. Gelson Luis Adabo e Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro por prontamente aceitarem meu convite, pelo incentivo e sugestões.

A aluna de graduação Nájila Silva pela disponibilidade e colaboração em várias etapas deste trabalho.

Aos meus colegas de pós-graduação, Ana Carolina Mendes, Natália Domingues, Vinicius Krieger e Yasmin Albuquerque, pela convivência que tivemos neste tempo de curso.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão de bolsa de estudo (processo 2013/20412-1) e auxílio pesquisa (processo 2012/08866-4).

A todos os pacientes que atendi durante a graduação e o Mestrado. Vocês foram essenciais para o meu aprendizado inicial e aperfeiçoamento profissional.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram com a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

“Aquele que é poderoso para fazer infinitamente mais do que tudo quanto pedimos ou pensamos, conforme o seu poder que opera em nós... a Ele seja a glória.” (Efésios 3:20-21)

Obrigado Deus, por me ensinar todas as coisas. Por me permitir trilhar uma trajetória de excelência, pelos melhores cursos, pelos melhores sonhos, pelas melhores pessoas. Por guiar meus passos, por jamais ter me deixado só, por iluminar meu caminho e por provar, a cada dia, das mais variadas formas, que Seu amor é infinito, e que, portanto, vale à pena sonhar e acreditar!

*“Por Maior que sejam seus sonhos
O Sonho de Deus é maior
Ele sabe o que você pede
Mas o que Ele quer dar é melhor
Você hoje não pode entender,
Pois só pede o que cabe em suas mãos
Infinitos são os sonhos de Deus pra você.”*

*“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o
propósito debaixo do céu.*

Há tempo de nascer, e tempo de morrer;

Tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou;

Tempo de matar, e tempo de curar;

Tempo de derrubar, e tempo de edificar;

Tempo de chorar, e tempo de rir;

Tempo de prantear, e tempo de dançar;

Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras;

Tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar;

Tempo de buscar, e tempo de perder;

Tempo de guardar, e tempo de lançar fora;

Tempo de rasgar, e tempo de coser;

Tempo de estar calado, e tempo de falar;

Tempo de amar, e tempo de odiar;

Tempo de guerra, e tempo de paz.”

(Eclesiastes 3:1-8)

Delgado CC. Efeito de um primer experimental contendo carbodiimida na atividade de metaloproteinases, degradação do colágeno e da união resina-dentina. [Dissertação Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2015.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito da aplicação de um primer experimental contendo carbodiimida (EDC) na atividade total de metaloproteinases (MMPs), na degradação do colágeno dentinário e na estabilidade longitudinal da união resina-dentina. **Métodos:** Foram desenvolvidos dois estudos para responder aos objetivos do trabalho. **Estudo 1:** Cem espécimes de dentina (1x1x6mm) foram obtidos de molares permanentes humanos hígidos. Cinquenta espécimes foram condicionados com ácido fosfórico 37% e tratados por 60s com (n=10): água deionizada (controle), EDC 0,5 mol/L, primer experimental (PE), primer experimental com EDC (PE+EDC) ou primer do sistema Scotchbond MP (SBMP). Após lavagem, os espécimes foram submetidos a um teste colorimétrico (SenSolyte) para a análise da atividade total de MMP. Outros 20 espécimes foram submetidos a um protocolo de indução de cárie. Esses e os demais 20 espécimes mantidos hígidos foram completamente desmineralizados em ácido fosfórico 10% por 18h e tratados como descrito acima. Os espécimes foram armazenados em solução semelhante à saliva por 15 dias a 37°C, quando a saliva foi coletada para a quantificação de hidroxiprolina (HYP). Os dados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). **Estudo 2:** Superfícies planas de dentina foram produzidas em 32 molares permanentes hígidos. Os dentes foram condicionados por 15s e tratados (n=8) como descrito no estudo 1, com exceção da água deionizada. Após o tratamento, o adesivo do sistema SBMP foi aplicado sobre todos os dentes seguido da construção de um bloco em resina composta. Os dentes foram seccionados em espécimes com área de secção transversal de 0,81 mm², os quais foram armazenados em solução semelhante à saliva por 24h ou 6 meses previamente ao ensaio de microtração. Os dados em MPa foram submetidos aos testes de ANOVA a dois critérios fixos, Tukey e Qui-Quadrado (χ^2)($p < 0,05$). A análise dos tipos de fratura foi apenas descritiva. **Resultados:** Todos os tratamentos reduziram a atividade de MMPs, entretanto, os tratamentos com EDC 0,5 mol/L (92%) e o PE+EDC 0,5 mol/L (78%) foram superiores aos demais. Os dois tratamentos também foram capazes de reduzir a liberação de HYP, tanto para a dentina hígida como para a afetada por cárie. Os mesmos resultados

foram observados para o estudo 2, onde PE+EDC ($63,2\pm 9,3$ MPa) apresentou resistência de união imediata estatisticamente maior do que o grupo controle ($39,2\pm 11,2$ MPa), bem como a menor porcentagem de degradação após 6 meses (7,4% contra 18,9% do controle). Houve predomínio de fraturas adesivas para todos os grupos, sem associação entre o tipo de fratura e o tratamento ou o tempo de armazenamento. **Conclusão:** O primer experimental contendo EDC foi capaz de inibir a atividade de MMPs, a degradação do colágeno dentinário hígido e modificado pelo processo de cárie e de reduzir o processo de degradação da união resina-dentina após 6 meses de envelhecimento.

Palavras-chave: Colágeno. Dentina. Metaloproteinases da matriz. Etildimetilaminopropil carbodi-imida. Resistência à tração.

Delgado CC. Effect of an experimental primer containing carbodiimide on matrix metalloproteinases activity, collagen degradation and resin-dentin bond stability [Dissertação Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2015.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of an experimental primer containing EDC on the total matrix metalloproteinases (MMPs) activity, collagen degradation and resin-dentin bond stability. **Methods:** Two studies were developed to answer to the objectives of this dissertation. **Study 1:** One hundred dentin beams (1x1x6 mm) were obtained from sound human permanent molars. Fifty specimens were acid-etched with 37% phosphoric acid and treated for 60s with (n=10): deionized water (control), 0.5 mol/L EDC, experimental primer (EP), experimental primer with 0.5 mol/L EDC (EP+EDC) or Scotchbond MP primer (SBMP). After rinsing, the total MMP activity was assessed by a colorimetric assay (SenSolyte). Additionally, 20 specimens were subjected to a caries-inducing protocol. These and the remaining 20 sound specimens were completely demineralized in 10% phosphoric acid for 18h. The specimens were treated as mentioned above and stored in saliva-like solution for 15 days at 37°C. After this period, the saliva was collected for the quantification of hydroxyproline (HYP) release. MMP activity and HYP release were submitted to ANOVA and Tukey tests ($p < 0.05$). **Study 2:** Flat dentin surfaces were obtained from 32 sound third molars. The dentin was acid-etched for 15s and treated (n=8) as described in the study 1, except for deionized water. After treatment, the bond of SBMP was applied to all teeth and resin blocks were constructed. After 24h, the teeth were cut into specimens with 0.81 mm² of cross-sectional area, which were stored in saliva-like solution for 24h or 6 mo prior to microtensile testing. The bond strength values (MPa) were submitted to two-way ANOVA, Tukey and chi-square (χ^2) tests ($p < 0.05$). Types of fractures were descriptively analyzed. **Results:** All treatments reduced the activity of MMPs, however, 0.5 mol/L EDC (92%) and the EP+EDC (78%) were the most effective. Both treatments were also able to reduce HYP release from sound as well as caries-affected dentin. The same was observed for the second study, where EP+EDC (63.2±9.3MPa) presented immediate bond strength statistically higher than the control group (39.2±11.2MPa) and the smallest percentage of degradation after 6 mo (7.4% vs. 18.9% for control). Fractures were predominantly adhesive for all groups with no association between fracture type and

treatment or storage period. **Conclusion:** The EDC-containing experimental primer was able to inactivate MMPs, to decrease collagen cleavage on sound and caries-affected dentin and to reduce resin-dentin bond degradation after 6 months of aging.

Keywords: Collagen. Dentin. Etildimetilaminopropilcarbodiimide. Tensile strength. Matrix metalloproteinases.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 PROPOSIÇÃO	20
3 MATERIAL E MÉTODO	21
3.1 PUBLICAÇÃO 1	22
3.2 PUBLICAÇÃO 2	50
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
REFERÊNCIAS	77
ANEXO	82

1 INTRODUÇÃO

A complexidade do tecido dentinário desafia o estabelecimento e a estabilidade estrutural e funcional da união resina-dentina, comprometendo a longevidade das restaurações resinosas (Septier et al.³⁵, 2001; Embery et al.¹⁰, 2001). Degradação da camada híbrida pode ser observada subclínicamente tão cedo quanto 6 meses após seu estabelecimento (Hebling et al.¹⁵, 2005) e seu completo desaparecimento pode ocorrer em menos de quatro anos (Armstrong et al.³, 2004). Portanto, ainda é necessário melhorar a qualidade e a resistência da união resina-dentina aos processos de degradação enzimática e hidrolítica, principais responsáveis por sua falência funcional (Hashimoto et al.¹⁴, 2003; Zou et al.⁵⁰, 2010).

A desmineralização superficial é um procedimento fundamental no processo de adesão de polímeros resinosos à dentina. Realizada previamente a aplicação de um sistema adesivo convencional ou durante a aplicação de um sistema autocondicionante, a desmineralização da dentina expõe fibrilas de colágeno que servirão de arcabouço para o estabelecimento da camada híbrida (Nakabayashi et al.²⁴, 1985; Pereira et al.³⁰, 2007). Concomitantemente à remoção do conteúdo inorgânico da dentina, esse procedimento também libera proteases produzidas durante a biogênese do tecido e subsequentemente aprisionadas durante sua mineralização (Mazzoni et al.²⁰, 2006; Mazzoni et al.²¹, 2009). Entre estas proteases estão as metaloproteinases da matriz (MMPs), enzimas capazes de clivar o colágeno desprovido de sua proteção mineral e não encapsulado pelo adesivo (Tezvergil-Mutluay et al.³⁸, 2012). Essa degradação compromete a longevidade da união resina-dentina, a qual depende da integridade estrutural e das propriedades mecânicas do colágeno (Fawzy et al.¹¹, 2010).

A adesão à dentina afetada por cárie é ainda mais vulnerável do que a estabelecida em dentina hígida (Arrais et al.⁴, 2004; Kimochi et al.¹⁷, 1999; Yoshiyama et al.⁴⁶, 2000; Yoshiyama et al.⁴⁵, 2002) devido as características próprias desse substrato, como menor conteúdo mineral, menor capacidade tamponante e maior número de porosidades (Nakajima et al.²⁵1999; Wang et al.⁴³, 2007; Xie et al.⁴⁴, 1996; Zheng et al.⁴⁹, 2003). Estes fatores favorecem a difusão do condicionador ácido, aumentando a profundidade desmineralizada (Haj-Ali et al.¹², 2006; Xie et al.⁴⁴, 1996) e dificultando ainda mais a completa hibridização da zona de colágeno exposta (Nakajima et al.²⁶, 2000; Yoshiyama et al.⁴⁶, 2000).

A utilização de agentes capazes de, simultaneamente, inativar MMPs e melhorar as propriedades mecânicas do colágeno dentinário têm como objetivo tornar a camada híbrida mais estável longitudinalmente. A biomodificação ou reticulação do colágeno pelo aumento do número de ligações cruzadas (*cross-links*) inter-fibrilares, intra e intermoleculares, torna essa proteína mais resistente a degradação enzimática (Mi et al.²³, 2002; Han et al.¹³, 2003; Kasyanov et al.¹⁶, 2006; Bedran-Russo et al.⁶, 2007; Zeugolis et al.⁴⁸, 2009).

A reticulação do colágeno pode ser induzida pela aplicação de agentes químicos naturais como uvas, cacaus, cranberies e chá-verde ou sintéticos como o glutaraldeído e a carbodiimida (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida ou EDC). (Bedran-Russo et al.⁷, 2014). O EDC, é um isômero de cianamida estável, sem efeito citotóxico à células odontoblastóides (Scheffel et al.³², 2015), capaz de agregar aminoácidos em ligações peptídicas por meio da ativação do grupo carboxila dos ácidos glutâmico e aspártico presentes, não apenas nas moléculas de colágeno, mas também no sítio ativo das MMPs (Timkovich³⁹, 1977; Zeeman et al.⁴⁷, 1999; Scheffel et al.³⁴, 2014). Como resultado, são produzidas novas ligações cruzadas sem grupos reativos residuais (Olde Damink et al.^{27, 28}, 1996) as quais melhoram as propriedades mecânicas do colágeno ao mesmo tempo que inibem as MMPs por meio da redução de sua mobilidade, dificultando o acoplamento dessas enzimas ao sítio ativo do colágeno e sua ação de clivagem dessa proteína (Ekambaram et al.⁹, 2015; Mazzoni et al.¹⁹, 2014; Tjäderhane et al.⁴¹, 2013).

A aplicação de EDC a 0,5 mol/L por 60 segundos na dentina condicionada é capaz de inibir MMPs (Scheffel et al.^{33, 34}, 2014) e reduzir a degradação da união resina-dentina após 12 meses de envelhecimento (Scheffel et al.³¹, 2015). No entanto, nesses estudos, o EDC foi lavado da superfície dentinária após sua aplicação, ação esta que limita seu tempo de reação com as proteínas do substrato. A incorporação de EDC ao primer do sistema adesivo poderia resultar nos mesmos efeitos sobre o colágeno e MMPs, tendo a vantagem de, devido a sua permanência na interface, ser liberado gradualmente durante a lixiviação dos monômeros residuais e hidrogéis hidroliticamente instáveis mesmo após a polimerização do adesivo. Isso favoreceria a auto-preservação da camada híbrida e teria como benefício secundário a não incorporação de um passo adicional ao processo de adesão à dentina, uma vez que o *cross-linker* estaria presente no primer.

Dessa forma, é importante que sejam desenvolvidos, inicialmente, estudos laboratoriais para fundamentar a premissa de que a utilização do EDC incorporado a um primer seria efetivo na inibição de MMPs e no aumento da resistência do colágeno dentinário aos desafios impostos pelas condições inerentes à cavidade bucal. O desfecho final dessa nova proposta seria ampliar a longevidade de restaurações realizadas em resina composta, especialmente em situações nas quais o esmalte dentário não está presente para garantir uma adesão mais confiável.

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito da aplicação de um primer experimental contendo EDC na atividade total de MMP, na degradação do colágeno dentinário e na estabilidade da união resina-dentina.

PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS

Estudo1: Avaliar o efeito da aplicação de um primer experimental contendo EDC 0,5 mol/L na atividade total de MMPs e na degradação do colágeno dentinário hígido e modificado pelo processo de cárie.

Estudo2: Avaliar a influência de um primer experimental com EDC na degradação da união resina-dentina após 6 meses de envelhecimento.

3 MATERIAL E MÉTODO

Para responder a proposição geral desse trabalho, dois estudos independentes, porém sobre a mesma temática central, foram desenvolvidos. Esses estudos foram denominados Publicação 1 e Publicação 2.

3.1 PUBLICAÇÃO 1

ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E DEGRADAÇÃO DA MATRIZ DENTINÁRIA HÍGIDA E AFETADA POR CÁRIE TRATADA COM UM PRIMER EXPERIMENTAL CONTENDO EDC*

Título reduzido: Degradação do colágeno tratado com primer contendo EDC

Cláudia Cristina Delgado, DDS

Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP - Univ Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil. Rua Humaitá, 1680, Araraquara, São Paulo, Brasil, 14801-903. e-mail: claudia.ng@hotmail.com

Débora Lopes Salles Scheffel, DDS, MS, PhD

Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP - Univ Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil. Rua Humaitá, 1680, Araraquara, São Paulo, Brasil, 14801-903. e-mail: de_salles@yahoo.com.br

Nájila da Silva

Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP - Univ Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil. Rua Humaitá, 1680, Araraquara, São Paulo, Brasil, 14801-903. e-mail: najilasilva@foar.unesp.br

Carlos Alberto de Souza Costa, DDS, MS, PhD

Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil. Rua Humaitá, 1680, Araraquara, São Paulo, Brasil, 14801-903. e-mail: casouzac@foar.unesp.br

*Artigo formatado segundo as normas da revista Operative Dentistry

Josimeri Hebling, DDS, MS, PhD

Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP - Univ Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil. Rua Humaitá, 1680, Araraquara, São Paulo, Brasil, 14801-903. e-mail: jhebling@foar.unesp.br

PALAVRAS-CHAVE: dentina, colágeno, etildimetilaminopropil carbodiimida, ligações cruzadas, hidroxiprolina, metaloproteinases da matriz.

***Autor Correspondente:**

Profa. Dra. Josimeri Hebling

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil. 14801-903

Fone: (16) 3301 6334 Fax: (16) 3301 6329

e-mail: jhebling@foar.unesp.br

Relevância Clínica: O EDC pode ser incorporado a um primer sem que sua ação anti-MMP e de reticulação do colágeno seja prejudicada. Isso permite a utilização desse *cross-linker* sem a necessidade de aumento no número de passos do protocolo de adesão à dentina.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito de um primer experimental contendo carbodiimida (EDC) na atividade de MMPs e na degradação do colágeno dentinário hígido e modificado pelo processo de cárie. **Métodos:** Cem espécimes de dentina (1x1x6mm) foram obtidos de 35 molares permanentes hígidos. Cinquenta espécimes foram condicionados com ácido fosfórico 37% por 15s e tratados por 60s com (n=10): água deionizada (controle), EDC 0,5 mol/L, primer experimental, primer experimental com EDC 0,5 mol/L ou primer do sistema Scotchbond MP (SBMP). Após o tratamento, a análise da atividade total de MMPs foi observada por meio de teste colorimétrico (SenSolyte). Outros vinte espécimes foram submetidos a um protocolo microbiológico de indução de cárie. Esses e os restantes 20 espécimes mantidos hígidos foram completamente desmineralizados em ácido fosfórico a 10% por 18h. Após os mesmos tratamentos (n=8, 4 espécimes hígidos e 4 cariados), os espécimes foram armazenados em saliva artificial por 15 dias à 37°C, a qual foi coletada para a detecção de hidroxiprolina (HYP). Os dados foram submetidos aos testes de ANOVA e Tukey (p<0,05). **Resultados:** Todos os tratamentos foram capazes de reduzir a atividade de MMPs; entretanto, EDC 0,5 mol/L e o primer experimental com EDC foram superiores, com redução de 92% e 78%, respectivamente. Os dois tratamentos também foram capazes de reduzir a liberação de HYP tanto para a dentina hígida como para a dentina afetada por cárie.

Conclusão: A aplicação de EDC 0,5 mol/L na dentina condicionada, em solução ou na forma de primer, foi capaz de inibir a atividade das MMPs e a degradação do colágeno dentinário hígido e modificado pelo processo de cárie.

INTRODUÇÃO

A longevidade da interface adesiva é afetada negativamente pela ação combinada da água e de enzimas proteolíticas oriundas da própria dentina¹ ou de fontes exógenas como bactérias e saliva.² Desde 1982, quando Nakabayahi et al.³ demonstraram, pela primeira vez, a formação da camada híbrida e a retenção micromecânica existente entre as fibrilas de colágeno e o sistema adesivo, ainda não se conhece completamente a dinâmica de seu estabelecimento e degradação. Tem sido demonstrado que a degradação da união resina-dentina pode ser observada independente do sistema adesivo utilizado, sendo ele convencional ou autocondicionante,^{4,5} e que este processo ocorre basicamente em duas frentes (1) a clivagem do colágeno exposto e (2) a hidrólise da porção resinosa da interface adesiva.^{4,6}

Com a remoção do conteúdo mineral superficial da dentina pelo condicionamento ácido, o colágeno exposto fica completamente circundado por moléculas de água que preenchem os espaços antes ocupados por cristais de hidroxiapatita. A água mantém as fibrilas expandidas, preservando as vias de infiltração do sistema adesivo.^{3,4} Para a formação de uma camada híbrida perfeita, os monômeros resinosos deveriam se difundir pela rede úmida de colágeno, deslocando e substituindo completamente a água presente no substrato, encapsulando as fibrilas e as proteínas não colagenosas ali presentes.^{4,6} Assim, toda a região desmineralizada seria ocupada por polímeros e não haveria água disponível para possibilitar a hidrólise enzimática da matriz de dentina e tampouco para plastificar a porção resinosa da interface adesiva.^{4,6} No entanto, os monômeros do sistema adesivo não são capazes de infiltrar completamente a dentina desmineralizada, e a camada híbrida formada apresenta imperfeições.^{7,8,9} Além

disso, a elevada quantidade de água faz com que haja separação dos componentes do sistema adesivo em fases, de modo que os monômeros mais hidrófilos conseguem infiltrar a matriz dentinária em maior quantidade e profundidade, enquanto que os monômeros hidrófobos, que são maiores e capazes de formar polímeros mais estáveis e de melhor qualidade, ficam retidos na porção mais superior da dentina desmineralizada.⁶

As técnicas que objetivam desidratar o substrato sem proporcionar o colapso das fibrilas de colágeno, como a técnica úmida com etanol, não são completamente eficazes na remoção das moléculas de água da dentina. A aplicação de etanol 100% por 1 min sobre o colágeno desmineralizado remove somente cerca de 20% da água livre nos espaços interfibrilares, enquanto a acetona é capaz de remover 34,4% quando aplicada pelo mesmo período de tempo.¹⁰ A impossibilidade da infiltração completa dos monômeros e da remoção da água da dentina resulta na formação de uma camada híbrida porosa, com polímeros instáveis e áreas de colágeno exposto suscetíveis à ação das metaloproteinases da matriz dentinária (MMPs).^{11,12}

A degradação do colágeno responde por cerca de 43% da degradação total da união resina-dentina hídida¹³ e este número pode ser ainda mais significativo para a interface estabelecida sobre a dentina afetada por cárie. O processo cariioso reduz o conteúdo mineral e aumenta a porosidade da dentina intertubular, ampliando a profundidade de desmineralização quando do condicionamento ácido e, conseqüentemente, a quantidade de colágeno exposto na camada híbrida.¹⁴⁻¹⁶ Além disso, este substrato apresenta maior concentração de MMPs, acelerando a degradação do colágeno exposto na interface.^{2,11}

A inativação das MMPs previamente à aplicação do sistema adesivo por inibidores não específicos, como a clorexidina, tem mostrado resultados favoráveis

não apenas *in vitro*^{17,18} como também *in vivo*.¹⁹⁻²³ Entretanto, tem sido sugerido que essa substância é passível de sofrer lixiviação da camada híbrida, comprometendo sua efetividade a longo prazo.²³

Na busca de inibidores de proteases mais efetivos e duradouros, tem sido avaliada a utilização de agentes formadores ou promotores de ligações cruzadas (*cross-linkers*).²⁴⁻²⁹ Essas substâncias funcionam como fixadores de proteínas e podem, concomitantemente, inibir MMPs²⁸⁻³¹ e aumentar a rigidez das fibrilas de colágeno, tornando-as mais resistentes à degradação.^{26,27,29 32,33,34} Dentre os *cross-linkers* mais estudados, estão o glutaraldeído (GD), a proantocianidina (PA), a genipina (GE) e a 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC).^{26,27,28,35,36}

O EDC tem apresentado resultados promissores quanto à preservação da união resina-dentina ao longo do tempo^{29,37} e inativação de MMPs^{27,28,33} quando aplicado por períodos clinicamente viáveis como 30 ou 60 segundos.^{29,37} Este *cross-linker* não apresenta efeito citotóxico transdentinário³⁸ e é capaz de ativar o grupo carboxila dos ácidos glutâmico e aspártico presentes nas moléculas de colágeno e no sítio catalítico de proteases^{28,39} que ao reagirem com grupos amina da lisina ou hidroxilisina formam novas ligações peptídicas.^{40,41}

Os resultados benéficos do EDC têm sido demonstrados quando da sua aplicação como pré-tratamento da dentina condicionada, seguido de lavagem previamente a utilização do sistema adesivo.²⁹ No entanto, não há na literatura dados que mostrem se a ação do EDC seria influenciada se incorporado em um primer, com o objetivo de simplificar sua aplicação clínica assim como, e mais importante, prolongaria seu efeito protetor do colágeno. Desta maneira, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aplicação de um primer experimental contendo EDC na atividade de MMPs dentinárias e na degradação do colágeno dentinário

hígido e modificado pelo processo de cárie. A hipótese nula testada foi a de que o EDC não exerce efeito inibidor de MMPs e de proteção do colágeno frente à degradação enzimática quando incorporado a um primer experimental.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sessenta (n=35) terceiros molares permanentes humanos hígidos foram utilizados para este experimento mediante aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara (CAAE: 24705313.5.0000.5416) (Anexo). Os dentes foram coletados junto ao Banco de Dentes da mesma instituição e armazenados em timol 0,2% à 4°C até o momento da utilização.

Trinta e cinco discos de dentina de 1 mm de espessura foram obtidos no terço médio das coroas dos dentes selecionados (um disco por dente) por meio de cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA) equipada com disco de diamante de 0,3 mm de espessura (Diamond Wafering Blade, Buehler Ltd.), sob irrigação constante. Após inspeção em lupa estereoscópica (Mod SZX7, Olympus, São Paulo, Brasil), os discos foram seccionados para a produção de 100 espécimes em forma de palitos (2 a 3 espécimes por disco), sendo 70 deles com dimensões de 1x1x6 mm e 20 medindo 1x1x7 mm.

Produção da lesão artificial de cárie

Nos espécimes de dentina com 7 mm de comprimento foram produzidas lesões artificiais de cárie (n=20). Para isso, cada espécime foi fixado individualmente em uma base de resina composta, de tal forma que 1 mm de seu comprimento total ficou imerso na resina enquanto os 6 mm restantes ficaram livres

para o contato com o meio cariogênico. Cada base de resina foi transfixada com um fio ortodôntico para permitir que os palitos permanecessem suspensos no meio. Os espécimes foram embalados em envelopes próprios e esterilizados com óxido de etileno.

Repicagem de *Streptococcus mutans*

Cepas de *Streptococcus mutans* ATCC25175 (Coleção de Culturas Tropical Fundação André Toselo) foram mantidas congeladas até o momento de sua utilização. Trabalhando-se próximo à chama, foi realizada a repicagem dos microrganismos com duas alçadas, removendo-os do tubo de acondicionamento da cultura pura e inserindo-os em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio BHI caldo esterilizado (*Brain Heart Infusion*, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA). Após a agitação dos tubos por alguns segundos, os mesmos foram mantidos a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica (Estufa de Cultura FANEM Ltda. São Paulo, Brasil), em condições de microaerofilia, utilizando-se jarras de anaerobiose (PROBAC do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda., São Paulo, Brasil) com fechamento hermético.

Preparo do meio cariogênico e protocolo de indução de cárie artificial

Uma solução cariogênica contendo 100 mL de água destilada, 3,7 g de BHI (Brain Heart Infusion, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA), 1 g de glicose (D-Glucose Anidra, Synth; LabSynth, São Paulo, SP, Brasil), 2 g de sacarose (Cristalçúcar União, Cia União, São Paulo, Brasil) e 0,5 g de extrato de levedura (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA) foi preparada e esterilizada em autoclave a 120°C durante 20 minutos. Em seguida foi resfriada em

temperatura ambiente. Os espécimes de dentina foram transferidos dos envelopes para um béquer contendo a solução cariogênica (12,5 mL/espécime), na qual foram inoculados 2% do meio de cultura BHI caldo contendo *S. mutans* (100 µL). Finalmente, o béquer com os espécimes imersos e suspensos na solução cariogênica inoculada foi colocado em jarra de anaerobiose para crescimento em condições de microaerofilia, em estufa a 37°C.

O período total de contato da dentina com o meio cariogênico foi de 5 dias, sendo que a cada 48 horas, o meio cariogênico foi trocado por um recém-preparado, porém sem a inoculação de novos microrganismos. Concluído o protocolo de indução de cárie, o biofilme formado sobre os espécimes foi removido com gaze esterilizada e os espécimes foram abundantemente lavados em água corrente por aproximadamente 1 min.

Análise da atividade total de MMP

Para esta metodologia foram utilizados somente espécimes hígidos (n=50), uma vez que os espécimes afetados por cárie causaram o turvamento do substrato utilizado no teste colorimétrico, comprometendo a leitura da absorbância. Os espécimes foram condicionados com gel de ácido fosfórico 37% (Ultradent Products INC, South Jordan, Utah, EUA) por 15 s e lavados com água deionizada por 10 s. Após remoção do excesso de água com papel absorvente, os espécimes foram imersos por 60 s em: água deionizada (controle) (n=10) (pH=7,2); solução de EDC (Fluka, Sigma-Aldrich, MO, EUA) 0,5 mol/L (n=10) (pH=7,0); primer experimental (n=10) (pH=5,1); primer experimental com EDC 0,5 mol/L (n=10) (pH=6,3) ou primer do sistema Adper Scotchbond Multi Purpose (SBMP, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) (n=10) (pH=3,3). Segundo o fabricante (Material Safety Data Sheet -

MSDS), os principais componentes do SBMP são água (40-50%), HEMA (35-45%) e copolímeros dos ácidos acrílico e itacônico (10-20%). O primer experimental foi manipulado a partir da mistura manual de 50% vol de água deionizada e 50% vol de 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) (1,03 mL HEMA 97%/0,97 mL de água deionizada). Para o primer experimental contendo 0,5 mol/L EDC, 0,19g de EDC foram adicionados à mistura inicial.

Após os 60 s de tratamento, os espécimes foram lavados em água deionizada por 10 s. Para análise da atividade total de MMPs após o tratamento da dentina foram utilizados os componentes A (substrato colorimétrico) e C (tampão) do kit SensoLyte Generic MMP Assay (AnaSpec Inc, Fremont, CA, EUA). Os espécimes foram individualmente colocados em compartimentos de uma placa de cultura de 96 poços, contendo 100 µL de tampão (componente C). Em seguida, em cada compartimento foram pipetados 200 µL do substrato (100 µL do componente A + 4,9 mL do componente C). Três compartimentos adicionais foram preenchidos com essas soluções para servirem como branco. Após 60 minutos de incubação à 25°C, os espécimes foram removidos e a placa de 96 poços foi lida em espectrofotômetro (Synergy H1 Hybrid Reader, BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA) equipado com filtro para o comprimento de onda de 412 nm. A atividade total de MMPs foi determinada por meio dos valores de absorbância obtidos para cada poço subtraído do valor do branco, correspondente ao valor de absorbância apenas do substrato. A porcentagem de inativação de MMPs foi calculada por regra de três simples utilizando-se o grupo controle (água deionizada) como 100% de atividade total.

Liberação de hidroxiprolina (HYP)

Cinquenta espécimes hígidos e os 50 espécimes cariados foram

completamente desmineralizados em solução de ácido fosfórico 10% por 18 horas, sob agitação constante, e em temperatura de 4°C. Os espécimes foram tratados conforme descrito anteriormente (água deionizada, solução de EDC 0,5 mol/L, primer experimental, primer experimental com EDC 0,5 mol/L ou primer do sistema SBMP) e individualmente armazenados em tubos plásticos contendo 300µL de solução semelhante à saliva (KCl 0,062%; NaCl 0,085%; MgCl₂ 0,005%; CaCl₂ 0,016%, nipagin 0,2%; sorbitol líquido 6% e água destilada 200mL; pH=5,8) em banho-maria (Cienlab, CE-160, Campinas, São Paulo, Brasil), sob agitação, à 37°C, durante 15 dias.

Para análise do grau de degradação da matriz de dentina foi utilizado o teste de identificação de hidroxiprolina (HYP). Este aminoácido está presente na molécula de colágeno e corresponde a cerca de 11% da constituição total dessa proteína.⁴¹ Assim, a taxa de liberação de HYP no meio de armazenamento representa o grau de degradação do colágeno e foi mensurada por meio de um teste colorimétrico (Hydroxyproline Assay Kit, MAK 008, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). Cem microlitos da saliva artificial de cada recipiente foram coletados e colocados em um tubo eppendorf de 2 mL. À cada tubo também foram acrescentados 100 µL de ácido clorídrico (HCl) 37% (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). A solução com volume final de 200 µL foi mantida em banho seco (Kasvi, K80-D0, Taiwan) à 120°C, durante 3 horas, para hidrólise dos aminoácidos. Após este período, 5 mg de carvão ativado (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) foram adicionados em cada tubo e a suspensão foi centrifugada por 2 minutos a 13.000 G-force. Cinquenta microlitros do sobrenadante foram coletados e colocados em um poço de uma placa de 96 poços.

Na mesma placa de cultura, poços foram preenchidos com concentrações 0

(branco) 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 $\mu\text{g}/\text{poço}$ de HYP para construção da curva padrão. A placa foi levada à estufa à 60°C por 12 horas até a evaporação de todo o conteúdo dos poços. Então, 100 μL de uma solução de Cloramina T (6 μL de Cloramina T + 94 μL de tampão oxidante) foram acrescentados à cada poço e a placa foi mantida por 5 minutos em temperatura ambiente. Após este período, 100 μL da solução reagente DMAB (50 μL de DMAB + 50 μL de isopropanol) foram adicionados aos poços e a placa foi novamente mantida em estufa à 60°C, agora por 90 minutos. Finalmente, a absorvância de cada poço foi lida em espectrofotômetro (Synergy H1 Hybrid Reader, BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA) com comprimento de onda de 560 nm. A concentração final de HYP foi calculada em μg de HYP/mL com base nas concentrações da curva padrão. Essa análise foi realizada em duplicata, incluindo a curva padrão.

Análise Estatística

Os dados referentes às variáveis dependentes do estudo, atividade total de MMPs e liberação de hidroxiprolina apresentaram aderência a curva normal e homocedasticidade. Assim, foi aplicado o teste paramétrico de análise de variância a um fator fixo (tratamento) para atividade total de MMPs e a dois fatores fixos (tratamento e substrato) para a liberação de hidroxiprolina, complementados pelo teste de Tukey para comparação dos grupos aos pares. A decisão estatística foi tomada com base no nível de significância de 5%, ou seja, grupos foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Inibição da atividade total de MMPs

Na Figura 1 podem ser visualizados os dados referentes à inibição da atividade total de MMPs em espécimes de dentina hígida condicionados com ácido fosfórico, após os diferentes tratamentos. A atividade de MMPs para o grupo controle (água deionizada) foi considerada como 100%, e, portanto, não foram calculados os valores de redução para esse grupo. Os tratamentos exerceram efeito significativo na atividade total de MMPs da dentina (ANOVA, $p < 0,001$), uma vez que todos foram capazes de reduzir a atividade dessas proteases. O tratamento com EDC 0,5 mol/L (redução de 92%) foi superior aos tratamentos com o primer experimental (64%) e o primer do SBMP (59%). A incorporação desse *cross-linker* ao primer experimental não influenciou significativamente seu efeito inibidor de MMPs (primer experimental + EDC, 78%), uma vez que não houve diferença estatística entre a ação do EDC aplicado como solução ou incorporado ao primer (Figura 1).

Liberação de hidroxiprolina (HYP)

Dados de liberação de HYP do colágeno da dentina hígida e afetada por cárie, após diferentes tratamentos e armazenagem em saliva artificial por 15 dias, estão apresentados na Tabela 1. Ambos os fatores do estudo exerceram influência significativa na liberação de hidroxiprolina, “Substrato” ($p = 0,011$) e “Tratamentos” ($p < 0,001$), enquanto o mesmo não foi observado para a interação desses fatores ($p = 0,115$).

Quantidade significativamente maior de HYP foi liberada pelo colágeno afetado pelo processo carioso em comparação ao colágeno hígido (Tabela 1, linhas). O tratamento da dentina com EDC 0,5 mol/L reduziu a degradação do colágeno em ambos os substratos, e o fato desse *cross-linker* ter sido misturado com HEMA para

a produção de um primer experimental não afetou seu efeito protetor. Os primers experimentais sem EDC e do sistema adesivo Scotchbond MP também reduziram a liberação de HYP em relação ao controle, porém foram inferiores em efetividade quando comparados aos tratamentos contendo EDC (Tabela 1).

DISCUSSÃO

Esmalte e dentina são tecidos altamente mineralizados que se relacionam intimamente e desempenham, em conjunto, parte da função designada a cada elemento dental. Enquanto o esmalte atua como um isolante e protetor do meio hostil que é a cavidade bucal, a dentina oferece suporte e é capaz de absorver e distribuir os esforços mastigatórios, protegendo, de forma recíproca, o esmalte contra fraturas.^{42,43,44} A dentina é composta, em peso, por 70% de conteúdo mineral, 20% de conteúdo orgânico e 10% de água.⁴² O conteúdo mineral, constituído por cristais de hidroxiapatita, fornece a rigidez necessária.^{45,46} A matriz orgânica apresenta predominantemente colágeno tipo I (90% dessa fase) e algumas proteínas não-colagenosas,^{42,47} as quais proporcionam resistência à tração, ductilidade e dureza, à semelhança do que ocorre no tecido ósseo.^{48,49}

As fibrilas de colágeno são formadas a partir do agrupamento organizado de moléculas que se estabilizam interna e externamente por meio de ligações cruzadas covalentes. Estas ligações, também chamadas de *cross-links*, são formadas na fase final da biossíntese das fibrilas, ocorrem em resíduos específicos de lisina ou hidroxilisina⁴⁸ e promovem a viscoelasticidade e resistência do colágeno.⁵⁰ Apesar da presença de *cross-links* endógenos, quando as fibrilas são expostas pelo condicionamento ácido⁵¹ ou pelo processo de cárie² tornam-se susceptíveis à hidrólise mediada pelas MMPs.^{11,12,52} Essas proteases são liberadas e ativadas

durante a dissolução do conteúdo inorgânico da dentina^{11,12} e ligam-se às moléculas de colágeno clivando-as nos fragmentos $1/4$ e $3/4$ da ligação peptídica glicina/isoleucina.⁵³

O presente estudo investigou o efeito de um promotor de ligações cruzadas, o EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida), na inativação de MMPs dentinárias e no aumento da resistência do colágeno à degradação. Foi previamente demonstrado que esta substância, a 0,5 mol/L, não exerce efeitos citotóxicos à células do tipo odontoblastos quando aplicada em dentina com apenas 0,4 mm de espessura³⁸, é capaz de inibir MMPs^{27,28} e reduzir a degradação da união resina-dentina após 12 meses de envelhecimento.^{29,30} No entanto, em todos esses estudos, o EDC foi removido da dentina após 60 s. Isso implica no fato de que o colágeno e/ou as MMPs que não foram fixadas neste período, continuam viáveis para dar prosseguimento ao processo de degradação da interface adesiva.

Buscando oferecer uma alternativa mais duradoura de contato do EDC com as proteínas expostas na união resina-dentina, no presente estudo esse agente foi adicionado a um primer experimental contendo água deionizada e HEMA (50/50 % v.v). De acordo com os resultados observados, o primer contendo EDC foi tão eficiente quanto o tratamento com a solução de EDC em água em relação à inativação de MMPs e redução da degradação do colágeno dentinário após 15 dias de envelhecimento. Portanto, deve ser rejeitada a hipótese nula de que a associação do EDC a um primer experimental não exerceria efeito anti-MMP e de proteção do colágeno contra a degradação enzimática mediada por essas proteases. Estes são achados importantes que demonstram a ação efetiva desta substância mesmo na presença de HEMA. Entretanto, o primer experimental (água + HEMA) sem EDC também exerceu algum efeito redutor da atividade de MMPs, assim como o primer

do SBMP. Este fato pode ser explicado pelo potencial de compostos contendo grupos hidroxila, como o HEMA, serem capazes de inibir MMPs enquanto não polimerizados.⁵⁴ Esta inibição pode ocorrer por via alostérica, ou seja, pela ligação dos grupos OH⁻ ao sítio alostérico da enzima, ocasionando uma mudança conformacional que pode alterar as propriedades catalíticas ou de ligação dessa enzima ao substrato^{54,55}

A degradação da matriz da dentina é especialmente crítica para a dentina afetada por cárie em função das alterações físico-químico-mecânicas do substrato dentinário em resposta à evolução do processo carioso.^{16,56} Quando do condicionamento com ácido fosfórico observa-se uma maior profundidade de desmineralização,^{7,8,9,57} resultando no estabelecimento de uma camada híbrida mais porosa e com maior exposição de fibrilas de colágeno.^{16,44,56} A determinação da atividade total de MMPs nos espécimes submetidos ao processo biológico de formação de cárie não foi possível devido ao turvamento da solução utilizada para tal finalidade quando em contato com esses espécimes. Portanto, os resultados de qualquer teste colorimétrico não seriam confiáveis. Entretanto, a liberação de hidroxiprolina pelas fibrilas de colágeno alteradas pelo processo carioso foi significativamente maior do que a liberação observada para a dentina hígida. Quando o EDC foi incorporado ao primer experimental ou aplicado em forma de solução, a degradação do colágeno foi reduzida de forma significativa para ambos os substratos.

A efetividade do EDC sobre a redução da degradação do colágeno, observada pela menor concentração de hidroxiprolina no meio de armazenamento para os grupos tratados com solução de EDC ou com o primer experimental contendo EDC, na dentina hígida e também afetada por cárie, pode ser explicada

pelo mecanismo de ação desta substância. Este *cross-linker* é capaz de reagir com o grupo carboxila dos ácidos glutâmico e aspártico presentes na estrutura e no sítio ativo das MMPs e também do colágeno dentinário^{27,28,39} resultando na redução da mobilidade molecular.³³ Isso dificulta o acoplamento da enzima na fibrila de colágeno, reduzindo assim sua atividade proteolítica.⁵⁸ Ao mesmo tempo, as novas ligações cruzadas formadas melhoram as propriedades mecânicas do colágeno, dificultando sua clivagem pelas enzimas que não foram inativadas.^{26, 27, 28}

Portanto, a associação do EDC com HEMA e água para a formação de um primer com capacidade de aumentar o número de ligações cruzadas do colágeno e ao mesmo tempo inibir MMPs é possível e não compromete a ação deste *cross-linker*. No entanto, períodos mais longos de avaliação ainda são necessários para demonstrar a duração desses efeitos.

CONCLUSÃO

Dentro das limitações do estudo e de acordo com os resultados obtidos, pode ser concluído que, assim como o EDC em solução, o primer experimental contendo EDC 0,5 mol/L foi eficaz na inativação de MMPs e na redução da degradação do colágeno dentinário hígido e modificado pelo processo de cárie.

AGRADECIMENTOS

Os autores reconhecem a generosa contribuição e agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de estudo (Processo nº 2013/20412-1) e auxílio pesquisa (Processo nº 2012/08866-4).

REFERÊNCIAS

1. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R & De Stefano Dorigo (2008) Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface *Dental Materials* **24(1)** 90-101.
2. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M & Salo T (1998) The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions *Journal of Dental Research* **77(8)** 1622-1629.
3. Nakabayashi N, Kojima K & Masuhara E (1982) The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates *Journal of Biomedical Materials Science Research* **16(3)** 265–273.
4. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M & Tezvergil-Mutluay A (2011) State of the art etch-and-rinse adhesives *Dental Materials* **27(1)** 1-16.
5. Anchieta RB, Machado LS, Martini AP, Santos PH, Giannini M, Janal M, Tovar N, Sundfeld RH, Rocha EP & Coelho PG (2015) Effect of long-term storage on nanomechanical and morphological properties of dentin-adhesive interfaces *Dental Materials* **31(2)** 141-153.
6. Tjäderhane L (2015) Dentin bonding: can we make it last? *Operative Dentistry* **40(1)** 4-18.
7. Nakabayashi N, Watanabe A & Arao T (1998) A tensile test to facilitate identification of defects in dentine bonded specimens *Journal of Dentistry* **26(4)** 379-385.
8. Hashimoto M, Ohno H, Endo K, Kaga M, Sano H & Oguchi H (2000) The effect of hybrid layer thickness on bond strength: demineralized dentin zone of the hybrid layer *Dental Materials* **16(6)** 406-411.

9. Wang Y & Spencer P (2003) Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding *Journal of Dental Research* **82(2)** 141-145.
10. Agee KA, Prakki A, Abu-Haimed T, Naguib GH, Nawareg MA, Tezvergil-Mutluay A, Scheffel DL, Chen C, Jang SS, Hwang H, Brackett M, Grégoire G, Tay FR, Breschi L & Pashley DH (2015) Water distribution in dentin matrices: bound vs. unbound water *Dental Materials* **31(3)** 205-216.
11. Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Pääkkönen V, Martins MT, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, Salo T & Tjäderhane L (2010) Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex *Journal of Endodontics* **36(3)** 475-481.
12. Zhang SC & Kern M (2009) The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives *International journal of oral science* **1(4)** 163–176.
13. Hu L, Xiao YH, Fang M, Gao Y, Huang L, Jia AQ & Chen JH (2015) Effects of type I collagen degradation on the durability of three adhesive systems in the early phase of dentin bonding *PloS one* **10(2)** e0116790.
14. Arrais CA, Giannini M, Nakajima M & Tagami J (2004) Effects of additional and extended acid etching on bonding to caries-affected dentine *European Journal of Oral Sciences* **112(5)** 458-464.
15. Haj-Ali R, Walker M, Williams K, Wang Y & Spencer P (2006) Histomorphologic characterization of noncarious and caries-affected dentin/adhesive interfaces *Journal of Prosthodontics* **15(2)** 82-88.
16. Wang Y, Spencer P & Walker MP (2007) Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy *Journal of Biomedical Materials Research part A* **81(2)** 279-86.

17. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L, Ruggeri A Jr, Tay FR, Dorigo ED & Pashley DH (2010) Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study *Dental Materials* **26(4)** 320-325.
18. Gendron R, Grenier D, Sorsa T & Mayrand D (1999) Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine *Clinical Diagnosis and Laboratory Immunology* **6(3)** 437-439.
19. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L & Tay FR (2005) Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo *Journal of Dental Research* **84(8)** 741-746.
20. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L & Pashley D (2007) In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine *Journal of Dental Research* **86(6)** 529-533.
21. Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dip A, Sword RJ & Pashley DH (2007) The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo *Operative Dentistry* **32(2)** 107-11.
22. Brackett MG, Tay FR, Brackett WW, Dip A, Dipp FA, Mai S & Pashley DH (2009) In vivo chlorhexidine stabilization of an acetone-based dentin adhesives *Operative Dentistry* **34(4)** 381-385.
23. Ricci HA, Sanabe ME, de Souza Costa CA, Pashley DH & Hebling J (2010) Chlorhexidine increases the longevity of in vivo resin-dentin bonds *European Journal of Oral Sciences* **118(4)** 411-416.
24. Al-Amr A, Drummond JL & Bedran-Russo AK (2009) The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength *Journal Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials* **91(1)** 419-424.

25. Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, McAlpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, Aguiar TR, Vidal CM, Napotilano JG, Nam JW & Leme AA (2014) Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications *Dental Materials* **30(1)** 62-76.
26. Bedran-Russo AK, Vidal CM, Dos Santos PH & Castellan CS (2010) Long-term effect of carbodiimide on dentin matrix and resin-dentin bonds *Journal Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials* **94(1)** 250-255.
27. Scheffel DL, Hebling J, Scheffel RH, Agee KA, Cadenaro M, Turco G, Breschi L, Mazzoni A, Costa CA & Pashley DH (2014) Stabilization of dentin matrix after cross-linking treatments, in vitro *Dental Materials* **30(2)** 227-233.
28. Scheffel DL, Hebling J, Scheffel RH, Agee K, Turco G, de Souza Costa CA & Pashley D (2014) Inactivation of matrix-bound matrix metalloproteinases by cross-linking agents acid-etched dentin *Operative Dentistry* **39(2)** 152-158.
29. Scheffel D, Delgado C, Soares DG, Basso F, de Souza Costa CA, Pashley D & Hebling J (2015) Increased Durability of Resin-Dentin Bonds Following Cross-Linking Treatment *Operative Dentistry* In press.
30. Mazzoni A, Apolonio FM, Saboia VP, Santi S, Angeloni V, Checchi V, Curci R, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH & Breschi L (2014) Carbodiimide inactivation of MMPs defect on dentin bonding *Journal of Dental Research* **93(3)** 263-268.
31. Sabatini C, Scheffel DL, Scheffel RH, Agee KA, Rouch K, Takahashi M, Breschi L, Mazzoni A, Tjäderhane L, Tay FR & Pashley DH (2014) Inhibition of endogenous human dentin MMPs by Gluma *Dental Materials* **30(7)** 752-758.
32. Bedran-Russo AK, Pashley DH, Agee K, Drummond JL & Miescke KJ (2008) Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen cross-

linkers *Journal Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials* **86(2)** 330-334.

33. Tezvergil-Mutluay A, Mutluay MM, Agee KA, Seseogullari-Dirihan R, Hoshika T, Cadenaro M, Breschi L, Vallittu P, Tay FR & Pashley DH (2012) Carbodiimide cross-linking inactivates soluble and matrix-bound MMPs, in vitro *Journal of Dental Research* **91(2)** 192-196.

34. Mazzoni A, Angeloni V, Apolonio FM, Scotti N, Tjäderhane L, Tezvergil-Mutluay A, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH & Breschi L (2013) Effect of carbodiimide (EDC) on the bond stability of etch-and-rinse adhesive systems *Dental Materials* **29(10)** 1040-1047.

35. Sung HW, Chang WH, Ma CY & Lee MH (2003) Crosslinking of biological tissues using genipin and/or carbodiimide *Journal of Biomedical Materials Research part A* **64(3)** 427-438.

36. Castellan CS, Bedran-Russo AK, Antunes A & Pereira PN (2013) Effect of dentin biomodification using naturally derived collagen cross-linkers: one-year bond strength study *International Journal of Dentistry* **10.1155/2013/918010**.

37. Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, Pashley DH & Breschi L (2015) Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability *Journal of Dental Research* **94(2)** 241-251.

38. Scheffel DL, Bianchi L, Soares DG, Basso FG, Sabatini C, de Souza Costa CA, Pashley DH & Hebling J (2015) Transdental cytotoxicity of carbodiimide (EDC) and glutaraldehyde on odontoblast-like cells *Operative Dentistry* **40(1)** 44-54.

39. Zeeman R, Dijkstra PJ, van Wachem PB, van Luyn MJ, Hendriks M, Cahalan PT & Feijen J (1999) Successive epoxy and carbodiimide cross-linking of dermal sheep collagen *Biomaterials* **20(10)** 921-931.

40. Olde Damink LH, Dijkstra PJ, van Luyn MJ, van Wachem PB, Nieuwenhuis P & Feijen J (1996) In vitro degradation of dermal sheep collagen cross-linked using a water-soluble carbodiimide *Biomaterials* **17(7)** 679-684.
41. Olde Damink LH, Dijkstra PJ, van Luyn MJ, van Wachem PB, Nieuwenhuis P & Feijen J (1996) Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide *Biomaterials* **17(7)** 765-773.
41. Traub W & Piez KA (1971) The chemistry and structure of collagen In: Anfinsen CB, Edsalla JT, Richards FM *Advances in Protein Chemistry*, New York 245.
42. Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH & Balooch M (1997) The dentin substrate: structure and properties related to bonding *Journal of Dentistry* **25(6)** 441-458.
43. Pashley DH & Carvalho RM (1997) Dentine permeability and dentine adhesion. *Journal of Dentistry* **25(5)** 355-372.
44. Pereira PN, Nunes MF, Miguez PA & Swift EJ Jr (2006) Bond strengths of a 1-step self-etching system to caries-affected and normal dentin *Operative Dentistry* **31(6)** 677-681.
45. Septier D, Hall RC, Embery G & Goldberg M (2001) Immunoelectron microscopic visualization of pro- and secreted forms of decorin and biglycan in the predentin and during dentin formation in the rat incisor *Calcified tissue international* **69(1)** 38-45.
46. Embery G, Hall R, Waddington R, Septier D & Goldberg M (2001) Proteoglycans in dentinogenesis *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **12(4)** 331-349.
47. Boskey AL (1991) The role of extracellular matrix components in dentin mineralization *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **2(3)** 369-387.

48. Saito M & Marumo K (2010) Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus *Osteoporosis International* **21(2)** 195-214.
49. Seeman E & Delmas PD (2006) Bone quality the material and structural basis of bone strength and fragility *The New England journal of medicine* **354(21)** 2250-2261.
50. Yamauchi M. Collagen Biochemistry: An Overview (2000) In: Phillips GO *Advances in Tissue Banking*, New Jersey 455–500.
51. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM & Ito S (2004) Collagen degradation by host-derived enzymes during aging *Journal of Dentistry Research* **83(3)** 216-221.
52. Matee MIN, Mikx FHM, Maselle SYM, & Van Palenstein Helderma WH (1992) Mutans streptococci and Lactobacilli in breast-fed children with rampant caries *Caries Research* **26(3)** 183-187.
- 53.** Perumal S, Antipova O & Orgel JP (2008) Collagen fibril architecture, domain organization, and triple-helical confirmation govern its proteolysis *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105(8)** 2824-2829.
54. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Uchiyama T, Imazato S, Mutluay MM, Cadenaro M, Breschi L, Nishitani Y, Tay FR & Pashley DH (2011) The inhibitory effects of quaternary ammonium methacrylates on soluble and matrix-bound MMPs *Journal of Dental Research* **90(4)** 535-540.

55. Sela-Passwell N, Rosenblum G, Shoham T & Sagi (2010) Structural and functional bases for allosteric control of MMP activities: can it pave the path for selective inhibition? *Biochimica et Biophysica Acta* **1803(1)** 29-38.
56. Erhardt MC, Toledano M, Osorio R & Pimenta LA (2008) Histomorphologic characterization and bond strength evaluation of caries-affected dentin/resin interfaces: effects of long-term water exposure *Dental Materials* **24(6)** 786-798.
57. Spencer P, Wang Y & Katz JL (2004) Identification of collagen encapsulation at the dentin/adhesive interface *The Journal of Adhesive Dentistry* **6(2)** 91-95.
58. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, Tezvergil-Mutluay A, Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR & Pashley DH (2013) Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins *Dental Materials* **29(1)** 116-135.

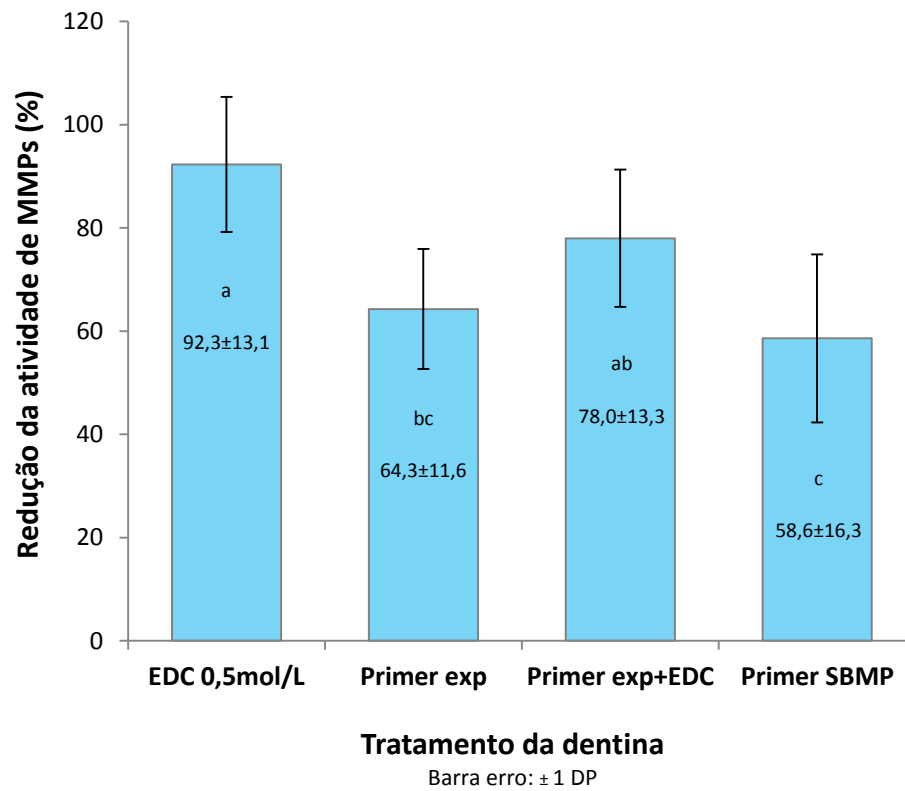


Figura 1. Porcentagem média (n=10) da redução da atividade de MMPs após diferentes tratamentos da dentina hígida condicionada com ácido fosfórico. O grupo controle foi considerado como 100% da atividade total de MMPs, e portanto, 0% de redução dessa atividade. As demais porcentagens de inibição foram calculadas com base nesse grupo. Médias identificadas por letras iguais indicam ausência de diferença estatística (Tukey, $p > 0,05$). Exp: experimental; EDC: carbodiimida; SBMP: Adper Scotchbond Multi Purpose.

Tabela 1. Quantidade de hidroxiprolina ($\mu\text{g/mL}$) liberada na saliva artificial após armazenamento por 15 dias de espécimes de dentina hígida e de dentina afetada por cárie, submetidos a diferentes tratamentos.

TRATAMENTO DA DENTINA	SUBSTRATO	
	<i>Dentina hígida</i>	<i>Dentina afetada por cárie</i>
Controle (água)	3,34 \pm 0,42 ^{B, a}	4,19 \pm 1,65 ^{A, a}
EDC 0,5 mol/L	0,71 \pm 0,07 ^{B, c}	0,56 \pm 0,26 ^{A, c}
Primer experimental	2,11 \pm 0,96 ^{A, b}	2,34 \pm 0,92 ^{A, b}
Primer experimental + EDC	0,41 \pm 0,21 ^{B, c}	0,97 \pm 0,38 ^{A, c}
Primer SBMP	1,17 \pm 0,54 ^{B, b}	3,23 \pm 0,64 ^{A, b}

Números são média \pm desvio-padrão, n=4. ^ALetras maiúsculas permitem comparações nas linhas, para cada tratamento da dentina, enquanto que ^a letras minúsculas permitem comparações nas colunas, dentro de cada tipo de substrato. Médias identificadas com letras iguais não diferem estatisticamente (Tukey, $p>0,05$). EDC: carbodiimida; SBMP: Adper Scotchbond Multi Purpose.

3.2 PUBLICAÇÃO 2

PRESERVAÇÃO DA UNIÃO-RESINA DENTINA UTILIZANDO UM PRIMER EXPERIMENTAL CONTENDO CARBODIIMIDA (EDC)*

Cláudia Cristina Delgado, DDS

Mestranda em Odontopediatria, *Departamento de Clínica Infantil*. Procedimentos técnicos, aquisição e interpretação dos dados, preparação e redação do manuscrito. Faculdade de Odontologia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil. Rua Humaitá, 1680, Araraquara, São Paulo, Brasil, 14801-903.

Débora Lopes Salles Scheffel, DDS, MS, PhD

Pós-doutoranda em Odontopediatria, *Departamento de Clínica Infantil*.

Contribuição científica e intelectual, concepção e delineamento, procedimentos técnicos e revisão crítica. Faculdade de Odontologia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil. Rua Humaitá, 1680, Araraquara, São Paulo, Brasil, 14801-903.

Carlos Alberto de Souza Costa, DDS, MS, PhD

Professor Titular, *Departamento de Fisiologia e Patologia*. Contribuição científica e intelectual. Faculdade de Odontologia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil. Rua Humaitá, 1680, Araraquara, São Paulo, Brasil, 14801-903.

*Artigo Formatado segundo as normas da revista Journal of Adhesive Dentistry

Josimeri Hebling, DDS, MS, PhD

Professor Adjunto, *Departamento de Clínica Infantil*. Contribuição científica e intelectual, concepção e delineamento, interpretação dos dados, análise estatística e revisão crítica. Faculdade de Odontologia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil. Rua Humaitá, 1680, Araraquara, São Paulo, Brasil, 14801-903

***Autor Correspondente:**

Profa. Dra. Josimeri Hebling

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Rua Humaitá, 1680 Araraquara, SP, Brasil. 14801-903

Fone: (16) 3301 6334 Fax: (16) 3301 6329

e-mail: jhebling@foar.unesp.br

Palavras-chave: colágeno, cárie dentária, ligações cruzadas, etildimetilaminopropilcarbodiimida, resistência à tração, nanoinfiltração.

RESUMO

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

Objetivo: Avaliar a influência de um primer experimental contendo EDC na degradação da união resina-dentina. **Métodos:** Superfícies planas de dentina foram produzidas em 32 molares hígidos. A dentina foi condicionada com ácido fosfórico 37% por 15s e tratada com (n=8): primer do sistema Scotchbond MP (SBMP); solução de EDC 0,5 mol/L por 60 s; primer experimental ou primer experimental contendo EDC 0,5 mol/L. Após o tratamento, o adesivo do sistema SBMP foi aplicado sobre todos os dentes e foram construídos blocos em resina composta. Decorridas 24h, foram obtidos espécimes com área de secção transversal de 0,81mm², os quais foram aleatoriamente armazenados em solução semelhante à saliva por 24h ou 6 meses previamente ao ensaio mecânico de microtração. Os valores de resistência de união (MPa) foram submetidos ao teste de ANOVA e Tukey (p<0,05). As fraturas foram classificadas em adesiva, mista ou coesiva, e analisadas pelo teste de qui-quadrado (χ^2). **Resultados:** O tratamento da dentina com o primer experimental, contendo (63,2±9,3MPa) ou não EDC (56,0±7,3MPa), resultou em resistência de união imediata estatisticamente maior do que o grupo controle (39,2±11,2MPa). Adicionalmente, o primer experimental contendo EDC foi capaz de reduzir a degradação da união resina-dentina mesmo após 6 meses de envelhecimento. Nenhuma associação foi encontrada entre o tipo de fratura e os fatores do estudo. **Conclusão:** O tratamento da dentina com primer experimental contendo EDC 0,5 mol/L foi capaz de reduzir o processo de degradação da união resina-dentina após 6 meses de envelhecimento.

INTRODUÇÃO

A despeito da melhoria das propriedades mecânicas, físicas e químicas dos sistemas adesivos ao longo dos anos,²² esses materiais ainda são incapazes de infiltrar completamente a dentina condicionada e proteger a matriz orgânica após a remoção do conteúdo mineral pelo condicionamento com ácido fosfórico ou monômeros acidificados.² A formação da camada híbrida é um processo complexo e envolve a interação entre fibrilas de colágeno, cristais de hidroxiapatita residuais, proteínas não-colagenosas e monômeros resinosos.^{10,20}

O agente condicionador fornece à dentina íons hidrogênio (H^+) que ao reagirem com íons hidroxila (OH^-) promovem a dissolução dos cristais de hidroxiapatita [$Ca_5OH(PO_4)_3$], o qual por ser um sal, se dissocia liberando íons cálcio (Ca^{+2}) e fosfato (PO_4^{-3}). Ao final do condicionamento ácido, a lavagem remove estes íons e deixa as fibrilas de colágeno e as proteínas não colagenosas expostas, imersas em meio aquoso.²² Finalmente, com a aplicação do sistema adesivo, monômeros resinosos com diferentes tamanhos moleculares e graus de hidrofília infiltram o substrato úmido.

O monômero mais comum presente nos sistemas adesivos é o hidroxietil metacrilato (HEMA), o qual apresenta baixo peso molecular (130 Da) e parece ser infinitamente solúvel em água, com parâmetro de solubilidade de Hoy para ligação de hidrogênio (δ_h) de $15,2 \text{ MPa}^{1/2}$, próximo ao δ_h intrínseco ($14,8 \text{ MPa}^{1/2}$) dos grupos funcionais presentes no colágeno, capazes de formar ligações de hidrogênio entre si.²³ No entanto, o HEMA forma polímeros

lineares, de menor qualidade mecânica e estabilidade, por ser um monômero hidrófilo.³⁴

Monômeros hidrófobos como o trietilenoglicol dimetacrilato (TEGDMA) e o bisfenol glicil dimetacrilato (Bis-GMA) formam polímeros mais resistentes e duráveis.^{26,34} No entanto, seu maior peso molecular e menor afinidade pela água fazem com que fiquem concentrados na porção superior da camada híbrida, deixando a porção inferior desse biocomposto instável e com regiões de colágeno não infiltrado. Essas regiões são suscetíveis ao sinergismo dos fenômenos de degradação hidrolítica e enzimática⁷ mediada principalmente pelas metaloproteinases da matriz dentinária (MMPs).²⁴ A degradação das fibrilas de colágeno expostas na união adesiva representa 43% do processo de deterioração da interface adesiva.¹⁴

A degradação do colágeno pode levar a redução da resistência de união entre o substrato dentinário e o material restaurador, culminando na falha da restauração adesiva.³² A molécula de colágeno tipo I, principal proteína da matriz dentinária, tem uma conformação estereométrica composta por duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$.³⁸ Estas unidades são estabilizadas por ligações cruzadas (*cross-links*) presentes a nível molecular, microfibrilar e até mesmo fibrilar.^{4,12,37} Estas ligações peptídicas são fundamentais para a manutenção das características peculiares ao colágeno como viscoelasticidade e resistência.³⁸ A reticulação do colágeno, por meio da formação de novos *cross-links*, tem sido proposta como um mecanismo para a obtenção de uma matriz dentinária com melhores propriedades mecânicas e com maior resistência à degradação enzimática.³⁵

Uma interface adesiva ideal deveria ser capaz de se auto-preservar.³ Fixadores como o glutaraldeído, a carbodiimida (EDC) e a proantocianidina, por aumentarem o número de ligações presentes no colágeno dentinário, contribuem para a auto-preservação da união resina-dentina, melhorando as propriedades mecânicas da matriz orgânica e inibindo a ação das MMPs.^{3,16,17,27,28,30,31,33} No entanto, os protocolos investigados até o momento incluem o enxague desses agentes após determinado tempo de aplicação e antes da utilização do sistema adesivo.

Para que a auto-preservação da união resina-dentina ocorra é necessário que esses agentes *cross-linkers* permaneçam acessíveis ao colágeno durante a vida útil da restauração. Desta forma, este estudo sugere a utilização do EDC, um isômero de carbodiimida capaz de se unir aos ácidos glutâmico e aspártico presentes no colágeno e nas MMPs^{3,33,16, 31} formando ligações covalentes estáveis, como constituinte de um primer experimental. Assim, mesmo após a polimerização do sistema adesivo, o EDC poderia se movimentar através da membrana semi-permeável formada e continuaria acessível às proteínas na camada híbrida. Portanto, o objetivo do presente trabalho é avaliar a influência de um primer experimental contendo EDC na resistência de união imediata e em longo prazo de um sistema adesivo de três passos à dentina hígida. A hipótese nula testada foi a de que a aplicação de um primer experimental contendo EDC não é capaz de reduzir a degradação da união resina-dentina em longo prazo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trinta e dois terceiros molares humanos hígidos foram utilizados para este experimento após sua aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara (CAAE: 24705313.5.0000.5416) (Anexo). Os dentes foram obtidos junto ao Banco de Dentes da mesma instituição e armazenados em timol 0,2% à 4^oC até o momento da utilização.

O terço oclusal da coroa de todos os dentes foi removido com cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA) equipada com disco de diamante de 0,3 mm de espessura (Diamond Wafering Blade, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA), sob constante irrigação. Superfícies planas em dentina foram obtidas e inspecionadas em lupa estereoscópica (Mod SZX7, Olympus, São Paulo, Brasil) para a certificação da ausência de esmalte sobre a superfície de dentina. Em seguida, os dentes foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, de acordo com o tratamento aplicado sobre a dentina condicionada: primer do sistema adesivo Scotchbond MP (SBMP, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) (n=8) (pH=3,3); solução de EDC 0,5 mol/L (n=8) (pH=7,0); primer experimental (50% vol HEMA+50% vol água, pH=5,1) (n=8) e primer experimental contendo EDC 0,5 mol/L (n=8) (pH=6,3).

Procedimentos adesivos

A superfície de dentina foi condicionada com ácido fosfórico 35% (Scotchbond Etchant, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) por 15 s, seguido de lavagem abundante com água deionizada por 10 segundos e secagem com papel absorvente. No grupo controle foi aplicado o primer do SBMP de acordo com as instruções do fabricante, seguido da evaporação do solvente por 5 segundos com leve jato de ar (10 cm de distância da superfície). Para os

dentos pertencentes ao grupo do EDC, a dentina condicionada foi tratada por 60s com solução de EDC 0,5 mol/L (20 μ L) preparado em água deionizada, seguido de lavagem por 10 s, remoção do excesso de água com papel absorvente e aplicação do primer do SBMP. Nos grupos tratados com o primer experimental contendo ou não EDC, a dentina condicionada foi saturada com 20 μ L dos primers, seguido de evaporação do solvente por 5 segundos com leve jato de ar. Em todos os grupos, finalizado o tratamento da dentina, foram aplicadas 2 camadas do adesivo (*bond*) do SBMP, seguido de fotoativação por 10 s com o aparelho Radium Plus (SDI Limited, Bayswater, Victoria, Austrália). Finalizada a aplicação do sistema adesivo, foi confeccionado um bloco de resina composta (Filtek Z350, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) cor A3,5. Três incrementos de 1mm foram aplicados e fotoativados individualmente por 20 s. Os dentes foram armazenados por 24 h imersos em água destilada, à 37°C.

Ensaio Mecânico de Microtração

Após 24h dos procedimentos adesivos, os dentes foram cortados em cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) com disco de diamante (Diamond Wafering Blade, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA), sob irrigação constante, para a obtenção de espécimes de dentina em forma de paralelogramos (palitos), com área de secção transversal de $0,81 \pm 0,02 \text{mm}^2$. Essa área foi mensurada para todos os espécimes com um paquímetro digital (Mod. 500- 144b, Mytutoyo Sul Americana Ltda., SP, BR). Em seguida, os espécimes de cada dente foram aleatoriamente divididos em 2 grupos, os quais foram tracionados após 24h ou 6 meses após envelhecimento em solução semelhante à saliva (KCl 0,062%; NaCl 0,085%; MgCl₂ 0,005%; CaCl₂ 0,016%,

nipagin 0,2%; sorbitol líquido 6% e água destilada 200mL; pH=5,8). A solução semelhante à saliva teve seu pH monitorado mensalmente, por seleção amostral de 30%, com auxílio de um pHmetro (modelo 8010, Qualxtron, São Paulo, SP, Brasil).

Para a determinação da resistência de união (MPa), 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). O dispositivo metálico foi adaptado à máquina de ensaios mecânicos (DL-Digital Line, EMIC, Paraná, Brasil) para o teste de microtração, atuando com velocidade de 1,0 mm/min e equipada com célula de carga de capacidade máxima de 200 N.

O dente foi considerado como unidade experimental, e para tanto, foi obtido o valor médio simples de resistência de união entre os espécimes pertencentes ao mesmo dente. Falhas prematuras foram consideradas como resistência de união zero (0 MPa). O número final de repetições utilizado na análise estatística foi 8 para cada tratamento/período de envelhecimento.

Análise das Fraturas

Imediatamente após o teste de microtração, as metades obtidas de cada espécime foram analisadas em estereomicroscópio (Mod SZX7, Olympus, São Paulo, Brasil) em aumento de 30x. As fraturas foram classificadas em: coesiva da resina ou dentina, adesiva ou mista.

Análise Estatística

Os dados de resistência de união (MPa) apresentaram distribuição normal (Kolmogorov-Smirnov, $p=0,069$) e os grupos foram homocedásticos (Levene, $p=0,051$). Portanto, o teste de análise de variância (ANOVA) a dois critérios fixos (“Tratamento da dentina condicionada” e “Período de envelhecimento”) foi aplicado a esses dados, seguido do teste de Tukey para comparação dos grupos aos pares. O teste de qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para analisar a associação entre as variáveis descritas acima e os tipos de fratura. Todos os testes estatísticos foram considerados ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Resistência de União

Ambos os fatores de variação do estudo exerceram efeito estatisticamente significativo sobre os valores de resistência de união (Tratamento da dentina condicionada, $p=0,005$; Período de envelhecimento, $p<0,0001$), não havendo interação significativa entre eles ($p=0,899$). Os dados de resistência de união em função desses fatores estão apresentados na Tabela 1. No período de 24 h, os grupos tratados com o primer experimental apresentaram valores de resistência de união estatisticamente maiores do que o grupo controle, independentemente da adição ou não de EDC em sua composição. Maiores valores de resistência de união também foram observados para o primer contendo EDC em comparação ao EDC sozinho aplicado sobre a dentina condicionada, sendo que este último foi comparável

aos valores observados para o grupo controle (Tabela 1, coluna 24 horas). Redução significativa da resistência de união após 6 meses de envelhecimento foi observada apenas para os espécimes do grupo controle (redução de 26,4%) e para os tratados com o primer experimental sem EDC (12,3%), quando comparados aos espécimes tratados com o mesmo primer, analisados em 24 h (Figura 1).

Uma vez que os valores iniciais de resistência de união não foram iguais entre os grupos, os valores de 6 meses foram transformados em porcentagem utilizando a média de resistência de união obtida no período inicial (24 horas) como 100%. Dessa forma foi possível comparar os tratamentos no período de 6 meses (Figura 1). Após 6 meses de envelhecimento em solução semelhante à saliva, os grupos onde a dentina foi tratada com EDC, quer seja em sua forma pura ou adicionado ao primer experimental, apresentaram maiores valores de resistência de união do que o grupo controle, sem diferença entre eles. A porcentagem de redução da resistência de união para os grupos de EDC foi inferior a 5%, enquanto que para o grupo controle foi de 26,4% (Tabela 1).

Análise dos tipos de fraturas

A distribuição dos tipos de fraturas, incluindo as falhas prematuras, segundo os tratamentos da dentina condicionada e períodos de envelhecimento está apresentada na Tabela 2. O predomínio das fraturas adesivas foi observado para todos os grupos, independente do tratamento. O teste de χ^2 não revelou haver associação entre o tipo de tratamento ou período de envelhecimento e o tipo de fratura ($p=0.236$). Falhas prematuras foram

pouco frequentes, e observadas apenas em 4 dos 8 grupos experimentais (Tabela 2).

DISCUSSÃO

O arranjo estrutural da dentina e suas propriedades físicas e químicas interferem diretamente no processo de formação da interface adesiva.⁵ Devido à presença de água e ao empacotamento denso das moléculas de colágeno, os monômeros do sistema adesivo encontram dificuldades para infiltrar a dentina desmineralizada e encapsular as proteínas ali presentes.⁶ A reposição completa dos cristais de hidroxiapatita por polímeros levaria ao estabelecimento de uma camada híbrida perfeita, formada por aproximadamente 70% resina e 30% colágeno completamente envolvido por polímeros.²² No entanto, somente cerca 75% da água presente na dentina após o condicionamento ácido é livre e passível de deslocamento por diferentes solventes, enquanto os 25% restantes estão fortemente ligados ao colágeno e são de difícil remoção mesmo em situações extremas de desidratação.¹

Nas condições encontradas no momento do estabelecimento da camada híbrida, a pressão de vapor da água é de 40 mmHg, a qual é ainda mais reduzida com a adição dos monômeros do sistema adesivo, dificultando sobremaneira sua evaporação.^{8,25} Portanto, a remoção da umidade da dentina é inviável em um curto período de tempo. Mesmo com a adição de etanol 100% ou acetona à este substrato, somente 25-35% da água livre presente na rede de colágeno desmineralizado é removida.¹ Uma vez que a presença de água na união-resina dentina é um fato ainda não possível de ser alterado clinicamente, assim como a incompleta infiltração do sistema adesivo e a

exposição de colágeno no interior da camada híbrida,^{13,21,36} a busca pela maior durabilidade das interfaces adesivas deve envolver estratégias compatíveis com a umidade local.

O pré-tratamento da dentina condicionada com *cross-linkers* tem sido investigado com o objetivo de aumentar as propriedades mecânicas do colágeno e torná-lo mais resistente à clivagem por colagenases e gelatinases dentinárias.^{3,16,17,27,28,30,31,33} Alguns desses agentes também são capazes de inibir proteases, como as MMPs, e não apresentam efeito citotóxico quando aplicados sobre um remanescente de dentina que simula aquele presente em preparos cavitários profundos (0,4 mm).^{29,30,31} Assim, quando da utilização desses agentes, mesmo na presença de umidade, a matriz de colágeno continua duplamente protegida da degradação (1) pelo aumento de sua rigidez e (2) pela inativação das proteases dentinárias.³¹

O EDC (0,5 mol/L), *cross-linker* investigado no presente estudo, quando aplicado sobre a dentina após o condicionamento ácido por 60 s e depois lavado, é eficaz na redução da mobilidade e inativação das MMPs³⁰ e na preservação da união resina-dentina mesmo após 12 meses de envelhecimento.²⁸ Entretanto, na tentativa de fornecer uma fonte mais durável de EDC à camada híbrida, o presente estudo propôs a utilização de um primer experimental composto por 50% vol. água, 50% vol. HEMA e EDC 0,5 mol/L. Testes preliminares (dados não incluídos) demonstraram que este primer experimental é capaz de inativar MMPs e reduzir a degradação do colágeno dentinário quando aplicado por 60 s, significando que a mistura com HEMA não interfere negativamente nas propriedades deste *cross-linker*. Os resultados obtidos quanto à resistência de união imediata e após 6 meses de

envelhecimento demonstraram que os grupos tratados com o primer experimental, contendo (63,2±9,3 MPa) ou não EDC (56,0±7,3 MPa), apresentaram resistência de união imediata estatisticamente maior do que o grupo controle (39,2±11,2 MPa), sendo que os maiores valores foram observados para o primer experimental contendo EDC (Tabela 1). Embora o SBMP seja considerado um padrão-ouro entre os sistemas adesivos, seu desempenho foi inferior ao primer experimental independente da presença de EDC. O fabricante deste sistema adesivo não disponibiliza a composição exata do produto, bem como a concentração de cada componente. Assim, é possível que a combinação 50% água + 50% HEMA (composição do primer experimental) tenha sido por si só favorável à qualidade da camada híbrida formada. Pode ser apenas sugerido que o primer apresentado neste estudo pode conter maior concentração de HEMA que o primer comercial, favorecendo a formação polimetilmetacrilato (poliHEMA). Além disso, o primer experimental foi utilizado imediatamente após sua manipulação o que pode ter favorecido a estabilidade do monômero quando da sua aplicação. Estudos futuros sobre as propriedades dessa mistura são necessários para melhor entendimento desses resultados, incluindo, por exemplo, sorção de água, grau de conversão monomérica e umectabilidade.

Os maiores valores de resistência de união imediata foram observados para o grupo do primer experimental contendo EDC. Este achado pode ser consequência dos fatores citados acima para o bom desempenho do primer experimental associados à melhora das propriedades mecânicas das fibrilas de colágeno proporcionada pelo EDC. Este *cross-linker* ativa o grupo carboxila dos ácidos glutâmico e aspártico presentes nas moléculas de colágeno,

formando um produto intermediário denominado O-acilisourea, que ao se ligar a um grupo amina livre de uma cadeia proteica adjacente produz uma nova ligação peptídica.³³ Além disso, o tratamento da dentina com *cross-linkers* parece reduzir a hidrofília da dentina, alterando o conteúdo e a dinâmica da água no tecido, o que favorece a infiltração e polimerização do adesivo.¹⁵

Após 6 meses de envelhecimento em solução semelhante à saliva os espécimes tratados com o primer experimental contendo EDC apresentaram os maiores valores de resistência de união ($58,5 \pm 7,9$ MPa) e também uma baixa porcentagem de degradação da interface adesiva (4,9%) em relação aos dados de 24 h. Portanto, a hipótese nula de que o primer experimental com EDC não seria capaz de reduzir a degradação da união resina-dentina foi rejeitada. Os mesmos resultados positivos foram observados para o tratamento por 60 s com EDC em solução. Esses resultados deixam claro o efeito positivo desta substância na preservação da união resina-dentina. Ao aumentar a rigidez do colágeno pela formação de novas ligações peptídicas³ o EDC dificulta o desentrelaçamento das cadeias polipeptídicas do colágeno, de tal modo que o sítio ativo das MMPs não consegue acomodar a região a ser clivada.^{9,11,19} Além disso, ao reagir com os ácidos glutâmico e aspártico presentes nestas proteases, o EDC causa um enrijecimento da sua estrutura tridimensional limitando sua mobilidade³⁰ e acesso do sítio ativo às cadeias polipeptídicas da molécula de colágeno.¹⁹

Desta forma, os resultados do presente estudo demonstram que a incorporação de EDC a um primer experimental pode reduzir a degradação do colágeno na camada híbrida sem prejudicar a resistência de união imediata nem mesmo comprometer a efetividade do agente *cross-linker*. A utilização

deste primer na prática clínica poderia favorecer a longevidade de restaurações adesivas, enquanto que, secundariamente, elimina a necessidade de um passo adicional para a aplicação do EDC. Entretanto, ainda são necessários novos trabalhos que avaliem a efetividade deste produto em períodos mais longos, bem como a taxa de liberação de EDC no meio após polimerização do sistema adesivo.

CONCLUSÃO

O EDC foi efetivo em prevenir a degradação da união resina-dentina quando incorporado à um primer experimental. Portanto, a presença de HEMA não interferiu na capacidade desse *cross-linker* de inibir a atividade das proteases dentinárias e de formar ligações cruzadas, tornando o colágeno mais resistente a degradação.

RELEVÂNCIA CLÍNICA

A exposição de fibrilas de colágeno na interface adesiva ocorre, entre outros fatores, devido à incompleta infiltração da dentina condicionada pelo adesivo. A utilização de um primer contendo EDC protege essas fibrilas dos mecanismos de degradação, prolongando a longevidade da união resina-dentina.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de estudo (Processo nº 2013/20412-1) e auxílio pesquisa (Processo nº 2012/08866-4).

REFERÊNCIAS

1. Agee KA, Prakki A, Abu-Haimed T, Naguib GH, Nawareg MA, Tezvergill-Mutluay A, Scheffel DL, Chen C, Jang SS, Hwang H, Brackett M, Grégoire G, Tay FR, Breschi L, Pashley DH. Water distribution in dentin matrices: bound vs. unbound water. *Dent Mater* 2015; 31:205-216.
2. Anchieta RB, Machado LS, Martini AP, Santos PH, Giannini M, Janal M, Tovar N, Sundfeld RH, Rocha EP, Coelho PG. Effect of long-term storage on nanomechanical and morphological properties of dentin-adhesive interfaces. *Dent Mater* 2015; 31:141-153.
3. Bedran-Russo AK, Vidal CM, Dos Santos PH, Castellan CS. Long-term effect of carbodiimide on dentin matrix and resin-dentin bonds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010; 94:250-255.
4. Bedran-Russo AKB, Pereira PNR, Duarte WR, Drumond JL, Yamauchi M. Application of cross-linkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007; 80:2268-272.
5. Bedran-Russo AKB, Yoo KJ, Ema KC, &Pashely DH. Mechanical properties of tannic-acid-treated dentin matrix. *J Dent Res* 2009; 88:807-811.
6. Bertassoni LE, Marshall GW, Swain MV. Mechanical heterogeneity of dentin at different length scales as determined by AFM phase contrast. *Micron* 2012; 43:1364-71.

7. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano E. Dental adhesion review: Aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater* 2008; 24:90-101.
8. Cadenaro M, Breschi L, Rueggeberg FA, Suchko M, Grodin E, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH. Effects of residual ethanol on the rate and degree of conversion of five experimental resins. *Dent Mater* 2009; 25: 621–628.
9. Chung L, Dinakarandian D, Yoshida N, Lauer-Fields JL, Fields GB, Visse R, Nagase H. Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis. *EMBO J* 2004; 23:3020-3030.
10. Dos Santos PH, Karol S, Bedran-Russo AK. Long-term nano-mechanical properties of biomodified dentin–resin interface components. *J Biomech* 2011; 44:1691–1694.
11. Gioia M, Monaco S, Fasciglione GF, Coletti A, Modesti A, Marini S, Coletta M. Characterization of the mechanisms by which gelatinase A, neutrophil collagenase, and membrane-type metalloproteinase MMP-14 recognize collagen I and enzymatically process the two alpha-chains. *J Mol Biol* 2007; 368: 1101-1113.
12. Han B, Jaurequi J, Tang BW, Nimni ME. Proanthocyanidin: A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J Biomed Mater Res A* 2003; 65:118-124.
13. 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; 16:406-11.

14. Hu L, Xiao YH, Fang M, Gao Y, Huang L, Jia AQ, Chen JH. Effects of type I collagen degradation on the durability of three adhesive systems in the early phase of dentin bonding. *PLoS One* 2015; 10: e0116790.
15. Leme AA, Vidal CM, Hassan LS, Bedran-Russo AK. Potential role of surface wettability on the long-term stability of dentin bonds after surface biomodification. *J Biomech* 2015; 48:2067-2071.
16. Mazzoni A, Angeloni V, Apolonio FM, Scotti N, Tjäderhane L, Tezvergill-Mutluay A, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. Effect of carbodiimide (EDC) on the bond stability of etch-and-rinse adhesive systems. *Dent Mater* 2013; 29:1040-1047.
17. Mazzoni A, Apolonio FM, Saboia VP, Santi S, Angeloni V, Checchi V, Curci R, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. Carbodiimide inactivation of MMPs defect on dentin bonding. *J Dent Res* 2014; 93: 263-268.
18. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, Toledano M, Pashley EL, Tay FR. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials* 2006; 27:4470-4476.
19. Nagase H, Fushimi K. Elucidating the function of non-catalytic domains of collagenases and aggrecanase. *Connect Tissue Res* 2008; 49:169-174.
20. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res* 1982; 16:265–273.

21. Nakabayashi N, Watanabe A, Arao T. A tensile test to facilitate identification of defects in dentine bonded specimens. *J Dent.* 1998; 26: 379-385.
22. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater* 2011; 27:1-16.
23. Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, et al. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *Am J Dent.* 2007; 20: 7-2.
24. 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; 83:216-21.
25. Pashley EL, Zhang Y, Lockwood P, Rueggeberg F, Pashley DH. Effects of HEMA on water evaporation from water-HEMA mixtures. *Dent Mater* 1998;14:6-10.
26. Peutzfeldt A. Resin composites in dentistry:the monomer systems. *Eur J Oral Sci* 1997; 105:97-116.
27. Sabatini C, Scheffel DL, Scheffel RH, Agee KA, Rouch K, Takahashi M, Breschi L, Mazzoni A, Tjäderhane L, Tay FR, Pashley DH. Inhibition of endogenous human dentin MMPs by Gluma. *Dent Mater* 2014; 30:752-758.
28. Scheffel D, Delgado C, Soares DG, Basso F, de Souza Costa CA, Pashley D, Hebling J. Increased Durability of Resin-Dentin Bonds Following Cross-Linking Treatmen. *Oper Dent* 2015 (in press).

29. Scheffel DL, Bianchi L, Soares DG, Basso FG, Sabatini C, de Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Transdental cytotoxicity of carbodiimide (EDC) and glutaraldehyde on odontoblast-like cells. *Oper Dent* 2015; 40:44-54.
30. Scheffel DL, Hebling J, Scheffel RH, Agee K, Turco G, de Souza Costa CA, Pashley D. Inactivation of matrix-bound matrix metalloproteinases by cross-linking agents acid-etched dentin. *Oper Dent* 2014; 39:152-158.
31. Scheffel DL, Hebling J, Scheffel RH, Agee KA, Cadenaro M, Turco G, Breschi L, Mazzoni A, Costa CA, Pashley DH. Stabilization of dentin matrix after cross-linking treatments, in vitro. *Dent Mater* 2014; 30: 227-233.
32. Tay FR, Hashimoto M, Pashley DH, Peters MC, Lai SC, Yiu CK, et al. Aging affects two modes of nanoleakage expression in bonded dentin. *J Dent Res*. 2003; 82:537-41.
33. Tezvergil-Mutluay A, Mutluay MM, Agee KA, Seseogullari-Dirihan R, Hoshika T, Cadenaro M, Breschi L, Vallittu P, Tay FR, Pashley DH. Carbodiimide cross-linking inactivates soluble and matrix-bound MMPs, in vitro. *J Dent Res* 2012; 91:192-196.
34. Van Landuyt K, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, Coutinho E, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials* 2007; 28:3757-3785.
35. Wallace DG, Rosenblatt J. Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 1631–1649.

36. Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res* 2003; 82: 141-145.
37. Yamauchi M. Collagen biochemistry: an overview. In: Phillips GO (ed). *Advances in tissue banking*. New Jersey: World Scientifica, 2000: 455-500.
38. Yamauchi M, Shiiba M. Lysine hydroxylation and cross-linking of collagen. *Methods in Molecular Biology* 2008; 446:95–108.

Tabela 1. Resistência de união ao substrato dentinário após tratamento da dentina condicionada com solução de EDC ou primer experimental contendo ou não esse agente, em função do tempo de envelhecimento.

Tratamento da dentina condicionada	Período de envelhecimento		% Redução da resistência de união ***
	24 horas	6 meses**	
Primer SBMP	39,2 ± 11,2 ^c —*—	30,8 ± 7,2	26,4
EDC	44,0 ± 5,4 ^{bc}	40,2 ± 8,0	3,8
Primer EXP	56,0 ± 7,3 ^{ab} —*—	49,1 ± 3,5	12,3
Primer EXP+EDC	63,2 ± 9,3 ^a	58,5 ± 7,9	4,9

Números são média ± desvio-padrão, n=8. ^aLetras permitem comparações entre tratamentos no período de 24 horas. Grupos identificados pela mesma letra não diferem estatisticamente. (Tukey, p>0,05). Nas linhas, grupos conectados pelo asterisco são estatisticamente diferentes. **Grupos não foram diretamente comparados aos 6 meses uma vez que a resistência de união inicial (24 horas) foi diferente entre eles.

SBMP = Scotchbond MultiPurpose; EDC = carbodiimida 0,5 mol/L; EXP = experimental

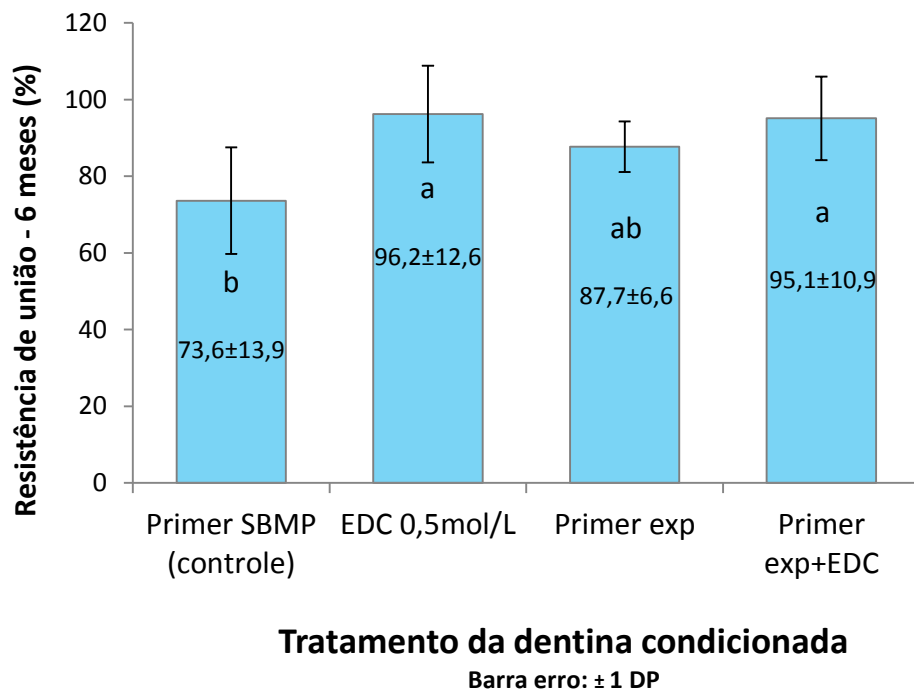


Figura 1. Porcentagem de resistência de união, em relação ao período de 24 horas (considerado 100%), após tratamento da dentina condicionada com EDC ou primer experimental contendo ou não esse agente, e envelhecimento por 6 meses. Colunas representam médias e barras de erro representam desvios-padrões, n=8. Grupos identificados com as mesmas letras não diferem estatisticamente (Tukey, $p>0,05$).

Tabela 2. Distribuição dos tipos de fratura segundo tratamentos da dentina hígida e período de envelhecimento.

Tratamento da dentina condicionada	Período de envelhecimento	
	24 horas	6 meses
Primer SBMP	A=19 (76)*; M=1 (4); CR=2(8); FP=3 (12)	A=21 (80,8); M=2 (7,7); FP=3 (11,5)
EDC	A=25 (83,3); M=1 (3,3); CR=2 (6,6); FP=2 (6,6)	A=24 (80); CR=1 (3,3); CD=2(6,7)FP=3 (10)
Primer EXP	A=23 (92); CD=2 (8)	A=25 (89,3); CR=1(3,6); CD=2 (7,1)
Primer EXP+EDC	A=17 (63); CR=6 (22,2); CD=4 (14,8)	A=20 (66,7); CR=7(23,3); CD=3 (10)

A = adesiva; M = mista; CR = coesiva de resina; CD = coesiva de dentina; FP = falha prematura.

* Valores representam a frequência absoluta (porcentagem do total de espécimes no grupo, %).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os procedimentos restauradores adesivos dependem do estabelecimento da camada híbrida, um biocomposto formado por resina e matriz de dentina (Tjäderhane et al.⁴², 2015). A literatura tem relatado a impossibilidade clínica da produção de uma camada híbrida perfeita, na qual todo o conteúdo mineral removido é completamente substituído por monômeros do sistema adesivo, apresentando aproximadamente 70% de resina e 30% de colágeno (Pashley et al.²⁹, 2011; Tjäderhane et al.⁴², 2015). Isto ocorre, em parte, devido ao conteúdo aquoso presente no substrato dentinário, o qual limita a infiltração do adesivo, permite a separação de fase dos monômeros, compromete a conversão polimérica e, conseqüentemente, favorece a exposição de fibrilas de colágeno no interior da camada híbrida, interferindo negativamente na longevidade da interface adesiva (Pashley et al.²⁹, 2011; Takahashi et al.³⁷, 2013; Agee et al.¹, 2015; Tjäderhane et al.⁴², 2015).

A matriz de dentina apresenta predominantemente colágeno tipo I, mas também contem proteínas não-colagenosas, como as metaloproteinases da matriz (MMPs). Estas enzimas têm a capacidade de clivar as terminações não helicoidais das moléculas de colágeno a partir da inserção de moléculas de água em sua estrutura (por isso classificadas como hidrolases), resultando na hidrólise da porção orgânica exposta na interface adesiva e no enfraquecimento da resistência da união entre resina e dentina (Pashley et al.²⁹, 2011; Tjäderhane et al.⁴², 2015; Tjäderhane et al.⁴⁰, 2015). Assim, a inativação das MMPs, bem como a melhora das propriedades mecânicas do colágeno dentinário, poderia levar a maior durabilidade da interface adesiva.

Existem substâncias, denominadas de *cross-linkers*, capazes de reagir quimicamente com as proteínas da dentina e de formar novas ligações cruzadas entre os aminoácidos presentes nestas moléculas. Estas substâncias, embora por meio de mecanismos de ação diferentes, tem um propósito em comum que é a fixação do tecido dentinário desmineralizado (Bedran-Russo et al.⁵, 2010; Tezvergil-Mutluay et al.³⁸, 2012; Scheffel et al.³⁴, 2014; Seseogullari-Dirihan et al.³⁶, 2015). A utilização dos *cross-linkers* é relativamente simples e segue o mesmo protocolo clínico atualmente vigente para a aplicação de clorexidina. Após o condicionamento ácido da dentina, o colágeno exposto é

tratado com o *cross-linker* de escolha por um período de tempo pré-determinado (Scheffel et al.³¹, 2015; Castellan et al.⁸, 2013; Al-Ammar et al.², 2009; Mazzoni et al.¹⁸, 2013).

Embora existam vários *cross-linkers*, obtidos de fontes naturais como uvas, cacaus, cranberies e chá-verde, ou sintéticas como o glutaraldeído e a carbodiimida (EDC) (Bedran-Russo et al.⁷, 2014), somente algumas destas substâncias tem suas propriedades bem documentadas. O EDC foi o *cross-linker* selecionado para os experimentos que constituem esta dissertação devido à sua capacidade já relatada de inibir MMPs (Tezvergil-Mutluay et al.³⁶, 2012; Scheffel et al.³¹, 2014), melhorar as propriedades mecânicas do colágeno (Bedran-Russo et al.⁵, 2010; Scheffel et al.³⁴, 2014) e prevenir a degradação da interface adesiva ao longo do tempo (Scheffel et al.³¹, 2015; Mazzoni et al.²², 2015) sem apresentar efeitos tóxicos à células do tipo odontoblasto, mesmo quando aplicado sobre um remanescente de dentina (0,4 mm) representativo de preparos cavitários profundos (Scheffel et al.³², 2015). A incorporação desta substância à um primer experimental teve por objetivo principal investigar um método de disponibilização prolongada de EDC para reagir com o colágeno durante a funcionalidade da interface adesiva. Secundariamente, não seria necessário um passo adicional durante o procedimento restaurador, exclusivamente para a aplicação do EDC. Assim, no presente trabalho foi avaliado o efeito de um primer experimental contendo EDC sobre a atividade de MMPs e a degradação do colágeno dentinário hígido e modificado pelo processo de cárie (Estudo I), e também sua influência na resistência de união imediata e em longo prazo (Estudo II).

No primeiro estudo demonstrou-se a capacidade do primer experimental contendo EDC de reduzir em 78% a atividade de MMPs na dentina hígida, bem como de desacelerar a degradação do colágeno dentinário na dentina hígida e modificada pelo processo de cárie, não diferindo estatisticamente do grupo tratado com a solução de EDC 0,5 mol/L. Desta forma, pôde-se concluir que a associação HEMA e EDC é possível, sem afetar negativamente a formação de ligações cruzadas.

Uma vez demonstrada a manutenção dos efeitos anti-MMP e de biomodificação do colágeno promovidos pelo EDC mesmo incorporado a um primer experimental, o segundo estudo investigou a eficiência desse primer

quanto ao seu desempenho adesivo imediato e após 6 meses de envelhecimento da união resina-dentina. Assim, a mistura 50% vol. água, 50% vol. HEMA e EDC 0,5 mol/L foi utilizada previamente ao adesivo do sistema adesivo Scotchbond MP. Os resultados observados foram altamente satisfatórios ($63,2 \pm 9,3$ MPa), superando o próprio grupo controle ($39,2 \pm 11,2$ MPa) em termos de resistência de união imediata. O primer com EDC também foi eficiente quanto a redução da taxa de degradação da interface adesiva. Redução de 5,9% nos valores de resistência de união foi registrada quando esse primer foi utilizado, em comparação à redução de 26,4% observada para o grupo controle após 6 meses de envelhecimento.

Como conclusão geral, levando em consideração os resultados obtidos em cada estudo conjuntamente, a incorporação do EDC 0,5 mol/L a um primer experimental exerceu efeito benéfico na preservação da matriz de dentina, na inativação das MMPs e na estabilidade da interface adesiva. Dessa maneira, tal associação demonstrou ser promissora na obtenção de camadas híbridas mais resistentes ao fenômeno de degradação. Entretanto, mais estudos *in vitro* e, principalmente, *in vivo* são necessários para ratificar os resultados obtidos neste trabalho.

REFERÊNCIAS*

1. 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.
2. Al-Ammar A, Drummond JL, Bedran-Russo AK. The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 91(1):419-24.
3. Armstrong SR, Vargas MA, Chung I, Pashley DH, Campbell JA, Laffoon JE et al. (2004) Resin–dentin interfacial ultrastructure and microtensile dentin bond strength after five-year water storage *Oper Dent.* 2004; 29(6):705-12.
4. Arrais CA, Giannini M, Nakajima M, Tagami J. Effects of additional and extended acid etching on bonding to caries-affected dentine. *Eur J Oral Sci.* 2004; 112(5):458-64.
5. Bedran-Russo AK, Vidal CM, Dos Santos PH, Castellan CS. Long-term effect of carbodiimide on dentin matrix and resin-dentin bonds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010; 94(1):250-5.
6. Bedran-Russo AK, Pereira PN, Duarte WR, Drummond JL, Yamauchi M. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007; 80(1): 268-72.
7. Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, McAlpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, Aguiar TR, Vidal CM, Napotilano JG, Nam JW, Leme AA. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. *Dent Mater.* 2014; 30(1):62-76
8. Castellan CS, Bedran-Russo AK, Antunes A, Pereira PN. Effect of dentin biomodification using naturally derived collagen cross-linkers: one-year bond strength study. *Int J Dent.* 2013; 2013:918010.
9. Ekambaram M, Yiu CK, Matinlinna JP. Effect of solvents on dentin collagen Cross-linking potential of Carbodiimide. *J Adhes Dent.* 2015; 17(3):219-26.
10. Embery G, Hall R, Waddington R, Septier D, Goldberg M. Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001; 12(4):331-49.
11. Fawzy AS. Variations in collagen fibrils network structure and surface dehydration of acid demineralized intertubular dentin: Effect of dentin depth and air exposure time. *Dent Mater.* 2010; 26(1):35-43.
12. Haj-Ali R, Walker M, Williams K, Wang Y, Spencer P. Histomorphologic characterization of noncarious and caries-affected dentin/adhesive interfaces. *J Prosthodont.* 2006; 15(2):82-8.

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


13. Han B, Jaurequi J, Tang BW, Nimni ME. Proanthocyanidin: A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 65(1):118-24.
14. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. *Biomaterials*. 2003; 24(21):3795-803.
15. 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.
16. Kasyanov V, Isenburg J, Draughn RA, Hazard S, Hodde J, Ozolanta I et al. Tannic acid mimicking dendrimers as small intestine submucosa stabilizing nanomordants. *Biomaterials*. 2006; 27(5):745-51.
17. Kimochi T, Yoshiyama M, Urayama A, Matsuo T. Adhesion of a new commercial self-etching/self-priming bonding resin to human caries-infected dentin. *Dent Mater*. 1999; 18(4):437-43.
18. Mazzoni A, Angeloni V, Apolonio FM, Scotti N, Tjäderhane L, Tezvergil-Mutluay A et al. Effect of carbodiimide (EDC) on the bond stability of etch-and-rinse adhesive systems *Dent Mater*. 2013; 29(10):1040-7.
19. Mazzoni A, Apolonio FM, Saboia VP, Santi S, Angeloni V, Checchi V, et al. Carbodiimide inactivation of MMPs deffect on dentin bonding. *J Dent Res* 2014; 93(3): 263-8.
20. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acidetched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials*. 2006; 27(25):4470-6.
21. Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri 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.
22. Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR et al. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res*. 2015; 94(2):241-51.
23. Mi FL, Tan YC, Liang HF, Sung HW. In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. *Biomaterials*. 2002;23(1):181-91.
24. Nakabayashi N. Bonding of restorative materials to dentine: the present status in Japan. *Int Dent J*. 1985; 35(2):145-54.

25. Nakajima M, Ogata M, Okuda M, Tagami J, Sano H, Pashley DH. Bonding to caries-affected dentin using a self-etching primers. *Am J Dent.* 1999; 12(6):309-14.
26. Nakajima M, Sano H, Urabe I, Tagami J, Pashley DH. Bond strengths of single-bottle dentin adhesives to caries-affected dentin. *Oper Dent.* 2000; 25(1):2-10.
27. Olde Damink LH, Dijkstra PJ, van Luyn MJ, van Wachem PB, Nieuwenhuis P, Feijen J: Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. *Biomaterials.* 1996; 17(8):765-73.
28. Olde Damink LH, Dijkstra PJ, van Luyn MJ, van Wachem PB, Nieuwenhuis P, Feijen J: In vitro degradation of dermal sheep collagen cross-linked using a water-soluble carbodiimide. *Biomaterials.* 1996; 17(7):679-84.
29. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater.* 2011; 27(1):1-16.
30. Pereira PN, Bedran-de-Castro AK, Duarte WR, Yamauchi M. Removal of noncollagenous components affects dentin bonding. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007; 80(1):86-91.
31. Scheffel D, Delgado C, Soares DG, Basso F, de Souza Costa CA, Hebling J et al. Increased durability of resin-dentin bonds following cross-linking treatment. *Oper Dent.* 2015; 40(5):533-9.
32. 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.
33. 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 acid-etched dentin. *Oper Dent.* 2014; 39(2):152-8.
34. 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.
35. Septier D, Hall RC, Embury G, Goldberg M. Immunoelectron microscopic visualization of pro- and secreted forms of decorin and biglycan in the predentin and during dentin formation in the rat incisor. *Calcif Tissue Int.* 2001; 69(1):38-45.
36. Seseogullari-Dirihan R, Mutluay MM, Vallittu P, Pashley DH, Tezvergil-Mutluay A. Effect of pretreatment with collagen crosslinkers on dentin protease activity. *Dent Mater.* 2015; 31(8):941-7.

37. Takahashi M, Nakajima M, Tagami J, Scheffel DL, Carvalho RM, Mazzoni A et al. The importance of size-exclusion characteristics of type I collagen in bonding to dentin matrices. *Acta Biomater.* 2013; 9(12):9522-8.
38. Tezvergil-Mutluay A, Mutluay MM, Agee KA, Seseogullari-Dirihan R, Hoshika T, Cadenaro M et al. Carbodiimide Cross-linking inactivates soluble and matrix-bound MMPs, in vitro. *J Dent Res.* 2012; 91(2):192-6.
39. Timkovich R. Detection of the stable addition of carbodiimide to proteins. *Anal Biochem.* 1977; 79(1-2):135-43.
40. Tjäderhane L, Buzalaf MA, Carrilho M, Chaussain C. Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: the era of "dentin degradomics". *Caries Res.* 2015; 49(3):193-208.
41. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldini S et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer - A review. *Dent Mater.* 2013; 29(10):999-1011.
42. Tjäderhane L. Dentin bonding: can we make it last? *Oper Dent.* 2015; 40(1):4-18.
43. Wang Y, Spencer P, Walker MP. Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res A* 2007; 81(2):279-86.
44. Xie J, Flaitz CM, Hicks MJ, Powers JM. Bond strength of composite to sound and artificial carious dentin. *Am J Dent.* 1996; 9(1):31-3.
45. Yoshiyama M, Tay FR, Doi J, Nishitani Y, Yamada T, Itou K et al. Bonding of self-etch and total-etch adhesives to carious dentin. *J Dent Res.* 2002; 81(8):556-60.
46. Yoshiyama M, Urayama A, Kimochi T, Matsuo T, Pashley DH. Comparison of conventional vs. self-etching adhesive bonds to caries-affected dentin. *Oper Dent.* 2000; 25(3):163-9.
47. Zeeman R, Dijkstra PJ, van Wachem PB, van Luyn MJ, Hendriks M, Cahalan PT et al. Successive epoxy and carbodiimide cross-linking of dermal sheep collagen. *Biomaterials.* 1999; 20(10):921-31.
48. Zeugolis DI, Paul GR, Attenburrow G. Cross-linking of extruded collagen fibers - a biomimetic three-dimensional scaffold for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A.* 2009; 89(4):895-908.
49. Zheng L, Hilton JF, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW. Dentin caries activity status related to hardness and elasticity. *Eur J Oral Sci.* 2003; 111(3):243-52.

50. Zou Y, Jessop J, Armstrong S. In vitro enzymatic biodegradation of adhesive resin in the hybrid layer. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 94(1):187-9.

ANEXO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA - UNESP		
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: EFEITO DE PRIMERS EXPERIMENTAIS CONTENDO CARBODIIMIDA NA ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES DA MATRIZ DENTINÁRIA, DEGRADAÇÃO DO COLÁGENO E DA UNIÃO RESINA-DENTINA HÍGIDA E AFETADA POR CÁRIE		
Pesquisador: JOSIMERI HEBLING COSTA		
Área Temática:		
Versão: 3		
CAAE: 24705313.5.0000.5416		
Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP		
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 696.635		
Data da Relatoria: 25/06/2014		
Apresentação do Projeto:		
Projeto apresentado de forma clara e completo.		
Objetivo da Pesquisa:		
O objetivo deste estudo será avaliar o efeito da aplicação de primers experimentais contendo EDC na degradação do colágeno dentinário e na estabilidade da união resina-dentina hígida e dentina afetada por cárie.		
Avaliação dos Riscos e Benefícios:		
Os riscos e benefícios foram avaliados pelos pesquisadores.		
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:		
Pesquisa bem delimitada, com objetivos claros e de relevância para a área em questão.		
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:		
Termos obrigatórios apresentados.		
Recomendações:		
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:		
Pendências atendidas.		
Endereço: HUMAITA 1680		
Bairro: CENTRO		CEP: 14.801-903
UF: SP	Município: ARARAQUARA	
Telefone: 1633-0164	Fax: 1633-0164	E-mail: cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 696.636

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Atendidas pendências de reunião de 13 de maio, considero APROVADO o projeto.

ARARAQUARA, 25 de Junho de 2014

Assinado por:
Maurício Meirelles Nagle
(Coordenador)

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 14/09/2017

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 14 de setembro de 2015

CLÁUDIA CRISTINA DELGADO