ANDRÉ GUARACI DE VITO MORAES

**Estudo da influência das soluções desmineralizadoras na atividade proteolítica
da dentina humana sadia**

São Paulo

2012

ANDRÉ GUARACI DE VITO MORAES

**Estudo da influência das soluções desmineralizadoras na atividade proteolítica
da dentina humana sadia**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração em Materiais Dentários.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Francci

Co-Orientadora: Profa. Dra. Marcela Rocha
Oliveira Carrilho

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

DeVito-Moraes, André Guaraci.

Estudo da influência das soluções desmineralizadoras na atividade proteolítica da dentina humana sadia / André Guaraci De Vito Moraes ; orientador Carlos Eduardo Francci ; co-orientadora Marcela Rocha Oliveira Carrilho. -- São Paulo, 2012.

100 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Materiais Dentários. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Desmineralização dentinária. 2. Dentina - Histologia. 3. Colágeno - Histologia. 4. Metaloproteinases. I. Francci, Carlos Eduardo. II. Carrilho, Marcela Rocha Oliveira. III. Título.

DeVito-Moraes AG. Estudo da influência das soluções desmineralizadoras na atividade proteolítica da dentina humana sadia. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: 25 / 10 / 2012

Banca Examinadora

Prof. (a). Dr (a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Thereza De Vito e ao meu pai, José Moraes.

“Há homens que lutam um dia e são bons.

Há outros que lutam um ano e são melhores.

Há os que lutam muitos anos e são muito bons.

Porém, há os que lutam toda a vida.

Esses são os imprescindíveis.”

Bertolt Brecht.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por não me deixar esmorecer mesmo quando as dificuldades não me permitem enxergar a saída.

Agradeço à minha **Mãe, Thereza**, por apoiar minha vontade de estudar e por entender minha dedicação acadêmica. Agradeço por todo o empenho, amor e cuidados que você sempre devotou a mim. Espero, em breve, poder retribuir por tudo o que recebi de ti.

Agradeço ao meu **Pai, Moraes**, por torcer incondicionalmente, por me encorajar e por acreditar que eu poderia vencer os desafios e alcançar meus objetivos. Agradeço pelas palavras sempre eruditas e engrandecedoras que você sempre fez questão de registrar sob a forma de texto.

Agradeço à minha irmã **Maíra**, por dividir comigo os bons e os maus momentos de nossa casa, por estar sempre por perto pronta a ajudar quando necessário. Saiba que sua presença é muito importante.

Agradeço à minha tia **Margareth** e aos meus primos **Mariana e James**, por sempre se preocuparem comigo, pelo carinho que sempre me dispensaram, por me desejarem sucesso, por me quererem tão bem. Espero ter sempre vocês próximos a mim.

Agradeço ao amigo, **Victor Di Donato** por ter se tornado meu irmão. O irmão que eu escolhi. Obrigado por estar sempre junto de mim, por dividir comigo os desafios da profissão e da vida. Obrigado pelas conversas francas, pelas risadas contagiantes, pelas lágrimas solidárias, pelos conselhos, pelas oportunidades, enfim, pela convivência que considero fundamental para que eu continue a trilhar meu caminho.

Agradeço ao compadre **Maico Dutra**, à comadre **Ana Paula** e ao meu afilhado **Mateus** por me permitirem fazer parte da vida de vocês, por me concederem a honrosa responsabilidade de ser o padrinho deste menino que vocês geraram com

tanto amor. Obrigado pelo apoio indispensável nos momentos mais difíceis e por dividirem comigo os momentos mais felizes. Vocês são pessoas muito importantes para mim.

*Agradeço à minha madrinha **Marilena Folgosi**, pelo carinho e atenção com que sempre me tratou. Agradeço por estar sempre presente e por se orgulhar das minhas conquistas desde o meu primeiro ano de vida.*

*Agradeço às amigas **Sonia Santos**, **Vera Seves** e **Áurea Seves** pela companhia sempre muito agradável e divertida dos fins de semana. Agradeço pela forma carinhosa com que sempre me trataram.*

*Agradeço ao meu orientador, **Prof. Carlos Francci** por ter me dado as mais importantes oportunidades profissionais. São poucas as pessoas que se preocupam com a evolução de sua equipe e você é um exemplo concreto de líder capaz de impulsionar o desenvolvimento profissional de quem o segue. Além disso, é um ser humano admirável pela forma sincera, respeitosa, ética, justa e generosa com que você trata seus alunos. É um profissional talentoso, dedicado e íntegro, capaz de cumprir com humildade e entusiasmo seu papel como professor. Sigo seu exemplo tanto para minha vida profissional como também para a pessoal. Você é além de um orientador, um amigo com quem eu sempre pude contar.*

*Agradeço à minha co-orientadora, **Profa. Marcela Carrilho** por ter me permitido voltar a trabalhar com testes bioquímicos, área da ciência que me desperta muito interesse. Pude desenvolver meu doutorado tendo como base sua linha de pesquisa. Foi para mim uma honra poder trabalhar com uma pesquisadora de extrema competência. Agradeço por me deixar fazer parte do seu grupo de trabalho, por poder compartilhar um pouco da sua experiência e sabedoria, sempre de uma forma gentil, respeitosa e acolhedora.*

*Agradeço ao amigo **Maurício Gomes** pela agradável convivência e pelas parcerias de trabalho dentro e fora da pós-graduação. Você se tornou mais do que um colega de trabalho, te considero um amigo em quem eu posso confiar. Amigo solícito e*

generoso sempre disposto a colaborar em tudo que estiver ao seu alcance, você é uma pessoa que faço questão de ter sempre por perto.

*Agradeço à amiga **Lilyan Yamasaki** pela amizade que construímos durante os anos de convivência. Foi muito bom poder perceber que tínhamos afinidade para nos tornarmos bons amigos. Agradeço pelas horas de procrastinação, pelos almoços do bandeirão, pelas intermináveis conversas, pelos bons conselhos, especialmente durante os períodos em que eu tinha grandes confusões para resolver... Espero que possamos trabalhar e estar sempre juntos.*

*Agradeço ao amigo **Alexander Nishida** pela possibilidade de tê-lo como um amigo. Tudo começou durante sua iniciação científica e de lá até aqui nos tornamos cada vez mais próximos. Dividimos problemas comuns que nos renderam intermináveis conversas, enfrentamos as dificuldades da pós e da vida, mas também nos divertimos muito juntos. Você é sim uma boa pessoa e por isso desejo que possamos estar sempre próximos.*

*Agradeço ao amigo **Ricardo Sgura** pela felicidade de tê-lo conhecido. Acredito que não foi por acaso que nos tornamos amigos. Através do tempo em que convivemos, percebi que tínhamos muitas afinidades e, por isso, hoje o considero alguém que faz parte do meu seleto grupo de verdadeiros amigos. Agradeço pelas conversas, pelos conselhos, pelas corridas, pelas viagens, especialmente quando dividimos a satisfação de estarmos na “nostra” Itália, pelas risadas e até por estar comigo na briga para que injustiças não fossem cometidas nas reuniões da CPG. Espero tê-lo sempre próximo e que outras parcerias surjam.*

*Agradeço à amiga **Flávia Ibuki** pela amizade que fizemos durante a pós-graduação no Laboratório de Bioquímica Oral e também pela parceria profissional que desenvolvemos no consultório. Agradeço pela forma sempre gentil, solícita e carinhosa com que você sempre me tratou. Obrigado pelas conversas e pela companhia aos sábados no consultório. Espero poder trabalhar com você sempre.*

*Agradeço à amiga **Cristina Vidal** por tudo o que vivemos durante a realização do nosso Doutorado. Agradeço por você ter me recebido tão bem desde o primeiro dia*

em que fomos apresentados. Trabalhamos muito, mas nos divertimos muito também. Nenhum experimento teria sido feito com tanto entusiasmo se você não estivesse no laboratório. Obrigado, de verdade, por tão pacientemente ter me ensinado boa parte dos experimentos que eu me propus a fazer. Obrigado pelas dicas, pelas experiências que trocamos, pelas conversas, pelas risadas que não foram poucas e pela convivência. Sei que você em breve estará longe, mas espero que eu possa ter sua amizade sempre.

*Agradeço à amiga **Polliana Scaffa** pela convivência indispensável durante todo o tempo em que trabalhamos juntos. Agradeço pela maneira solícita com que você me recebeu desde o primeiro dia em que comecei a trabalhar com você. Divertimos-nos muito, demos muitas risadas e tudo isso foi fundamental para que a rotina pesada de trabalho fosse amenizada. Agradeço pelas conversas, pelas caronas, pelas dicas, pelas discussões acadêmicas que me fizeram aprender cada vez mais sobre o tema com o qual trabalhamos. Foi muito bom ter conquistado sua amizade. Espero que possamos manter sempre contato e quem sabe desenvolvermos novos projetos.*

*Agradeço à amiga **Vivian Bradaschia** por ter tido a oportunidade de voltar a conviver com você. Minha amiga desde a saudosa época da Turma 94, você voltou à Odonto, agora no Laboratório de Biologia Oral, onde pudemos nos reencontrar. Obrigado pela maneira sempre carinhosa com que você me recebia no laboratório e por toda a ajuda que você jamais hesitou em me prestar, especialmente para que o western blot desse certo.*

*Agradeço a todos os demais **colegas da pós** por tudo aquilo que vivemos juntos no departamento ou fora dele, nas aulas, nos congressos ou nas confraternizações. Saibam que cada um de vocês, a sua maneira, contribuiu muito para que eu pudesse terminar mais esta etapa da minha vida. Agradeço, especialmente, à **Ana Romero** minha competidora oficial de alimentação exagerada, à **Danielle Carvalho** pelas histórias engraçadas que nos divertiam, à **Helena Burlamaqui** com quem tive a honra de conviver desde o primeiro dia de Mestrado, à **Letícia Boaro** pelas conversas e pela convivência, ao **Fernando Maeda**, pela companhia e pelas caronas e ao **Eugênio Garcia** pela convivência, pelos trabalhos em conjunto e pelas risadas.*

Agradeço aos amigos **Hélio Dutra** e **Alexandre Moraes** pelas oportunidades de trabalho e, especialmente, pela amizade que construímos trabalhando juntos.

Agradeço ao **Prof. José Nicolau** por ter me recebido tão bem em seu laboratório. Meu Doutorado só foi possível devido à possibilidade de desenvolvê-lo junto ao Laboratório de Bioquímica Oral. Agradeço ainda por me permitir aprender com sua vasta experiência e exemplo de vida.

Agradeço ao **Prof. Victor Arana** por me permitir usar o Laboratório de Biologia Oral para que parte de meus experimentos pudesse ser realizada. Agradeço também pela forma gentil e solícita com que sempre me recebeu. Agradeço, especialmente, por me ouvir e me orientar quando precisei da opinião de um professor sábio e experiente. Foi muito bom tê-lo mais próximo em nosso Departamento.

Agradeço ao **Prof. Rafael Ballester** pela possibilidade de aprender muito mais do que Odontologia durante os anos em que fui aluno e representante discente em nosso Departamento. Agradeço pela forma cordial como você sempre me tratou e por dar importância às minhas opiniões ou reivindicações. Agradeço pelo seu senso de justiça, pela maneira sábia com que sempre buscou solucionar os problemas de todos os alunos da pós-graduação. Saiba que durante esses anos de convivência aprendi a admirá-lo como professor e como ser humano.

Agradeço ao **Prof. Leonardo Eloy** pela forma sempre gentil e bem humorada com que me recebia. Obrigado pela confiança nos projetos que desenvolvemos e pelo conhecimento que você sempre me transmitiu durante o tempo em que convivemos.

Agradeço a todos os demais Professores do Departamento de **Biomateriais e Biologia Oral**. Obrigado, **Profa. Rosa Helena, Prof. Paulo César, Prof. Antonio Muench, Prof. Fernando Neves, Prof. Igor Studart, Prof. Walter Miranda, Profa. Alyne Simões, Prof. Roberto Braga, Profa. Josete Meira, Prof. Paulo Capel**, pela possibilidade de conviver e aprender com vocês, seja na graduação, nas aulas da pós, nas conversas no departamento ou nos estágios. São, sem dúvida, grandes mestres.

Agradeço à **Rosa Nogueira** pela forma sempre carinhosa com que me recebia. Vou sentir muita falta de nossas conversas, do seu apoio, dos seus conselhos e das palavras de incentivo e de conforto que você sempre me dava. Obrigado pela convivência durante todos esses anos.

Agradeço ao **Douglas Nesadal** por tudo o que ele representa para todos os alunos do Laboratório de Bioquímica Oral. Obrigado por ter sido, em muitos momentos, meu orientador. Agradeço pela amizade, pelas conversas, pelos ensinamentos, pelas dicas, pela forma sempre solícita com que me atendia. Obrigado pelos bons momentos que vivi em sua companhia.

Agradeço ao **Antonio Lascale** e **Elidamar Bastos** pelo apoio fundamental que nos prestam sempre que precisamos de alguma ajuda. Obrigado pela convivência e pela disponibilidade com que sempre me receberam.

Agradeço à **Turma 94**. Obrigado a vocês amigos da inesquecível Turma 94. Saiba que levo vocês comigo como uma grata lembrança em todos os momentos da minha vida. Saudades, sempre!!!!!!

Agradeço ao Prof. **Fábio Nascimento** e ao **Instituto Nacional de Farmacologia – INFAR** da **Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP** pelo apoio na realização de parte de meu projeto de pesquisa.

Agradeço à **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**, responsável por toda a minha formação profissional e aperfeiçoamento pessoal.

Agradeço à instituição de fomento à pesquisa, **CAPES** pelo auxílio financeiro prestado, sem o qual não seria possível tamanha dedicação.

RESUMO

DeVito-Moraes AG. Estudo da influência das soluções desmineralizadoras na atividade proteolítica da dentina humana sadia [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Corrigida.

A degradação da interface adesiva em dentina pode acometer tanto a porção resinosa como a porção orgânica da camada híbrida. Evidências indicam que a degradação da porção orgânica pode ocorrer em parte devido a atividade enzimática de proteases da própria dentina. As metaloproteinases da matriz (MMPs) constituem a primeira classe de enzimas relacionada com a degradação da matriz orgânica. É possível que as MMPs, possam ser reativadas durante o procedimento adesivo em consequência da queda do pH do meio. Objetivo: Esta investigação teve como objetivos avaliar a influência de soluções desmineralizadoras com diferentes concentrações de ácido fosfórico (AF1%, AF10% e AF37%) na atividade proteolítica da dentina humana sadia, na degradação do colágeno exposto pela desmineralização, além de identificar imunologicamente as metaloproteinases. Material e Métodos: Vinte dentes molares permanentes foram triturados para obtenção de um pó de dentina. Alíquotas de 1g do pó foram acondicionadas em tubos plásticos para que a desmineralização do substrato pudesse ser realizada de acordo com as três diferentes concentrações de ácido fosfórico testadas. Após a neutralização do ácido com NaOH, as amostras foram centrifugadas. O sobrenadante foi utilizado para mensuração espectrofotométrica do conteúdo de Cálcio (Ca) liberado pela desmineralização. O precipitado obtido foi incubado com tampão de extração de proteínas por 24h a 4°C sob agitação. Nova centrifugação foi realizada e o sobrenadante utilizado para avaliação da atividade da MMP-2 e MMP-9 por zimografia e para a identificação imunológica das metaloproteinases por *western blot*. O precipitado obtido pela centrifugação foi liofilizado e separado em alíquotas de 40mg (n=10) de pó de dentina para cada condição experimental. As alíquotas foram incubadas em “saliva artificial” por 24h a 37°C sob agitação e hidrolisadas em autoclave. Após incubação a 65°C por 40 min, as amostras foram avaliadas por espectrofotometria para que a mensuração da concentração do aminoácido

hidroxiprolina (HYP) liberado pela degradação do colágeno exposto pudesse ser obtida. Fatias de 0.3 mm da dentina coronária de outro dente foram obtidas e desmineralizadas, de acordo com as diferentes concentrações de ácido fosfórico para avaliação da atividade enzimática através do método da zimografia *in situ*. Os resultados foram submetidos à análise de variância de um fator sem vinculação ou teste de Kruskal-Wallis para identificação das diferenças existentes entre os grupos experimentais. Para contraste das médias foi realizado o teste de Student-Newman-Keuls com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$). Resultados: A atividade enzimática de MMP-2 foi estatisticamente maior quando a dentina foi desmineralizada com AF 1% ou 10%. O uso do ácido fosfórico 37% diminuiu consideravelmente a atividade desta enzima, em relação ao AF10% ($\alpha<0,05$). Em nenhuma das amostras desmineralizadas com AF foi detectada a atividade enzimática da MMP-9. A identidade da MMP-2 foi confirmada pelo *immunoblotting* da enzima com anticorpo específico. A MMP-9 não foi expressa nos extratos analisados. A expressão de MMP-2 foi maior quando utilizado AF 1% ou 10% e menor quando foi utilizado o AF 37%. A utilização do AF 37% liberou valores de Ca, em $\mu\text{g/mL}$, estatisticamente superiores aos valores determinados para os demais grupos ($\alpha<0,05$). A maior concentração de HYP, em $\mu\text{g/mL}$, foi encontrada nos extratos desmineralizados com AF 10%. Em seguida, aparecem os valores encontrados com o uso do AF1%. Os menores valores da concentração de HYP aparecem no grupo em que foi utilizado o AF 37% ($\alpha<0,05$). A concentração de HYP em função do peso de dentina utilizado (40mg) também foi calculada. A maior concentração de HYP por mg de dentina foi obtida com AF 10%, seguida pelos extratos desmineralizados com AF1%. Os menores valores foram detectados com AF 37% ($\alpha<0,05$). O uso do AF10% demonstrou ser responsável pela maior taxa de degradação de colágeno exposto (20,13%). Em seguida, aparecem valores intermediários (11,34%) obtidos com AF1%. Por último, surgem os menores valores (0,68%) com AF37%. A análise das imagens obtidas após a realização da zimografia *in situ* demonstrou maior atividade enzimática quando a dentina foi desmineralizada com AF10%. Conclusão: O uso do AF37% para o condicionamento da dentina durante a realização do procedimento adesivo pode minimizar os efeitos degradantes das proteases endógenas sobre o colágeno. Em contrapartida, estudos realizados com pó de dentina desmineralizado com AF1% ou 10% podem estar sobreestimando a atividade das MMPs, em relação à prática clínica.

Palavras-chave: Dentina, Colágeno, Metaloproteinase, Ácido Fosfórico, Camada Híbrida, Zimografia, Hidroxiprolina, Western Blot.

ABSTRACT

DeVito-Moraes AG. The influence of demineralizing solutions in the proteolytic activity of human dentin healthy [Thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Corrigida.

The dentin adhesive interface degradation can occur in resin and in organic portion of the hybrid layer. Evidence indicates that the degradation of organic matrix may partially occur due to the enzymatic activity of proteases own dentin. The matrix metalloproteinases (MMPs) have been described as the first class of enzymes associated with degradation of the organic matrix. It is possible that MMPs may be reactivated during the adhesive procedure as a result of the fall of pH. Purpose: The objectives of the present investigation are to evaluate the influence of different demineralizing phosphoric acid solutions (PA1%, PA10% and PA37%) on the proteolytic activity of human sound dentin, on the collagen degradation that was exposed after demineralization, as well as to identify the metaloproteases immunologically. Material and Methods: Dentin powder was obtained from twenty human molars. One gram aliquots were placed in polystyrene tubes and the dentin demineralization was performed using the three different phosphoric acid concentrations tested in this study. After neutralization with NaOH, the samples were centrifuged. The supernatant was used for the spectrophotometrically quantification of calcium (Ca) released by the demineralization while the precipitate was re-suspended and incubated with a protein extraction buffer for 24h at 4°C under agitation. The sample was centrifuged and the supernatant was used for the identification of MMP-2 and MMP-9 by western blot and for the evaluation of gelatinolytic activity by zymography. The pellet was lyophilized and 40 mg aliquots of the dentin powder (n=10) were incubated in “artificial saliva” for 24h at 37°C under agitation and hydrolysed in autoclave after incubation at 65°C for 40 min. The samples were analyzed spectrophotometrically to measure the hydroxyproline (HYP) released after collagen degradation. Slices of 0.3 mm of the dentine crown of the another tooth were obtained and demineralized in accordance with the concentrations of phosphoric acid used in this study for evaluating the enzymatic activity by the method of in situ zymography. The data were analyzed by ANOVA one-

way or Kruskal-Wallis test for the identification of differences between the experimental groups. The means were analyzed by Student-Newmans-Keuls's test ($\alpha=0,05$). Results: The MMP-2 enzymatic activity was statistically higher when the dentin was demineralized with 1% or 10% PA. The 37% phosphoric acid decreased the activity of such enzyme relative to PA 10% ($\alpha<0,05$). MMP-9 activity was not detected in any demineralization condition (1%, 10% or 37% PA). MMP-2 identification was confirmed by immunoblotting while MMP-9 was not observed in any condition. MMP-2 identification was higher when 1% or 10% PA were used while 37% PA showed lower MMP-2 identification. The use of 37% PA resulted in higher release of Ca, which was significantly higher when compared to other PA concentrations ($\alpha<0,05$). The highest HYP concentration was observed when 10% PA was used, followed by 1% PA. The lowest values were observed for 37% PA ($\alpha<0,05$). The HYP concentration according to the dentin weight used (40 mg) was also calculated. Highest concentrations of HYP per mg of dentin were observed for 10% and 1% PA, while 37% PA resulted in the lowest HYP concentration ($\alpha<0,05$). The use of 10% PA showed to be responsible for the highest exposed collagen degradation after demineralization (20,13%) when compared to 1% PA (11,34%) and 37% PA (0,68%). The analysis of images obtained after the realization of in situ zymography showed greater enzyme activity when the dentin was demineralized in PA10%. Conclusion: The use of 37% PA for dentin etching during the restorative procedure might minimize collagen degradation by host-derived proteases. On the other hand, studies that have been using 1% or 10% PA might have overestimated MMPs activity when compared to the clinical situation.

Keywords: Dentin, Collagen, Metalloproteases, Phosphoric acid, Hybrid layer, Zymography, Hydroxyproline, Western Blot.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Estrutura esquemática das MMPs: (A) Estrutura da forma inativa das MMPs e da forma ativa após clivagem do pró-domínio e liberação do domínio catalítico (ativo); (B) Estrutura diferenciada da MMP-2 e MMP-9 pela presença dos domínios de fibronectina. (modificada de Page-McCaw et al., 2007).....41
- Figura 4.1 - Preparação do pó de dentina: (A) Fragmentos de dentina obtidos com pontas diamantadas; (B) Prensa hidráulica; (C) Moinho de bolas; (D) Pó de dentina obtido.....48
- Figura 4.2 - Desmineralização do pó de dentina em tubos falcon de acordo com as diferentes soluções desmineralizadoras utilizadas.....48
- Figura 4.3 - Equipamentos utilizados para a preparação dos géis de poliacrilamida e para a eletroforese das proteínas da dentina: (A) Suporte para acomodação dos vidros; (B) Suportes posicionados para a preparação dos géis; (C) Cuba dentro da qual é realizada a eletroforese das proteínas extraídas; (D) Zimograma obtido após a eluição das proteínas e corado com Coomassie Blue.....52
- Figura 4.4 - Equipamento utilizado para transferir eletricamente as proteínas para uma membrana de nitrocelulose: (A) Aparelho Semi-Dry para transferência (B) Membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas separadas no gel.....54
- Figura 4.5- Amostras do precipitado obtido após a extração das proteínas: (A) Amostras preparadas para avaliação do conteúdo de hidroxiprolina antes da incubação a 65°C; (B) Mesmas amostras após a incubação em estufa, mostrando o conteúdo de hidroxiprolina liberado.....55
- Figura 5.1- Zimogramas obtidos após a eletroforese das proteínas da dentina em géis de poliacrilamida. À esquerda estão os pesos moleculares do padrão de pesos em KDa: (A) Zimograma representativo de seis diferentes extrações de proteínas onde é possível observar a atividade enzimática de MMPs; (B) Zimograma controle onde a atividade enzimática das MMPs foi inibida pela incubação com fenantrolina.....58

Figura 5.2 - Médias e desvios padrão (unidades arbitrárias) da atividade enzimática de MMP-2 mensurada após o emprego das soluções desmineralizadoras. A atividade da enzima recombinante (em amarelo) foi utilizada apenas para efeito de comparação.....	59
Figura 5.3 - <i>Immunoblotting</i> das enzimas recombinantes com seus respectivos anticorpos (anti-MMP-2 e anti-MMP-9) e com diferentes concentrações de proteína: (A) Expressão de MMP-2; (B) Expressão de MMP-9.....	61
Figura 5.4 - <i>Immunoblotting</i> das enzimas recombinantes e dos extratos de proteínas da dentina: (A) <i>immunoblotting</i> com anticorpo anti-MMP-2; (B) <i>immunoblotting</i> com anticorpo anti-MMP-9.....	62
Figura 5.5 – Valores da expressão (unidades arbitrárias) da MMP-2 mensurada após o <i>immunoblotting</i> dos extratos de dentina com anticorpo específico. A expressão da enzima recombinante (em amarelo) foi utilizada apenas para efeito de comparação.....	63
Figura 5.6 - Médias e desvios padrão (em µg/mL) da concentração de cálcio liberado após o emprego das soluções desmineralizadoras.....	65
Figura 5.7 - Médias e desvios padrão (em µg/mL) da concentração de HYP liberada após o emprego das soluções desmineralizadoras.....	67
Figura 5.8 - Médias e desvios padrão (em µg/mL/mg de dentina) da concentração de HYP liberada após o emprego das soluções desmineralizadoras.....	67
Figura 5.9 - Gráfico de correlação positiva de Pearson entre HYP (µg/mL) e atividade de MMP-2 (unidades arbitrárias).....	72
Figura 5.10 - Gráfico de correlação negativa de Pearson entre HYP (µg/mL) e Ca (µg/mL).....	73
Figura 5.11 -Substrato dentinário desmineralizado e incubado com gelatina conjugada com fluoresceína. (A), (D) e (G) Contraste Diferencial de Interferência (DIC) demonstra a densidade óptica da dentina. (B), (E) e (H) imagem da atividade enzimática por fluorescência. (C), (F) e (I) sobreposição das imagens DIC e fluorescentes. (J) Mensuração das emissões de fluorescência para os grupos avaliados.....	75

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Quadro 4.1 - Grupos experimentais segundo a porcentagem de ácido fosfórico (AF), o pH e o tempo utilizado para a desmineralização do pó de dentina...49
- Tabela 5.1 - Média e desvio padrão da atividade enzimática de MMP-2 (unidades arbitrárias). Letras iguais significam semelhança estatística ($p < 0,05$).....60
- Tabela 5.2 – Valores, em unidades arbitrárias, mensurados por densitometria da expressão de MMP-2 após *immunoblotting* com anticorpo específico.....64
- Tabela 5.3 - Média e desvio padrão da concentração de cálcio liberado em $\mu\text{g/mL}$. Letras iguais significam semelhança estatística ($p < 0,05$).....65
- Tabela 5.4 - Média e desvio padrão da concentração de HYP liberada em $\mu\text{g/mL}$. Letras iguais significam semelhança estatística ($p < 0,05$).....68
- Tabela 5.5 - Média e desvio padrão da concentração de HYP liberada em $\mu\text{g/mL/mg}$ de dentina. Letras iguais significam semelhança estatística ($p < 0,05$)..68
- Tabela 5.6 - Estimativa da porcentagem, em peso, da quantidade de cada componente constituinte do tecido dentinário. Cálculo em μg de cada componente do tecido dentinário a partir de 40mg de dentina utilizada para realização da análise por hidroxiprolina.....70
- Tabela 5.7 - Cálculo estimado da porcentagem de colágeno degradado após exposição da matriz orgânica pela desmineralização alcançada por cada uma das concentrações das soluções de ácido.....71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	ácido fosfórico
APMA	p-aminofenilmercúrio
Bis-GMA	bisfenol-glicidil metacrilato
BMP	proteína morfogenética óssea
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$	hidroxiapatita
CaCl_2	cloreto de cálcio
Cys	cisteína
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
HCl	ácido clorídrico
HEMA	2-hidroxi etil metacrilato
HEPES	4 - (2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
HYP	hidroxiprolina
Hz	hertz
h	hora
IGF	fator de crescimento semelhante à insulina
IgG	imunoglobulina G
JAD	junção amelo-dentinária
KDa	quiloDalton
MDP	ácido 10-metacriloxideca-metileno fosfórico
MES	ácido 2-morfolinoetanossulfônico monohidratado
MMP	metaloproteinase
min	minuto
mm	milímetro

mm ²	milímetro ao quadrado
mL	mililitro
mg	miligrama
mg/mL	miligrama por mililitro
mM	milimolar
mmol/L	milimolar por litro
M	concentração molar ou molaridade
n	tamanho da amostra
NaCl	cloreto de sódio
NaN ₃	azida sódica
NaOH	hidróxido de sódio
nm	nanômetros
PBS	tampão fosfato salino
PENTA	ácido penta eritrol pentacrilato
Phenil-P	2-metacriloxietil trimetilato anidro
PH	ponte de hidrogênio
pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonilo
rpm	rotações por minuto
s	segundo
SDS	dodecil sulfato de sódio
TCA	ácido tricloroacético
TEGDMA	trietilenoglicol dimetacrilato
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
UDMA	uretano dimetacrilato

V	Volts
ZnCl ₂	cloreto de zinco
μm	micrômetro
μg	micrograma
μL	microlitro
μg/μL	micrograma por microlitro
μg/mL	micrograma por mililitro
μg/mL/mg	micrograma por mililitro por miligrama

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca	cálcio
°C	graus Celsius
g	grama
%	porcentagem
Zn	zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1 TECIDOS DENTAIS	28
2.2 TÉCNICAS ADESIVAS	30
2.3 DEGRADAÇÃO DA INTERFACE ADESIVA	34
2.3.1 Degradação da Porção Resinosa da Camada Híbrida	35
2.3.2 Degradação da Porção Orgânica da Camada Híbrida	37
3 PROPOSIÇÃO	45
3.1 OBJETIVO GERAL	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 PREPARAÇÃO DO PÓ DE DENTINA E DESMINERALIZAÇÃO	47
4.2 DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO	50
4.3 ZIMOGRRAFIA	50
4.4 <i>WESTERN BLOT</i>	53
4.5 HIDROXIPROLINA	54
4.6 ZIMOGRRAFIA <i>IN SITU</i>	56
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
5 RESULTADOS	58
5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA POR ZIMOGRRAFIA	58
5.2 IDENTIFICAÇÃO IMUNOLÓGICA POR <i>WESTERN BLOT</i>	61
5.3 LIBERAÇÃO DE CÁLCIO APÓS DESMINERALIZAÇÃO	64
5.4 AVALIAÇÃO DO COLÁGENO SOLUBILIZADO POR HIDROXIPROLINA	66
5.5 CORRELAÇÕES	71
5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA POR ZIMOGRRAFIA <i>IN SITU</i>	73
6 DISCUSSÃO	76
7 CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS	88
APÊNDICE	99
ANEXO	100

1 INTRODUÇÃO

Desde o advento da Odontologia Adesiva vivemos uma nova realidade na prática clínica. O surgimento dos materiais poliméricos passíveis de união aos tecidos duros dentais revolucionou a maneira como realizamos os tratamentos restauradores e se tornaram o material de eleição em boa parte dos casos em que se faz necessária a realização de uma restauração. Apesar desta importante evolução, a interface adesiva responsável pela união dos compósitos ao esmalte e à dentina ainda é suscetível a falhas decorrentes da maneira através da qual ela é produzida.

Partindo do pressuposto de que a formação da interface adesiva é condição *sine qua non* para que a terapêutica restauradora seja bem sucedida, a comunidade científica debruçou-se sobre os dilemas com os quais os clínicos se deparam durante ou após a confecção de uma restauração direta, em resina composta, ou de uma cimentação adesiva.

Para que o objetivo restaurador seja alcançado de forma satisfatória, é condição fundamental para qualquer cirurgião-dentista o amplo conhecimento das características histo-morfológicas dos tecidos duros dentais e das técnicas adesivas atualmente disponíveis para que este possa realizar um trabalho eficiente e duradouro.

Em princípio, a adesão ao esmalte é, sem dúvidas, alcançada de forma fácil e bastante previsível. Os valores de resistência de união mensurados em esmalte são sempre altos e duradouros (Goracci et al., 2004). Em contrapartida, a adesão à dentina é ainda um grande desafio.

A dentina, pela presença de grande quantidade de matéria orgânica e água (cerca de 30%) em sua composição (Katchburian; Arana, 2012), é considerado um substrato complexo, de difícil hibridização devido à dificuldade da técnica operatória. Pela presença da matriz orgânica e da água surgem diversos complicadores que tendem a degradar a interface adesiva ao longo do tempo. Portanto, muitos são os requisitos necessários para que a técnica adesiva possa ser eficientemente empregada neste substrato.

Levando em consideração a presença dos cristais de hidroxiapatita e da lama dentinária, preconizou-se o condicionamento ácido da dentina (Fusayama et al., 1979) tornando possível não só a limpeza da cavidade pela remoção da *smear layer*,

mas também a desmineralização dos cristais de hidroxiapatita permitindo a infiltração dos monômeros resinosos para a intimidade do tecido o que garantiu a micro-retenção do material restaurador (Buonocore, 1955).

Sobre outro aspecto, a dentina por sua natureza orgânica e úmida (Katchburian; Arana, 2012) fez necessária a manutenção do arcabouço colágeno pela presença de água (Nakabayashi et al., 1982), fazendo com que os sistemas adesivos tivessem que ser constituídos por monômeros hidrofílicos, afins à água.

Se, em princípio, o condicionamento ácido da dentina e o uso desses monômeros hidrofílicos parece adequado e de fato é, uma vez que o uso de um ácido é capaz de criar a desejada micro-retenção e os monômeros hidrofílicos indispensáveis em um tecido que possui água em sua composição. Além disso, são utilizados em uma técnica que requer a manutenção da umidade dentinária (Gwinnett, 1992; Kanca, 1992a,b). No entanto, após a formação da interface, essa acidez do condicionamento e a hidrofília dos monômeros resinosos propiciam a degradação da camada híbrida.

Os monômeros hidrofílicos são alvos da hidrólise por sorção de água (Sano et al., 1999) e formam polímeros mais frágeis (Paul et al., 1999a,b; Yiu et al., 2004; Cadenaro et al., 2005). Já o emprego do ácido fosfórico pode ser responsável pela reativação de enzimas colagenolíticas antes inativadas pela deposição dos cristais de hidroxiapatita (Hashimoto et al., 2003; Pashley et al., 2004; Mazzoni et al., 2006; Carrilho et al., 2009)

Diante do exposto, pode-se dizer que não se imaginava à época em que foi proposto que o uso do ácido fosfórico poderia trazer conseqüências para a integridade do colágeno da matriz em decorrência da ação de enzimas da própria dentina (Carrilho et al., 2009; Mazzoni et al., 2011a,b; Mazzoni et al., 2012). Se por um lado o condicionamento ácido aumentou a resistência da interface adesiva de forma imediata, por outro, diminuiu a sua longevidade pela reativação, entre outras enzimas, de metaloproteinases (MMPs) capazes de degradar o colágeno.

Os monômeros constituintes dos sistemas adesivos sejam eles *etch-and-rinse* ou *self-etch*, por sua característica ácida também tem sido considerados promotores da ativação de enzimas endógenas da matriz dentinária responsáveis pela degradação do colágeno (Mazzoni et al., 2006; Nishitani et al., 2006b; Moon et al., 2010). Portanto, os monômeros dos sistemas adesivos podem agir sinergicamente ao ácido fosfórico na ativação de proteases da matriz.

Dessa forma, é lícito concluir que os princípios envolvidos na formação da interface adesiva em dentina são um tanto quanto contraditórios. Ao mesmo tempo em que são necessários para a formação da camada híbrida, são também responsáveis por sua deterioração ao longo do tempo. Logo, a interface adesiva é passível de se degradar com o passar dos anos. Tanto a porção resinosa quanto a porção orgânica da camada híbrida sofrem degradação ao longo do tempo, diminuindo a longevidade das restaurações adesivas.

Diante desta constatação, as pesquisas se voltaram para a busca de respostas aos problemas inerentes à formação da camada híbrida em dentina. Durante muito tempo, os cientistas estudaram a maneira pela qual a porção resinosa da camada híbrida sofria degradação (Tay et al., 2002a,b; Tay et al., 2004; Ito et al., 2005; Ferracane, 2006; Malacarne et al., 2006). O advento dos sistemas autocondicionantes agravou ainda mais as falhas de união provenientes da degradação da interface, justamente por sua característica de maior hidrofília (Fritz; Finger, 1999; Inoue et al., 2001; Chersoni et al., 2004).

Na tentativa de reverter este quadro foi proposta, recentemente, uma nova técnica adesiva, o *ethanol-bonding*, que preconiza a substituição da água presente entre as fibrilas de colágeno por etanol, buscando a infiltração de monômeros mais hidrofóbicos e, portanto, mais resistentes à hidrólise (Carrilho et al., 2007c; Nishitani et al., 2006a; Pashley et al., 2007; Sadek et al., 2008).

Mais recentemente, após a constatação de que a porção orgânica da camada híbrida sofria degradação enzimática, os estudos se voltaram para o entendimento de como as MMPs e/ou catepsinas poderiam ser ativadas. Muitos dos trabalhos desenvolvidos, em que a desmineralização das amostras do tecido dentinário foi realizada, utilizaram concentrações de ácido fosfórico que variaram de 1% a 37% (Pashley et al., 2004; Mazzoni et al., 2006; Carrilho et al., 2009; Mazzoni et al., 2011a,b; Mazzoni et al., 2012). Entretanto, nenhum deles avaliou se as diferentes concentrações traziam respostas distintas à atividade colagenolítica/gelatinolítica da dentina. A resposta a essa questão é fundamental para que possamos saber se os trabalhos realizados até aqui não estão subestimando ou sobreestimando a ação do ácido fosfórico na ativação das MMPs.

Dessa forma, este trabalho objetivou avaliar a influência de diferentes concentrações do ácido fosfórico na atividade de MMPs, buscando elucidar um dos meios através dos quais o procedimento adesivo propicia a reativação de enzimas endógenas da dentina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A terapêutica restauradora tem, atualmente, sua base alicerçada na micro-retenção mecânica dos materiais restauradores às paredes cavitárias. Esta micro-retenção é alcançada pela utilização de sistemas adesivos capazes de unir intimamente o material restaurador às estruturas dentais. A grande maioria dos procedimentos terapêuticos restauradores realizados pelos clínicos consiste em restaurações com resinas compostas diretas ou, ainda, em peças protéticas indiretas cimentadas com cimentos resinosos adesivos. Embora os pacientes, em geral, acreditem que a maior vantagem das resinas compostas seja a estética, por permitirem restaurar o dente de tal forma que a restauração se torne imperceptível; o maior benefício foi a conservação dos tecidos dentais sadios. Ou seja, não mais necessitamos realizar preparos cavitários com forma e dimensões geométricas específicas para que a terapêutica restauradora possa ser eficiente fazendo com que a restauração permaneça retida mecanicamente na cavidade dental.

Diante desta constatação, a comunidade científica tem se voltado, já há alguns anos, ao desenvolvimento de pesquisas que buscam determinar as condições ideais para a reparação dos tecidos duros do dente (esmalte e dentina) acometidos quer sejam pela doença cárie ou destruídos por outras causas como, por exemplo, hábitos parafuncionais, lesões não cariosas ou traumas. Neste sentido, é imprescindível que as técnicas e materiais restauradores sejam capazes de não somente restituir a forma e função dos dentes, mas fundamentalmente fazê-lo de modo que as estruturas sadias remanescentes sejam protegidas permanentemente contra a infiltração de microorganismos e seus metabólitos prevenindo assim o restabelecimento de um novo quadro patológico.

O objetivo principal de muitos dos estudos realizados a partir do advento da odontologia adesiva se fundamenta na busca pelo entendimento de como se pode alcançar a qualificada micro-retenção aos tecidos duros dentais pelos sistemas adesivos, além da compreensão dos métodos que poderiam ser utilizados para melhorar o procedimento adesivo, maximizando sua capacidade de retenção e selamento ao longo do tempo.

Diante do exposto, torna-se extremamente importante que algumas informações sejam esclarecidas para que se possa compreender quais são os

desafios da ciência para tornar a interface adesiva eficiente dando maior credibilidade à terapêutica restauradora.

2.1 TECIDOS DENTAIS

O procedimento adesivo é extremamente dependente do substrato sobre o qual está sendo realizado. Desta forma, o conhecimento da composição e das características histo-morfológicas dos dois principais tecidos duros dentais (esmalte e dentina) é de fundamental importância para que a adesão possa ser eficiente.

O esmalte é o tecido mais mineralizado do corpo humano. Cerca de 97%, em peso, de sua composição é formada por conteúdo mineral, ou seja, por cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) distribuídos por todo o tecido sob a forma de prismas, além do carbonato de cálcio. A matriz orgânica corresponde a apenas 1% e os demais 2% são constituídos por água (Katchburian; Arana, 2012). Portanto, a utilização da técnica adesiva deve levar em conta a grande quantidade de material inorgânico que constitui este tecido.

Em contrapartida, a dentina, embora também seja um tecido mineralizado com cerca de 70%, em peso, de seu conteúdo constituído por cristais de hidroxiapatita, possui ainda grande quantidade de matéria orgânica (18% em peso) proveniente dos componentes da matriz extracelular secretada pelos odontoblastos durante sua formação e grande quantidade de água (12% em peso) (Katchburian; Arana, 2012). A presença de cerca de 30% de conteúdo não mineral faz com que o procedimento adesivo em dentina deva ser realizado com muito mais critério e parcimônia.

O tecido dentinário é, naturalmente, um substrato complexo justamente devido às suas características histo-morfológicas. A matriz orgânica secretada durante, principalmente, a formação do dente é constituída especialmente por fibrilas colágenas tipo I (cerca de 90% do total) (Mjör, 1973). Outras proteínas também estão presentes na matriz como, por exemplo, as fosforinas, sialoproteínas, proteoglicanas, BMP e IGF-1 e 2 (Katchburian; Arana, 2012). A dentina é ainda um tecido formado por grande quantidade de água em sua composição. Água proveniente do fluido tubular que confere à dentina a umidade intrínseca. Ao longo

de todo o tecido estão distribuídos os túbulos dentinários que comunicam o tecido pulpar à junção amelo-dentinária (JAD), passando pela pré-dentina e conferindo permeabilidade a este substrato. Os túbulos estão presentes em maior quantidade, por unidade de área (mm^2), e em maior diâmetro ($2,5 \mu\text{m}$) quando observados em cavidades profundas, próximas ao tecido pulpar. Em contrapartida, estão em menor número e com diâmetros menores ($1 \mu\text{m}$) quando localizados próximo à JAD (Katchburian; Arana, 2012). No interior dos túbulos estão contidos os prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos, terminações nervosas e o fluido tubular (Marshall et al., 1997).

A dentina pode ainda ser dividida em dentina peritubular, que circunda os limites do túbulo dentinário, e origina-se a partir da deposição dos cristais de apatita por entre os espaços vazios existentes na matriz orgânica (Landis, 1996). Esta região é caracterizada por seu alto conteúdo mineral. Já a deposição mineral que ocorre sobre a matriz orgânica, ou seja, por entre as fibrilas de colágeno forma o que se denomina dentina intertubular, caracterizada por possuir alto conteúdo orgânico (Marshall et al., 1997).

Diante do exposto, é possível imaginar que a realização do procedimento adesivo ocorra de maneira distinta em esmalte e em dentina. Isto quer dizer que por conta da composição dos dois substratos, os procedimentos e cuidados para a realização da técnica adesiva devem ser diferentes. A adesão ao esmalte é muito mais fácil de ser alcançada e tende a resistir ao longo do tempo (Goracci et al., 2004), ou seja, a restauração realizada em esmalte é muito mais previsível e duradoura do que aquela confeccionada em dentina. Essa previsibilidade não ocorre em dentina justamente por ser este um substrato um tanto quanto complexo que dificulta de forma decisiva a realização do procedimento adesivo. Portanto, a adesão à dentina é ainda hoje o grande desafio da Odontologia Restauradora Adesiva.

Em vista destas particularidades, a dentina é objeto de muitos estudos científicos que buscam compreender os mecanismos determinantes da preservação/degradação da interface adesiva, justamente pelo fato de que o estabelecimento de uma interface que garanta um bom e durável selamento não é tarefa fácil nas condições terapêuticas vigentes.

2.2 TÉCNICAS ADESIVAS

Para a realização do procedimento adesivo estão à disposição do cirurgião-dentista duas diferentes técnicas adesivas: a técnica do Condicionamento Ácido Total, também chamada de *etch-and-rinse*, que prima por remover totalmente a lama dentinária, ou *smear layer* (Van Meerbeek et al., 2001) e a técnica de remoção parcial da *smear layer*, mais comumente chamada de Autocondicionante, ou *self-etch*. Esta lama dentinária, também conhecida como camada de esfregaço ou *smear layer* é composta por remanescentes do próprio tecido seccionado, sangue, saliva, bactérias, fragmentos do abrasivo do instrumento de corte e óleo da turbina do motor. Ela é produzida durante a remoção do tecido cariado ou do preparo cavitário. Esta camada se acomoda sobre a dentina intertubular, além de penetrar e obliterar os túbulos dentinários formando os *smear plugs* (Gwinnett, 1984; Pashley, 1984).

A técnica do Condicionamento Ácido Total é aquela em que se faz necessária a aplicação do ácido fosfórico, cuja concentração varia entre 32 e 37%, sobre os tecidos dentais, esmalte e dentina, previamente à aplicação do sistema adesivo (Buonocore, 1955). Em esmalte o ácido é capaz de criar uma desmineralização seletiva da porção mineral formando irregularidades na superfície, ou seja, o baixo pH cria porosidades provenientes da perda de parte da estrutura mineral (Buonocore, 1955). Em dentina, Fusayama et al. (1979) propuseram o uso do condicionamento ácido de forma tal que fosse removida a *smear layer* que dificultava a adesão à dentina subjacente (Swift Jr et al., 1995).

Com a possibilidade de remover a camada de esfregaço e produzir a desmineralização foi possível infiltrar os monômeros resinosos dos sistemas adesivos para o interior da dentina exposta pelo condicionamento ácido. Dessa forma, conseguiu-se remover cristais de hidroxiapatita das camadas superficiais ampliando o diâmetro dos túbulos, aumentando a permeabilidade do tecido dentinário e expondo um tecido conjuntivo rico em fibras colágenas (Perdigão, 1995; Eliades et al., 1997), originando uma estrutura menos mineralizada, mais porosa e mais úmida (Rosales-Leal et al., 2001).

Os sistemas adesivos desenvolvidos a partir deste momento baseavam-se na capacidade de infiltrar monômeros resinosos por entre as fibras de colágeno

expostas formando, assim, o que se intitulou camada híbrida (Nakabayashi, et al., 1982), composta pelo colágeno da dentina e os monômeros resinosos dos sistemas adesivos. Em princípio, o conceito de hibridização da dentina com as resinas odontológicas é simples e se baseia em um processo de troca em que o componente inorgânico da dentina (cristais de apatita) é substituído por monômeros hidrofílicos diluídos em solventes anidros (acetona ou etanol) ou em uma mistura de solventes aquosos (água, água/etanol).

Entretanto, quando o tempo de condicionamento torna-se demasiadamente maior do que o recomendado (30s em esmalte e 15s em dentina) a profundidade da desmineralização será maior (Hashimoto et al., 2002), dificultando a completa infiltração dos monômeros dos sistemas adesivos por toda a área desmineralizada. Essa dificuldade será traduzida pela presença de colágeno exposto pelo condicionamento da dentina, mas não totalmente infiltrado pelos monômeros (Eick et al., 1991; Pashley et al., 1993; Sano et al., 1994; Sano et al., 1995), gerando conseqüências que comprometerão a resistência e a durabilidade da interface adesiva (Hashimoto et al., 2002; Carrilho et al., 2002). Vale ressaltar que a falta ou excesso de umidade na dentina ou a falta de tempo para que os monômeros possam ocupar os espaços interfibrilares também são causas de falhas adesivas.

Após a lavagem do ácido fosfórico é de fundamental importância que a dentina esteja úmida para a aplicação do sistema adesivo e, por isso, chamamos esta técnica de “técnica úmida” de hibridização dos tecidos (Kanca, 1992a,b; Gwinnett, 1992). O controle da umidade dentinária é crítico para o sucesso do procedimento adesivo. A presença de água na dentina desmineralizada, é fundamental para que esta possa ocupar os espaços antes pertencentes aos cristais de hidroxiapatita por entre as fibrilas de colágeno e impedir o seu colapso. Desta forma, a água é capaz de manter o arcabouço colágeno em expansão (Carvalho et al., 1996). As moléculas de água conseguem desestabilizar as pontes de hidrogênio (PH) formadas entre as cadeias polipeptídicas das fibrilas colágenas, mantendo-as afastadas (Pashley et al., 1993; Carvalho et al., 1996). Quando a dentina desmineralizada é desidratada pelo uso excessivo de jatos de ar ocorre a contração das fibrilas colágenas (Carvalho et al., 1996). Porém, a simples re-hidratação da dentina é capaz de promover a re-expansão da matriz de colágeno, justamente pelo fato de que a água é capaz de se ligar quimicamente às cadeias das fibrilas, preenchendo os espaços entre elas (Carvalho et al., 1996). Embora a

presença da água seja fundamental para garantir a expansão da matriz orgânica e permear os monômeros hidrofílicos, seu excesso pode ser prejudicial, pois sua presença compete pela ocupação dos espaços interfibrilares com os monômeros resinosos (Tay, et al., 1996a,b,c,d; Tay, et al., 1998). Além disso, a presença de água pode diluir os monômeros, provocando a separação de seus componentes, resultando em um selamento deficiente da dentina (Tay et al., 1996b,c). Portanto, vale dizer que o controle criterioso da umidade dentinária é de suma importância para que o processo de hibridização seja efetivo no selamento da dentina e eficiente na preservação da restauração.

Para o uso da técnica de Condicionamento Ácido Total existem, atualmente, disponíveis no mercado dois diferentes tipos de sistemas adesivos. O sistema mais completo é aquele em que se fazem necessárias três diferentes etapas clínicas para sua realização, ou seja, são sistemas que possuem três distintos componentes e, por isso, são chamados de Sistemas Adesivos de Múltiplos Frascos. O primeiro passo é, justamente, a aplicação do ácido fosfórico que descalcifica os tecidos preparando-os para aplicação do sistema adesivo (Sano et al., 1994). O segundo passo consiste na aplicação de um *Primer* constituído por monômeros hidrofílicos dissolvidos em um solvente orgânico polar. O solvente facilita a penetração do sistema adesivo em dentina úmida, além de induzir a evaporação da água presente no interior do tecido garantindo a ocupação dos espaços interfibrilares agora pelos monômeros resinosos sem que seja permitida a contração do colágeno. Esses monômeros podem também penetrar para o interior dos túbulos dentinários desobstruídos, formando o que se denomina de *tags* resinosos (Van Meerbeek et al., 1992; Van Meerbeek et al., 1993; Perdigão, Lopes, 1999). O terceiro passo consiste na aplicação do *Bond* ou do Adesivo propriamente dito, formado por monômeros hidrofóbicos capazes de selar a interface adesiva (Van Meerbeek et al., 1992; Van Meerbeek et al., 2005). Este componente dos sistemas adesivos por sua composição hidrófoba constitui-se de monômeros viscosos e avessos à água, como por exemplo, o Bis-GMA, TEGDMA e UDMA (Van Landuyt et al., 2007). Estes monômeros são mais estáveis e resistentes à sorção de fluidos (Ferracane, 2006) o que possibilita maior estabilidade e durabilidade da restauração adesiva.

O outro tipo de sistema adesivo utilizado através da técnica *etch-and-rinse* é o sistema adesivo simplificado, cuja aplicação aos tecidos dentais ocorre com a utilização de apenas duas etapas clínicas distintas para sua realização. São

sistemas em que após o condicionamento com ácido fosfórico, os monômeros hidrofílicos do *primer* e os hidrofóbicos do *bond* são aplicados simultaneamente às cavidades mantidas úmidas após a lavagem do ácido, uma vez que estão contidos em um mesmo frasco (Van Meerbeek et al., 2005).

Diante da complexidade da técnica úmida de hibridização da dentina, do controle crítico do condicionamento ácido e na tentativa de simplificar os procedimentos clínicos otimizando o trabalho do profissional de odontologia, a indústria odontológica resolveu retomar a idéia da preservação da *smear layer*. Isso foi possível graças à adição de grande quantidade de monômeros ácidos hidrofílicos (Phenyl-P, MDP, PENTA) aos *primers* (Tay, Pashley, 2001).

Surgiu, então, a técnica adesiva Autocondicionante que faz uso de *primers* autocondicionantes, ou simplesmente adesivos autocondicionantes, também chamados de *self-etching*. Com esta técnica foi possível minimizar os problemas gerados pela necessidade do controle preciso da umidade dentinária, pois não há a necessidade de lavagem da cavidade condicionada, nem tampouco de secagem (Watanabe et al., 1994).

Nesta técnica não há a utilização do ácido fosfórico em separado para o condicionamento dos tecidos dentais. A desmineralização é promovida por monômeros ácidos presentes no *primer* e capazes de condicionar os tecidos duros dentais. Existem também dois diferentes tipos de sistemas adesivos autocondicionantes. O primeiro tipo é aquele em que o procedimento adesivo é realizado em duas etapas clínicas distintas, sendo o sistema adesivo constituído por dois frascos. No primeiro frasco, o do *primer* autocondicionante, estão contidos os monômeros ácidos que são considerados bastante hidrofílicos. Esses monômeros são aplicados às cavidades preparadas e limpas sem a necessidade de manter o tecido dentinário úmido. Portanto, o *primer* é utilizado em cavidades praticamente secas, ou melhor, com pouca umidade. Em seguida, sem que nenhum procedimento intermediário seja necessário, além da evaporação do solvente, deve-se aplicar o *bond* hidrofóbico para garantir o vedamento da interface (Tay et al., 2004).

Simplificando definitivamente o procedimento adesivo, surgiram os sistemas adesivos autocondicionantes de uma única aplicação, de um único passo, também chamados de *all-in-one*, isto é, *primer* ácido hidrofílico e *bond* hidrofóbico aplicados simultaneamente (Tay et al., 2004). Em alguns sistemas adesivos

autocondicionantes *all-in-one* é necessário misturar dois diferentes componentes antes da aplicação que de qualquer forma ocorre em um único passo.

Embora pareça promissor o fato de que com o uso dos *primers* autocondicionantes não haveria discrepância entre a profundidade de condicionamento e a infiltração dos monômeros (Sano et al., 1994; Carvalho et al., 2005), o sucesso clínico destes adesivos foi, no entanto, contestado justamente por sua característica extremamente hidrofílica que permite a difusão de fluidos pela interface adesiva (Chersoni et al., 2004), formando o que foi denominado de “favos de mel” devido à presença de poros na interface (Fritz, Finger, 1999; Inoue et al., 2001).

Tanto nos sistemas adesivos que requerem o condicionamento com ácido fosfórico como nos autocondicionantes, os *primers* constituem-se, como já relatado, de monômeros hidrofílicos imersos em solventes orgânicos. Esses solventes podem ser água, etanol, acetona ou uma mistura de dois ou mais desses solventes. *Primers* que possuem água em sua composição são menos críticos às variações da umidade dentinária, pois existe a re-hidratação do tecido pelo próprio solvente do sistema adesivo. Quando o solvente empregado é o etanol ou acetona, o controle da umidade é bastante sensível e deve ser respeitado (Pashley et al., 2001). Nesses casos, a dentina deve estar úmida o suficiente para que os solventes possam carrear os monômeros hidrofílicos para o interior dos tecidos (Carvalho et al., 1999; Pashley et al., 2001).

Com a observação das características histo-morfológicas da dentina e características do procedimento adesivo, em ambas as técnicas, é possível concluir que se faz necessária a desmineralização do substrato e o uso de monômeros hidrofílicos para que a hibridização da dentina seja alcançada. Em princípio parece não existir outro meio para realização da hibridização em um tecido mineralizado e cuja água é parte integrante de sua composição.

2.3 DEGRADAÇÃO DA INTERFACE ADESIVA

Diante do exposto, vale enfatizar que mesmo seguindo todos os preceitos estabelecidos para a hibridização da dentina, a interface da forma como é obtida

atualmente, tende a degradar ao longo do tempo. A degradação da interface adesiva ocorre nas duas porções que formam a camada híbrida: a porção resinosa constituída pelos monômeros resinosos dos sistemas adesivos e a porção orgânica formada pelas fibrilas colágenas da matriz.

2.3.1 Degradação da Porção Resinosa da Camada Híbrida

A literatura tem mostrado a grande preocupação dos pesquisadores em avaliar a durabilidade da interface adesiva formada com o uso dos sistemas adesivos atualmente disponíveis. Essa preocupação tem realmente razão para existir, uma vez que a porção resinosa da camada híbrida, na presença de fluidos orais ou fluido dos túbulos dentinários, sofre, em princípio, uma plastificação e, em seguida, a degradação hidrolítica que altera suas propriedades mecânicas, (Ito et al., 2005; Ferracane, 2006; Malacarne et al., 2006).

São fortes os indícios de que este componente resinoso é bastante suscetível à degradação hidrolítica (Sano et al., 1999), já que sua natureza hidrofílica o torna apto à permitir que este tipo de reação química se desenvolva e que tem sido apontada como responsável por abreviar a longevidade das restaurações adesivas (Carrilho et al., 2005a,b; Yiu et al., 2005, Ito et al., 2005; Ferracane, 2006, Malacarne et al., 2006).

Com o advento dos adesivos autocondicionantes, caracterizados por serem mais suscetíveis à degradação devido à sua natureza extremamente hidrofílica, ficou ainda mais claro que monômeros hidrofóbicos deveriam ser preferencialmente usados para a formação da camada híbrida. Alguns estudos mostram que quando se faz uso de uma camada extra de um adesivo hidrófobo sobre o adesivo autocondicionante tende-se a aumentar a durabilidade da interface adesiva (Brackett et al., 2005; Van Landuyt et al., 2006; DeVito-Moraes et al., 2011). Estes resultados corroboram com a hipótese de que monômeros hidrófobos são mais resistentes à ação hidrolítica das moléculas de água, fazendo com que a interface adesiva torne-se mais estável por mais tempo.

A redução nos valores de resistência de união ao longo do tempo, tanto em estudos *in vitro* (Gwinnett; Yu, 1995; Burrow et al., 1996; Kato; Nakabayashi, 1998;

Okuda et al., 2001; Carrilho et al., 2001) como *in vivo* (Hashimoto et al., 2000), confirmam uma provável degradação da interface em longo prazo. Isto porque resinas mais hidrofílicas são, inerentemente, menos resistentes (Sideridou, et al., 2003) e também porque a conversão de monômeros em polímeros em um meio úmido (técnica úmida de adesão à dentina) determina a formação de polímeros mais frágeis (Paul et al., 1999a,b; Yiu et al., 2004; Cadenaro et al., 2005) e suscetíveis à sorção de fluidos extra e intra-orais (Ito et al., 2005; Ferracane, 2006; Malacarne et al., 2006), sendo, portanto, menos capazes de selar adequadamente a dentina (Tay et al., 2002a,b; Tay et al., 2004).

Idealmente, deveríamos ser capazes de produzir adesão à dentina em campo isento de água, fazendo uso de sistemas de união hidrofóbicos, naturalmente mais estáveis (Ferracane, 2006). Por este motivo, alguns trabalhos recentes estão sendo desenvolvidos no sentido de permitir a infiltração de monômeros mais hidrofóbicos por entre as fibrilas colágenas, com o objetivo de criar uma interface mais resistente à hidrólise (Nishitani et al., 2006a; Carrilho et al., 2007c; Pashley et al., 2007; Sadek et al., 2008). A técnica restauradora adesiva como é feita atualmente privilegia, para não dizer exige, o uso de monômeros hidrofílicos que atendam às características de umidade próprias do tecido dentinário e que permitam a condução destes monômeros para o interior da dentina desmineralizada e expandida em água (Kanca, 1993).

A infiltração de monômeros mais hidrofóbicos em dentina saturada com água é inviável. Por isso, os pesquisadores tentaram modificar a condição intrínseca do substrato dentinário para que fosse possível a formação de uma interface mais hidrofóbica (Nishitani et al., 2006a; Carrilho et al., 2007c; Pashley et al., 2007; Sadek et al., 2008). Desta forma, desenvolveu-se um protocolo capaz de substituir a água presente na dentina por solventes anidros (livres de água) como, por exemplo, o etanol, substância capaz de manter o arcabouço colágeno em expansão e infiltrar monômeros mais hidrofóbicos produzindo interfaces mais resistentes à sorção de água (Pashley et al., 2007).

A esta técnica deu-se o nome de *ethanol-bonding*, fazendo referência à manutenção do arcabouço colágeno com etanol. Muitos estudos demonstraram a eficiência desta técnica alternativa de hibridização da dentina na manutenção dos valores de resistência adesiva ao longo do tempo, comprovando a menor suscetibilidade dos monômeros hidrofóbicos à degradação (Nishitani et al., 2006a;

Carrilho et al., 2007c; Pashley et al., 2007; Sadek et al., 2008). Entretanto, devido ao tempo prolongado que deve ser dispensado para que a camada híbrida possa ser formada, a técnica do *ethanol-bonding* é ainda clinicamente inviável (DeVito-Moraes, 2009).

2.3.2 Degradação da Porção Orgânica da Camada Híbrida

Diante do exposto até aqui é possível perceber que a porção resinosa da camada híbrida é alvo de muitos estudos que buscam aprimorar as técnicas restauradoras que utilizam compósitos resinosos. No entanto, não se pode deixar de salientar que a camada híbrida tem em sua composição não somente a porção resinosa, mas também uma porção orgânica proveniente da matriz extracelular do tecido dentinário (Nakabayashi et al., 1982), que é exposta ao meio durante o procedimento adesivo, através do condicionamento ácido, ou seja, da desmineralização do substrato.

Há evidências científicas que demonstram que não somente a porção resinosa da interface é afetada pela degradação, mas também a porção orgânica (Hashimoto et al., 2000, 2003; Hebling et al., 2005; Koshiro et al., 2005; Donmez et al., 2005; Carrilho et al., 2007a,b). Entenda-se por esta porção, as fibrilas de colágeno e outros componentes da matriz extracelular que são expostos pelos procedimentos restauradores vigentes, seja pelo uso de sistemas adesivos *etch-and-rinse*, seja por sistemas *self-etching*. As fibrilas podem permanecer parcialmente desprotegidas pela incompleta permeação e conversão de monômeros em polímeros resinosos (Hashimoto et al., 2003; Pashley et al., 2004; Hebling et al., 2005; Armstrong et al., 2006; Mazzoni et al., 2006; Nishitani et al., 2006b, Carrilho et al., 2007a,b).

Aproximadamente 90% do material orgânico da dentina é composto por colágeno (Mjör, 1973). O colágeno é uma proteína fibrilar, insolúvel, formada por um triplo filamento helicoidal de três cadeias polipeptídicas compostas por inúmeros aminoácidos, com destaque à glicina, prolina e hidroxiprolina (Butler; Richardson, 1984). Essas moléculas alongadas estão unidas entre si por ligações cruzadas que conectam covalentemente (ligações covalentes) as fibrilas colágenas conferindo

resistência mecânica e estabilidade à rede fibrilar (Butler; Richardson, 1984). Por ser insolúvel, o colágeno é resistente à ação de proteases e, portanto, sua desestruturação só é possível após clivagem da tripla hélice por ação de enzimas collagenolíticas (Butler; Richardson, 1984).

Os estudos que avaliam as propriedades isoladas da dentina desmineralizada, constituída em 90% por colágeno tipo I e 10% por proteínas não-colagênicas, tendem a demonstrar a estabilidade deste substrato quando armazenado por longos períodos em água ou soluções aquosas (Carvalho et al., 2000; Carrilho et al., 2005a,b). Admite-se que o elevado número de ligações cruzadas presentes no colágeno da dentina seja responsável pela tenacidade e estabilidade deste substrato (Veis; Schlueter, 1964; Rivera; Yamauchi, 1993; Linde; Robins, 1988; Miguez et al., 2004), o que potencialmente o torna resistente aos ataques químicos ou físicos desnaturantes (Butler; Richardson, 1984).

Entretanto, quando analisado dentro da estrutura da camada híbrida, o colágeno exposto pelo condicionamento ácido e não protegido pela resina parece não revelar a mesma estabilidade (Hashimoto et al., 2003; Pashley et al., 2004; Hebling et al., 2005; Carrilho et al., 2007a,b).

Estudos permitiram evidenciar que, independentemente do sistema adesivo empregado, a concentração e distribuição de monômeros resinosos no interior da dentina desmineralizada é irregular e descontínua (Spencer; Swafford, 1999; Spencer; Wang, 2002; Wang; Spencer, 2003), resultando invariavelmente na formação de camadas híbridas deficientes com exposição permanente de fibrilas de colágeno (Wang; Spencer, 2003). Tal situação, perante desequilíbrios metabólicos implicará em degradação no médio e longo prazos (Breschi et al., 2008).

Uma hipótese que começa a ser fortemente considerada para explicar a rápida degradação das restaurações adesivas, com vistas à porção orgânica da camada híbrida, tem como base a atividade proteolítica da própria dentina.

Nesse contexto, a degradação desta camada se daria pela desestruturação do colágeno exposto pelo condicionamento ácido, em função da atividade de enzimas derivadas do próprio hospedeiro (Hashimoto et al., 2003; Pashley et al., 2004; Hebling et al., 2005; Armstrong et al., 2006; Mazzoni et al., 2006; Nishitani et al., 2006b; Carrilho et al., 2007a,b).

A constatação de que enzimas da própria dentina poderiam ser as responsáveis pela degradação do colágeno desmineralizado surgiu através de

estudos que buscavam identificar os mecanismos pelos quais a doença cárie era capaz de destruir os tecidos dentais (Tjäderhane et al., 1998). Inicialmente, imaginava-se que a matriz orgânica da dentina pudesse ser degradada por proteases bacterianas, entretanto, percebeu-se que as enzimas bacterianas eram incapazes de degradar a matriz (Van Strijp et al., 1997) e que esta estaria sendo degradada por enzimas endógenas (Tjäderhane et al., 1998). Porém, os ácidos provenientes do metabolismo bacteriano, especialmente o ácido láctico, são sim os responsáveis pela desmineralização dos tecidos duros dentais na cárie, expondo a matriz orgânica e permitindo a ação dessas enzimas endógenas (Tjäderhane et al., 1998).

Em um estudo *in vivo* recente, observou-se que a queda da resistência mecânica de restaurações adesivas realizadas em indivíduos adultos e mantidas em função por 14 meses foi acompanhada por uma significativa desintegração do colágeno contido na camada híbrida. O exame clínico daquelas restaurações e a análise morfológica das correspondentes interfaces de união com o substrato dental não revelaram qualquer sinal de infiltração ou ação de microorganismos como bactérias ou fungos (Carrilho et al., 2007b). Esta constatação corrobora com as observações que creditam à atividade de enzimas endógenas, a degradação da porção orgânica da camada híbrida.

Algumas enzimas capazes de degradar o colágeno, como por exemplo, as metaloproteinases (MMP-2, -3, -8, -9 e -20) e catepsinas (B, K e L) (a identificação das catepsinas K e L ainda não foi publicada) foram recentemente identificadas na dentina humana sadia (Martin-De Las Heras et al., 2000; Mazzoni et al., 2007; Sulkala et al., 2007; Tersariol et al., 2010). Vale lembrar que durante o condicionamento ácido, ficam expostas não apenas proteínas colágenas, mas também enzimas endógenas que se tornam ativas no momento em que estão livres do componente mineral e, portanto, aptas a degradar a matriz orgânica, especialmente a da dentina em consequência do seu alto conteúdo (Tjäderhane et al., 1998; Van Strijp et al., 2003; Chaussain-Miller et al., 2006).

As metaloproteinases (MMPs) constituem um grupo de pelo menos vinte e três enzimas presentes na matriz extracelular dos tecidos dos mamíferos onde se observa intensa atividade metabólica de remodelação e/ou degradação de vários tipos de colágeno (Fukae et al., 1990, 1992; Sulkala et al., 2001; Van Strijp et al., 2003). Entretanto, o primeiro membro da família das MMPs (MMP-1) foi descoberto

em 1962 por Gross e Lapiere que detectaram a existência desta enzima durante a observação da metamorfose da cauda dos girinos, capaz de degradar as fibrilas de colágeno. Mais tarde, esta enzima foi identificada em quadros patológicos como doenças de pele e da membrana sinovial (Birkedal-Hansen et al., 1993). Entre os anos 1960 a 1970, membros da família das MMPs foram identificados em outras doenças humanas como artrites reumatóides e câncer (Egeblad; Werb, 2002). No entanto, é importante salientar que as MMPs também possuem importante papel na fisiologia normal dos organismos.

As MMPs dos mamíferos possuem um domínio catalítico, responsável pela degradação do colágeno e um pró-domínio auto-inibitório. O pró-domínio contém um resíduo Cys (cisteína) que mantém o zinco em seu sítio ativo inibindo a atividade da enzima. Este íon zinco também está ligado ao domínio catalítico. Quando o pró-domínio é desestabilizado ou removido por ação de uma protease, interrompe-se a ligação deste íon zinco com o pró-domínio fazendo com que o sítio ativo da enzima (domínio catalítico) seja liberado, tornando-se disponível para degradar os substratos (Figura 2.1A) (Page-McCaw et al., 2007). Vale salientar que este mesmo íon zinco, apesar de ter sido desligado do pró-domínio, se mantém ainda ligado ao domínio catalítico, condição fundamental para que as metaloproteinases possam ser capazes de exercer sua função colagenolítica/gelatinolítica. Por esse motivo as metaloproteinases são enzimas denominadas como zinco dependentes.

Figura 2.1 – Estrutura esquemática das MMPs: (A) Estrutura da forma inativa das MMPs e da forma ativa após clivagem do pró-domínio e liberação do domínio catalítico (ativo); (B) Estrutura diferenciada da MMP-2 e MMP-9 pela presença dos domínios de fibronectina. (modificada de Page-McCaw et al., 2007)

Vale ainda ressaltar que a maior parte dos membros da família das MMPs contém um domínio hemopexina ligado ao domínio catalítico por uma articulação flexível (*hinge domain*). O domínio hemopexina é uma estrutura formada por quatro pás em β -hélice responsável por mediar interações entre proteínas. Diferentemente das demais, a MMP-2 e MMP-9 possuem domínios de fibronectina tipo II (Figura 2.1B) inseridas no domínio catalítico e que são responsáveis pela mediação com o colágeno (Page-McCaw et al., 2007).

O envolvimento de algumas MMPs na remodelação do colágeno tipo I durante a amelogênese e dentinogênese sinaliza que essas enzimas podem se tornar

inativas na matriz extracelular do esmalte e da dentina após o processo de mineralização (Fukae et al., 1990, 1992; Sulkala et al., 2001; Van Strijp et al., 2003).

Em condições fisiológicas normais, a atividade das MMPs é regulada em diversos níveis, entre os quais se destacam a intervenção na transcrição da proteína, interferência na secreção ou ainda na degranulação de sua forma inativa. Quando essas enzimas já estão ativas, elas podem ser controladas por inibidores extracelulares da matriz, os TIMPs endógenos (Ishiguro et al., 1994; Palosaari et al., 2003). Esses inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) são proteínas glicosiladas de baixo peso molecular que participam da regulação do metabolismo da matriz extracelular e inibem, sob diferentes graus de efetividade, a atividade de todos os tipos de MMPs (Chaussain-Miller et al., 2006; Sorsa et al., 2006). Entretanto, a exposição da matriz extracelular de tecidos colagênicos pode determinar distúrbios em um, ou mais de um, dos mecanismos reguladores da atividade de MMPs e, assim, favorecer a excessiva destruição e degradação do tecido (Chaussain-Miller et al., 2006; Sorsa et al., 2006).

Portanto, em situações em que há o desequilíbrio dos mecanismos reguladores da atividade das MMPs, o uso de inibidores sintéticos para estas proteases pode desempenhar um papel importante na preservação tecidual (Gendron et al., 1999; Sorsa et al., 2006, Carrilho et al., 2007a,b).

Gendron et al., (1999), reportaram que a atividade das enzimas purificadas MMP-2, -8 e -9 pode ser significativamente reduzida na presença de baixas concentrações de clorexidina (0.01 a 0.2%), um inibidor inespecífico de collagenases. Foi demonstrado recentemente que a clorexidina é também capaz de inibir a atividade de cisteíno-catepsinas (Scaffa et al., 2012) outro grupo de proteases identificadas na dentina e capazes de degradar o colágeno da matriz a partir de interações mantidas com as MMPs (Tersariol et al., 2010).

Estudos recentes demonstram que a degradação mecânica e morfológica de restaurações adesivas também foi significativamente reduzida quando a dentina desmineralizada foi previamente tratada com clorexidina (Hebling et al., 2005; Carrilho et al., 2007 a,b, Breschi et al., 2009).

Classicamente, a identificação dessas metaloproteinases em tecidos mineralizados, como a dentina, tem sido efetuada após exposição da matriz orgânica destes tecidos em soluções ácidas, relativamente mais fracas (pH 2.3 - 4.5) (Yang et al., 2006; Mazzoni et al., 2007; Kato et al., 2011) ou com agentes quelantes

como o EDTA, que possuem pH neutro (7 – 7.4) (Martin-De Las Heras et al., 2000; Sulkala et al., 2002; 2007). O uso destas soluções tem mostrado ser efetivo na preservação da integridade estrutural dos tecidos desmineralizados (Yang et al., 2006; Botta et al., 2012).

No entanto, a desmineralização da dentina e do esmalte previamente à adesão das resinas compostas, se faz, na maior parte dos casos, pela utilização de concentrações variáveis de ácido fosfórico, cujo pH reportado varia entre 0.4 e 0.9 (Zhang et al., 1998; Oliveira et al., 2002, Pashley et al., 2004; Mazzoni et al., 2006). Embora alguns estudos sugiram que o breve tempo de exposição da dentina ao ácido fosfórico (15 a 30s), durante os procedimentos de adesão, não seria suficiente para alterar as características estruturais deste substrato (Zhang et al., 1998; Agee et al., 2000. El Feninat et al., 2001), não há um consenso em torno deste tema. Outros estudos, por exemplo, apontam que o baixo pH do ácido fosfórico, e/ou *primers* ácidos derivados deste mesmo ácido, seria responsável pela desnaturação parcial das fibrilas de colágeno expostas durante o condicionamento da dentina, por ação enzimática da própria matriz (Bowen et al., 1984; Okamoto et al., 1991; Eliades et al., 1997; 1999).

Muitos trabalhos realizados nos últimos anos avaliaram a atividade colagenolítica de proteases da dentina sob diversas condições (Mazzoni et al., 2006; Carrilho et al., 2009; Mazzoni et al., 2011a,b; Mazzoni et al., 2012), além de terem confirmado a identidade dessas enzimas, identificando-as imunologicamente (Mazzoni et al., 2007; Sulkala et al., 2002; 2007; Santos et al., 2009).

Dentre os trabalhos publicados, em que a desmineralização das amostras do tecido dentinário foi realizada, muitos utilizaram concentrações de ácido fosfórico que variaram de 1% a 37% ou utilizaram o EDTA, conhecido inibidor de atividade enzimática de MMPs devido à sua ação quelante em relação ao Ca^{2+} e Zn^{2+} presentes no sítio ativo. A maior parte dos estudos utilizou o ácido fosfórico 1% ou 10% e poucos utilizaram 37% (Pashley et al., 2004; Mazzoni et al., 2006; Carrilho et al., 2009; Mazzoni et al., 2011a,b; Mazzoni et al., 2012).

Entre os trabalhos recentes realizados com o objetivo de elucidar a maneira pela qual as enzimas endógenas da dentina são ativadas, destacam-se os de Mazzoni et al (2006) e de Pashley et al (2004) que identificaram uma queda acentuada da atividade colagenolítica da dentina desmineralizada com ácido fosfórico 10% (Mazzoni et al., 2006) ou 37% (Pashley et al., 2004), contrariando as

informações que creditam ao baixo pH a ativação das proteases dentinárias.

Mazzoni et al. (2006) detectaram uma queda significativa na atividade enzimática de MMPs após o condicionamento de amostras de dentina com ácido fosfórico 10%. Pashley et al. (2004) também detectaram queda de 65% na atividade de enzimas da matriz dentinária após a desmineralização com ácido fosfórico 37%, em comparação com a atividade intrínseca de dentina mineralizada. Ambos os estudos especularam que o baixo pH do ácido fosfórico poderia ser responsável pela desnaturação das metaloproteinases potencialmente expostas, contribuindo com a reduzida atividade colagenolítica da dentina desmineralizada (Pashley et al., 2004; Mazzoni et al., 2006).

Desta forma, embora o ácido fosfórico fosse capaz de expor as metaloproteinases, após a desmineralização da dentina, supõe-se que seria também capaz de desnaturá-las, o que impediria uma ação degradante dessas enzimas sobre a porção orgânica da camada híbrida, favorecendo a manutenção da interface ao longo do tempo.

Diante do exposto, pode-se concluir que não há um consenso entre os pesquisadores sobre a maneira pela qual as metaloproteinases e outras proteases, que estão inativas no tecido mineralizado, tornam-se ativas e capazes de degradar a porção orgânica (colágeno) da interface presente na camada híbrida após o condicionamento ácido da dentina. Também não se sabe se as diferentes soluções ou soluções com diferentes concentrações e diferentes valores de pH, disponíveis para desmineralização da dentina podem ter algum efeito sobre a atividade colagenolítica deste substrato. Portanto, é de fundamental importância que se obtenham informações mais precisas a respeito deste tema, uma vez que o procedimento desmineralizante é um pré-requisito usual e rotineiro na prática adesiva e pode estar relacionado à criação de condições que favoreceriam à degradação da interface.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi investigar a maneira pela qual as diferentes concentrações das soluções desmineralizadoras podem estar relacionadas com a degradação da interface adesiva. Esta degradação se daria por meio da ativação de proteases da dentina capazes de degradar o colágeno exposto pelo condicionamento ácido e não protegido pelos monômeros resinosos dos sistemas adesivos. Esta investigação foi realizada valendo-se do uso do ácido fosfórico em diferentes concentrações, entre as quais as utilizadas na literatura, para testar a hipótese de que a solubilização da matriz orgânica da dentina pode variar em função da concentração da solução desmineralizadora empregada, influenciando na atividade proteolítica da dentina e, conseqüentemente, na durabilidade da interface adesiva.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Esta investigação tem como objetivos específicos testar a influência de soluções desmineralizadoras com diferentes concentrações de ácido fosfórico (1%, 10% e 37%) na atividade proteolítica da dentina humana sadia, na degradação do colágeno exposto pela desmineralização além de identificar imunologicamente as proteases (MMP-2 e MMP-9) envolvidas na solubilização do colágeno. A partir dos resultados obtidos por este estudo foi possível avaliar se os trabalhos encontrados na literatura estão subestimando ou sobreestimando a influência do ácido fosfórico na atividade enzimática da dentina sadia.

As hipóteses nulas a serem testadas são as de que: 1) As soluções com diferentes concentrações de ácido fosfórico não interferem na atividade proteolítica da dentina humana sadia. 2) Não é possível identificar imunologicamente as proteases (MMP-2 e MMP-9) envolvidas com a solubilização da matriz orgânica da

dentina sadia. 3) A solubilização do colágeno exposto pela desmineralização do tecido dentinário independe da concentração da solução desmineralizadora.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PREPARAÇÃO DO PÓ DE DENTINA E DESMINERALIZAÇÃO

Foram utilizados vinte dentes molares humanos permanentes, sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (protocolo 16/11 – CAAE 0014.0.017.000-11) (Anexo A), provenientes do Banco de Dentes desta mesma instituição.

O esmalte e o cimento dos dentes molares foram removidos com auxílio de pontas de diamante, sob constante refrigeração. A porção coronária foi separada da porção radicular e todo tecido pulpar foi removido com o auxílio de limas endodônticas. A dentina coronária foi cortada em pequenos fragmentos (Figura 4.1A) que foram lavados em ultrassom com água destilada por 15 minutos e, em seguida, desidratados em acetona por 5 minutos, secos e armazenados a -80°C até o momento em que foram utilizados.

Os fragmentos foram inseridos em uma matriz de aço e prensados em uma prensa hidráulica (MPH-15, Marcon, Marília, SP, Brasil) para que fossem produzidos fragmentos ainda menores (Figura 4.1B). Em seguida, os fragmentos foram novamente congelados a -80°C e triturados em um moinho de bolas automático (Figura 4.1C) por 7 minutos a 30Hz (MM400, Retsch, Haa, Alemanha). As partículas de pó produzidas (Figura 4.1D) foram peneiradas em uma peneira tamis (Telatest, Brasil) para obtenção de partículas com cerca de 44 µm . O pó foi armazenado em freezer a -80°C até o momento do uso.

Figura 4.1 – Preparação do pó de dentina: (A) Fragmentos de dentina obtidos com pontas diamantadas; (B) Prensa hidráulica; (C) Moinho de bolas; (D) Pó de dentina obtido

As partículas de pó de dentina foram separadas em alíquotas de 1g e transferidas para tubos falcon dentro dos quais foram misturadas as soluções desmineralizantes de ácido fosfórico (AF1%, AF10% e AF37%) (Figura 4.2).

Figura 4.2 – Desmineralização do pó de dentina em tubos falcon de acordo com as diferentes soluções desmineralizadoras utilizadas

As soluções de ácido fosfórico foram produzidas a partir do ácido fosfórico concentrado 85% (Fluka, Suíça). Os grupos experimentais estão descritos no quadro 4.1. A solução de ácido fosfórico 1% (pH=1.4) foi utilizada para desmineralização do pó de dentina por 10 minutos. A solução de ácido fosfórico 10% (pH=1.0) foi utilizada por 1 minuto e a solução de ácido fosfórico 37% (pH=0.4) foi utilizada por 20 segundos. Em todos os grupos foram adicionados 3mL da solução desmineralizante. O tempo de desmineralização foi estabelecido a partir da concentração do ácido fosfórico. Quanto maior a concentração da solução, menor o tempo para desmineralização do substrato. Dessa maneira, o tempo compensaria a concentração da solução desmineralizadora.

Grupos	pH	Tempo de Desmineralização
AF 1%	1.4	10 min
AF 10%	1.0	1 min
AF 37%	0.4	20 seg

Quadro 4.1 – Grupos experimentais segundo a porcentagem de ácido fosfórico (AF), o pH e o tempo utilizado para a desmineralização do pó de dentina

Após os períodos de desmineralização, o ácido foi tamponado com uma solução 4M de hidróxido de sódio para os dois primeiros grupos e 10M para o terceiro grupo. Foi necessária a utilização de uma solução de hidróxido de sódio mais concentrada (10M) para o tamponamento do AF37% em virtude do volume necessário para que todo o ácido pudesse ser neutralizado. Todo conteúdo dos tubos foi centrifugado a 4°C (5000 rpm) (rotor Hitashi T15A24) por 10 minutos (Himac CF15R, Hitashi, Tóquio, Japão) e o precipitado utilizado para extração das MMPs.

Ao fim dos períodos de desmineralização, algumas amostras de dentina desmineralizada foram brevemente desidratadas em acetona e radiografadas para que os diferentes graus de desmineralização pudessem ser confirmados.

4.2 DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO

O sobrenadante obtido, após a desmineralização do pó de dentina, que consiste na mistura do ácido fosfórico tamponado pelo hidróxido de sódio foi utilizado para determinação espectrofotométrica da concentração do íon cálcio liberado.

Alíquotas de 1 mL do sobrenadante de cada um dos grupos experimentais (AF 1%, 10% e 37%) foram colocadas em tubos plásticos. Foi adicionado 0,5 mL de ácido clorântrico 0.1% aos tubos. A mistura permaneceu em repouso por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 12000 rpm (rotor Sorvall SM-24) a 4°C (Sorvall RC6+, Thermo Scientific, Schwerte, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em 3 mL de álcool isopropílico 50%. Nova centrifugação foi realizada por 30 minutos a 12000 rpm a 4°C (Sorvall RC6+, Thermo Scientific, Schwerte, Alemanha) e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 3 mL de EDTA 5% ao precipitado que foi homogeneizado em um agitador de tubos.

As amostras juntamente com a curva padrão com concentrações conhecidas de cálcio (0,25; 0,50; 0,75; 1,00 mg/mL) foram avaliadas em espectrofotômetro (DU800, Beckman Coulter, Indianapolis, EUA) com um comprimento de onda de 520nm.

4.3 ZIMOGRAFIA

Ao precipitado obtido após a desmineralização do pó de dentina foi misturado o tampão de extração de proteínas (50mM Tris-HCl, 5mM CaCl₂, 100mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.1% NONIDET P-40, 0.1mM ZnCl₂, 0.02% NaN₃). O pó de dentina imerso em tampão de extração foi tratado em ultrassom por 10 minutos e, em seguida, incubado por 24h a 4°C sob agitação.

Após o período de incubação, as amostras foram novamente centrifugadas a 5000 rpm (rotor Hitashi T15A24) a 4°C por 10 minutos (Himac CF15R, Hitashi, Tóquio, Japão). O sobrenadante contendo o extrato de proteínas foi transferido para

um novo tubo plástico onde foi realizada a precipitação das proteínas através da adição lenta e gradual de TCA 25% (ácido tricloroacético, Sigma-Aldrich, Alemanha) sob agitação a 4°C. Em seguida, a mistura foi mantida em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente. Nova centrifugação foi realizada por 15 minutos a 7000 rpm (rotor Hitashi T15A24) a 4°C (Himac CF15R, Hitashi, Tóquio, Japão) e o precipitado de proteínas coletado.

O precipitado coletado foi lavado duas vezes com 1,5 mL de acetona e transferido para um tubo eppendorf (Hamburgo, Alemanha). Em seguida, após nova centrifugação a 14000 rpm (rotor Hitashi T15A22) por 15 minutos a 4°C (Himac CF15R, Hitashi, Tóquio, Japão) e descarte do sobrenadante foi adicionado 0,5 mL de éter dietílico ao precipitado de proteínas. Após outra centrifugação (14000 rpm por 15 minutos a 4°C) (Himac CF15R, Hitashi, Tóquio, Japão) e evaporação do éter, as proteínas foram ressuspensas em 1.5M de Tris-HCl (pH=8.8) e água.

Amostras de albumina utilizadas para a realização da curva padrão e as amostras de proteínas extraídas da dentina desmineralizada foram tratadas com uma mistura reativa (solução alcalina, sulfato de cobre e tartarato de sódio) e solução de Folin (Sigma-Aldrich, Suíça). A concentração total de proteínas das amostras foi determinada através do método de Lowry et al. (1951) por análise espectrofotométrica com comprimento de onda de 660nm. Alíquotas liofilizadas de 80 µg de proteínas da dentina tratadas com APMA (acetato p-aminofenilmercúrio) e tampão de amostra (1.5M Tris, glicerol 50%, azul de bromofenol 0,05%, SDS 10%) foram utilizadas para as análises.

As proteínas do substrato dentinário foram submetidas à eletroforese, em condições não-reduzidas, em géis de poliacrilamida com 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) co-polimerizados com 2 mg/mL de gelatina fluorescente. A preparação dos géis e a eletroforese das proteínas dentinárias foi realizada através da utilização dos equipamentos fornecidos pela BioRad (Mini-Protean Tetra-Cell, California, EUA) (Figura 4.3A, B e C). Em cada gel foi utilizado como padrão um marcador de peso molecular (Page Ruler Plus Prestained SM1811, Bio Rad, California, EUA) com valores pré-estabelecidos em: 250 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 72KDa, 55 kDa, 36KDa, 28KDa, 17 KDa e 10KDa.

Após a eletroforese a atividade gelatinolítica das proteínas expressas nos géis foi identificada através do método do zimograma.

Figura 4.3 – Equipamentos utilizados para a preparação dos géis de poliacrilamida e para a eletroforese das proteínas da dentina: (A) Suporte para acomodação dos vidros; (B) Suportes posicionados para a preparação dos géis; (C) Cuba dentro da qual é realizada a eletroforese das proteínas extraídas; (D) Zimograma obtido após a eluição das proteínas e corado com Coomassie Blue

Os géis de SDS-poliacrilamida (Figura 4.3D) foram lavados duas vezes em solução aquosa de Triton X-100 a 2% por 30 minutos e incubados a 37°C por 24h em tampão de incubação (50mM Tris-HCl, 5mM CaCl_2 pH 7.4). Zimografias para controle negativo foram incubadas com o mesmo tampão contendo 2mM de 1,10-fenantrolina, conhecido inibidor de atividade enzimática. A ativação das enzimas foi realizada com 2mM de acetato p-aminofenilmercúrio (APMA) antes da eletroforese. Seis diferentes extrações de proteínas da matriz dentinária foram realizadas para que a atividade das gelatinases pudesse ser mensurada. Após a incubação, as imagens dos zimogramas foram capturadas pelo aparelho Quantity One (BioRad, California, EUA). Em seguida, os géis foram corados em solução aquosa de 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 sob agitação suave para confirmação da zimografia. Os zimogramas foram avaliados por densitometria através de um programa de análise de imagens (Scion Image, www.scioncorp.org).

4.4 WESTERN BLOT

Para a confirmação da identidade imunológica das MMPs, 80µg de amostras do extrato de proteínas, tratadas com β-mercapto-etanol e tampão de amostra (1.5M Tris, glicerol 50%, azul de bromofenol 0,05%, SDS 10%), foram aquecidas em água fervente por 5 minutos e submetidas novamente à eletroforese em géis de SDS-poliacrilamida, agora em condições reduzidas. Em cada gel foi utilizado como padrão um marcador de peso molecular (Page Ruler Plus Prestained SM1811, Bio Rad, Califórnia, EUA) com valores pré-estabelecidos em: 250 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 72KDa, 55 kDa, 36KDa, 28KDa, 17 KDa e 10KDa.

As proteínas separadas no gel foram eletricamente transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Figura 4.4B) (Trans-Blot, BioRad, California, EUA) através do aparelho Semi-Dry Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad, California, EUA) por 2h e 30 minutos em 15V (Figura 4.4A). Para inibir as ligações inespecíficas dos anticorpos, a membrana foi saturada por 1h em temperatura ambiente com solução bloqueadora contendo 5% de leite desnatado (leite Molico®, Nestlé, Brasil) em tampão PBS-Tween20 0.01% (pH=7.4). Em seguida, a membrana foi incubada *overnight* a 4°C com o anticorpo primário policlonal anti-MMP-2 e anti-MMP-9 (abcam, Massachusetts, EUA) em tampão PBS-Tween20 0.01%. Por último a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (abcam, Massachusetts, EUA) por 1h em temperatura ambiente. O anticorpo conjugado com peroxidase se liga aos anticorpos primários que podem, então, ser detectados em radiografias.

Figura 4.4 – Equipamento utilizado para transferir eletricamente as proteínas para uma membrana de nitrocelulose: (A) Aparelho Semi-Dry para transferência (B) Membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas separadas no gel.

A membrana foi revelada com um substrato para quimioluminescência (ECL, abcam, Massachusetts, EUA) em filmes radiográficos (GE, Inglaterra). As imagens reveladas foram avaliadas por densitometria através de um programa de análise de imagens (Scion Image, www.scioncorp.org).

4.5 HIDROXIPROLINA

O precipitado obtido após a extração das proteínas foi liofilizado e separado em alíquotas de 40 mg (n=10) para cada condição experimental (AF 1%, AF 10% e AF 37%). As alíquotas liofilizadas foram lavadas em água destilada e em seguida, ressuspensas em 1mL de 50mM MES (pH=7.0) para que fossem incubadas por 1h a 37°C sob agitação.

Após centrifugação por 5 minutos a 14000 rpm (rotor Hitashi T15A22) a 4°C (Himac CF15R, Hitashi, Tóquio, Japão), o sobrenadante foi descartado e as amostras foram incubadas em 1mL de “saliva artificial” (50 mmol/L HEPES, 5 mmol/L CaCl_2 , 0.001 mmol/L ZnCl_2 , 150 mmol/L NaCl, 0.3 mmol/L PMSF, 3mmol/L NaN_3) a 37°C por 24h sob agitação.

Nova centrifugação (14000 rpm por 5 min a 4°C) (Himac CF15R, Hitashi, Tóquio, Japão) foi realizada e 500µL do sobrenadante foi transferido para um tubo plástico limpo, foi liofilizado, e ressuspenso em água (10 µL). Em seguida, 40 µL de 2N NaOH foram adicionados aos tubos. As amostras foram homogeneizadas em um

agitador de tubos e centrifugadas a 1000 rpm por 60 segundos a 4°C (Himac CF15R, Hitashi, Tóquio, Japão). A hidrólise das amostras foi realizada em autoclave (Cristófoli, Paraná, Brasil) em dois ciclos consecutivos de 45 minutos a 120°C (ciclo de esterilização de líquidos). Após a hidrólise, foram adicionados 450 µL de 0,056M cloramina-T às amostras, agitando-as cuidadosamente. O período para oxidação foi de 25 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, 500 µL de reagente de Erlich 1M (p-dimetilaminobenzaldeído, n-propanol e ácido perclórico) foram adicionados às amostras que, em seguida, foram incubadas por 40 minutos em estufa a 65°C (Figura 4.5).

Figura 4.5 – Amostras do precipitado obtido após a extração das proteínas: (A) Amostras preparadas para avaliação do conteúdo de hidroxiprolina antes da incubação a 65°C; (B) Mesmas amostras após a incubação em estufa, mostrando o conteúdo de hidroxiprolina liberado

A verificação da concentração de hidroxiprolina (HYP) das amostras foi determinada por análise espectrofotométrica. Os valores de absorbância foram mensurados em espectrofotômetro com comprimento de onda de 550nm (Beckman Coulter DU-800, Indianapolis, EUA). Uma curva padrão com concentrações conhecidas de hidroxiprolina (2, 5, 10, 15 e 25 µg/µL) foi feita simultaneamente.

A solubilização do colágeno da dentina humana sadia foi verificada pela identificação do conteúdo de HYP presente nos sobrenadantes hidrolisados. O emprego deste método de avaliação da degradação do colágeno se baseia no

princípio de que cerca de 10% do colágeno tipo I (principal constituinte orgânico da matriz de dentina) é constituído por este aminoácido (White et al., 1968; Wohllebe; Carmichael, 1979; Bornstein; Sage, 1980; Taskiran et al., 1999), que por sua vez inexistente ou existe em concentrações muito pequenas em outras proteínas (White et al., 1968).

4.6 ZIMOGRAFIA *IN SITU*

Esse experimento foi realizado para que fosse possível analisar a atividade das proteases no interior do substrato dentinário após sua desmineralização com as soluções de diferentes concentrações de ácido fosfórico.

Fatias de aproximadamente 0.3 mm de um outro dente foram obtidas através de cortes perpendiculares ao longo eixo do dente em uma cortadeira metalográfica (Isomet 1000, Buheler, Lake Bluff, EUA). As fatias foram, então, polidas com lixas de carbetto de silício de granulação 1500 e 2000 até que se tornassem transparentes e para que a *smear layer* fosse criada. Em seguida, as fatias foram condicionadas com as três diferentes soluções de ácido fosfórico, ou seja, AF 1%, AF10% e AF 37% produzidas a partir do ácido fosfórico concentrado. Foram utilizados os mesmos tempos já descritos para a desmineralização do pó de dentina, ou seja, 10 minutos para o AF 1%, 1 minuto para o AF 10% e 20 segundos para o AF 37%.

As fatias desmineralizadas foram lavadas em água destilada, secas e coladas com cianoacrilato (SuperBonder, Loctite, Henkel, Brasil) em uma lâmina utilizada em microscopia óptica. Sobre as fatias foi aplicada a gelatina conjugada com fluoresceína (EnzChek gelatinase/colagenase assay kit, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Quando ligado à gelatina o fluoróforo (fluoresceína) não emite a fluorescência. Entretanto, uma vez que a gelatina é hidrolisada por ação de gelatinases a fluorescência ocorre, indicando que há atividade enzimática no substrato dentinário que está em contato com a gelatina. Por esse motivo esta técnica é denominada de zimografia *in situ*, pois é possível detectar a atividade proteolítica do substrato sobre o qual é aplicada a gelatina.

A gelatina foi diluída em tampão de diluição 1:8 (NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0) e um agente anti-fade foi adicionado (Mounting Medium). Na sequência 80 µL dessa mistura contendo gelatina conjugada com fluoresceína foi aplicada sobre cada fatia de dentina. Sobre as fatias de dentina com gelatina é colocada uma lamínula também utilizada em microscopia óptica para o selamento da amostra.

O conjunto foi incubado em meio saturado de umidade a 37°C por 48 horas sob agitação e protegido da luz. As amostras foram então, analisadas por microscópio confocal multi-photon (Zeiss, LSM 780, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Seções ópticas de 85 µm de espessura foram adquiridas a partir de diferentes planos focais. As imagens empilhadas obtidas foram analisadas, quantificadas e processadas através do software ZEN 2010 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes foram realizados com seis repetições (n=6), ou seja, foram realizados seis diferentes experimentos com as três condições experimentais testadas. Análise de variância de um fator sem vinculação foi empregada para identificar diferenças significativas entre as médias obtidas por zimografia. Para contraste das médias foi realizado o teste de Student-Newman-Keuls com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para os resultados obtidos pelos testes que avaliaram a concentração de Ca ou de HYP liberados foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, pois os valores obtidos não foram normais e homocedásticos. As médias foram contrastadas através do teste de Student-Newman-Keuls com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Testes de Pearson foram realizados para verificação de correlações entre a concentração de HYP liberada versus a atividade de MMP-2 e entre a concentração de HYP liberada versus a concentração de Ca liberado.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA POR ZIMOGRAMA

A atividade gelatinolítica das enzimas recombinantes MMP-2 (72KDa) e MMP-9 (95KDa) usadas como controles pode ser detectada no zimograma da figura 5.1A. A atividade enzimática de proteases provenientes da matriz dentinária parcialmente desmineralizada pelas diferentes concentrações de ácido fosfórico também pode ser observada no zimograma da figura 5.1A.

Figura 5.1 – Zimogramas obtidos após a eletroforese das proteínas da dentina em géis de poliacrilamida. À esquerda estão os pesos moleculares do padrão de pesos em KDa: (A) Zimograma representativo de seis diferentes extrações de proteínas onde é possível observar a atividade enzimática de MMPs; (B) Zimograma controle onde a atividade enzimática das MMPs foi inibida pela incubação com fenantrolina

Na figura 5.1A tem-se um zimograma representativo dos seis diferentes experimentos realizados para determinação da atividade proteolítica das metaloproteinases da dentina sob ação das soluções desmineralizantes. A figura 5.1B apresenta um zimograma representativo da inibição da atividade enzimática das metaloproteinases pela pré-incubação das amostras e dos controles com um conhecido inibidor, a fenantrolina. A fenantrolina foi capaz de inibir atividade das enzimas recombinantes e das enzimas extraídas da dentina, servindo como um controle negativo.

O gráfico da figura 5.2 apresenta os valores da análise por densitometria, em unidades arbitrárias, da atividade enzimática da gelatinase MMP-2 detectada nos três diferentes tratamentos desmineralizantes aos quais as amostras de pó de dentina foram submetidas. Para efeito de comparação o gráfico apresenta o valor obtido pela atividade da enzima recombinante utilizada como controle. Para avaliação estatística, o valor obtido pela atividade da enzima recombinante não foi considerado.

Figura 5.2 – Médias e desvios padrão (unidades arbitrárias) da atividade enzimática de MMP-2 mensurada após o emprego das soluções desmineralizadoras. A atividade da enzima recombinante (em amarelo) foi utilizada apenas para efeito de comparação

A análise de variância demonstrou que a atividade enzimática de MMP-2 foi estatisticamente maior quando a dentina foi desmineralizada com ácido fosfórico 10%. A utilização do ácido fosfórico 1% apresentou valores estatisticamente semelhantes aos dois demais grupos. O uso do ácido fosfórico 37% diminuiu consideravelmente a atividade de MMP-2 em relação ao uso do ácido fosfórico 10%. As médias e o desvio padrão dos valores obtidos pela leitura por densitometria da atividade de MMP-2 estão apresentados na tabela 5.1. Em nenhuma das amostras desmineralizadas com ácido fosfórico (1%, 10% ou 37%) foi detectada a atividade enzimática da MMP-9 através dos zimogramas realizados (Figura 5.1A).

Na tabela 5.1 é possível verificar o valor obtido por densitometria da atividade da enzima recombinante de MMP-2. A atividade da enzima recombinante é maior que a atividade das proteases extraídas da dentina desmineralizada.

Tabela 5.1- Média e desvio padrão da atividade enzimática de MMP-2 (unidades arbitrárias). Letras iguais significam semelhança estatística ($p < 0,05$)

Atividade MMP-2 (unidades arbitrárias)			
MMP-2	AF 1%	AF10%	AF37%
317±66	199±41 ab	246±65 a	143±31 b

5.2 IDENTIFICAÇÃO IMUNOLÓGICA POR *WESTERN BLOT*

A confirmação imunológica da identidade das metaloproteinases foi realizada através de *immunoblotting* dos extratos de dentina com anticorpos policlonais anti-MMP-2 e anti-MMP-9. As enzimas recombinantes também foram imunologicamente identificadas, servindo como controles.

A figura 5.3 representa o *immunoblotting* das enzimas recombinantes controle, MMP-2 e MMP-9, com anticorpos anti-MMP-2 e anti-MMP-9. As duas enzimas foram expressas na altura correspondente ao seu peso molecular, ou seja, 72KDa para a MMP-2 e 95 KDa para a MMP-9. Foram testadas duas diferentes concentrações de proteína para as enzimas recombinantes. Quando foi aplicado 0,50µg da enzima, a revelação por quimioluminescência mostrou-se demasiadamente intensa. Em contrapartida, quando 0,25 µg da enzima foram aplicadas ao gel para a eletroforese, a intensidade das bandas reveladas se mostrou mais adequada, tornando-se menos intensa e mais nítida.

Figura 5.3 – *Immunoblotting* das enzimas recombinantes com seus respectivos anticorpos (anti-MMP-2 e anti-MMP-9) e com diferentes concentrações de proteína: (A) Expressão de MMP-2; (B) Expressão de MMP-9

A figura 5.4 apresenta radiografias reveladas com as amostras de extratos de pó de dentina, além das enzimas recombinantes como controle. Foi possível

confirmar a identidade da enzima MMP-2, além de detectar diferenças na expressão desta protease (Figura 5.4A) entre os grupos experimentais estudados. Assim como nos zimogramas descritos na seção anterior, a expressão de MMP-2 foi maior quando a desmineralização ocorreu pelo uso de ácido fosfórico 1% ou 10% e, consideravelmente menor quando foi usado o ácido fosfórico 37% para a desmineralização das amostras. A MMP-9 não foi detectada nos extratos dentinários, embora tenha sido expressa nos controles (Figura 5.4B).

Figura 5.4 – *Immunoblotting* das enzimas recombinantes e dos extratos de proteínas da dentina: (A) *immunoblotting* com anticorpo anti-MMP-2; (B) *immunoblotting* com anticorpo anti-MMP-9

O gráfico da figura 5.5 apresenta os valores da expressão da MMP-2, obtidos por densitometria, das bandas reveladas após *immunoblotting* dos extratos de dentina e da enzima recombinante controle com o anticorpo anti-MMP-2.

Figura 5.5 – Valores da expressão (unidades arbitrárias) da MMP-2 mensurada após o *immunoblotting* dos extratos de dentina com anticorpo específico. A expressão da enzima recombinante (em amarelo) foi utilizada apenas para efeito de comparação.

Na tabela 5.2 estão apresentados os valores obtidos por densitometria (unidades arbitrárias) da expressão de MMP-2 recombinante e dos extratos de dentina após *immunoblotting* com anticorpo anti-MMP-2. Os valores obtidos pela expressão da MMP-2 não foram analisados estatisticamente, pois se objetivava apenas a identificação imunológica da enzima. Dessa forma, foram avaliados imunologicamente extratos de dentina de apenas dois diferentes experimentos. Na tabela 5.2 estão descritas as médias obtidas pela densitometria destes dois diferentes experimentos para cada grupo experimental.

Tabela 5.2 – Valores, em unidades arbitrárias, mensurados por densitometria da expressão de MMP-2 após *immunoblotting* com anticorpo específico.

Expressão MMP-2 (unidades arbitrárias)			
MMP-2	AF 1%	AF10%	AF37%
15240	6489	10165	3205

5.3 LIBERAÇÃO DE CÁLCIO APÓS DESMINERALIZAÇÃO

Foi realizada a mensuração da concentração do íon cálcio (Ca^{2+}) liberado após a desmineralização das amostras do tecido dentinário ($n=6$) para os três diferentes grupos experimentais (AF1%, AF10% e AF37%).

O gráfico da figura 5.6 demonstra que quanto maior a concentração do ácido fosfórico, maior foi a concentração do íon cálcio (Ca^{2+}) liberada. Portanto, a desmineralização realizada com a utilização de ácido fosfórico 37% permitiu a liberação de valores de concentração de íon cálcio (Ca^{2+}), em $\mu\text{g/mL}$, estatisticamente superiores aos valores determinados para os demais grupos. O uso do ácido fosfórico 10% determinou a liberação de valores de íon cálcio (Ca^{2+}) estatisticamente superiores aos valores encontrados pela desmineralização do pó de dentina com ácido fosfórico 1%.

Figura 5.6 – Médias e desvios padrão (em µg/mL) da concentração de cálcio liberado após o emprego das soluções desmineralizadoras

Na tabela 5.3 estão apresentados os valores médios da concentração de cálcio liberado, em µg/mL, e o desvio padrão de seis diferentes experimentos, após a desmineralização das amostras de pó de dentina com as diferentes concentrações de ácido fosfórico utilizadas neste estudo.

Tabela 5.3 - Média e desvio padrão da concentração de cálcio liberado em µg/mL. Letras iguais significam semelhança estatística ($p < 0,05$)

Cálcio liberado (ug/mL)		
AF 1%	AF10%	AF37%
33,61 ± 12,34 c	81,00 ± 22,56 b	205,37 ± 52,40 a

5.4 AVALIAÇÃO DO COLÁGENO SOLUBILIZADO POR HIDROXIPROLINA

A solubilização do colágeno desmineralizado resultante da atividade das metaloproteinases da matriz da dentina, entre outras enzimas, pode ser sugerida pela identificação do conteúdo do aminoácido hidroxiprolina (HYP) presente nas amostras em que a desmineralização foi realizada. Esta avaliação é possível por que cerca de 10% do colágeno tipo I é constituído por este aminoácido, além do fato de que ele não é encontrado facilmente em outras proteínas, como já relatado no capítulo de Material e Métodos.

No presente estudo foi possível avaliar a concentração de HYP liberada após o tratamento das amostras do pó de dentina com as três diferentes soluções desmineralizadoras. Diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos estudados foram detectadas.

A maior concentração de HYP, expressa em $\mu\text{g/mL}$, foi encontrada nos extratos dentinários desmineralizados com ácido fosfórico na concentração 10%. Em seguida, em ordem decrescente de concentração aparecem os valores encontrados com o uso do ácido fosfórico cuja concentração era de 1%. Os menores valores de concentração de HYP aparecem no grupo em que foi utilizado o ácido fosfórico 37%.

A concentração de HYP também pode ser expressa em $\mu\text{g/mL/mg}$ de dentina, ou seja, em função do peso inicial de dentina utilizado para a realização do teste. Como foram utilizados 40mg de dentina para cada amostra ($n=10$) de cada um dos 3 grupos experimentais, foi possível detectar a maior concentração de HYP por mg de dentina quando os extratos dentinários foram desmineralizados com ácido fosfórico 10%. Em seguida, surgem os valores de HYP quando utilizado o ácido fosfórico 1%. Os menores valores da concentração de HYP por mg de dentina foram detectados quando o ácido fosfórico 37% foi utilizado para a desmineralização do substrato dentinário.

O gráfico da figura 5.7 demonstra as diferenças na concentração da HYP dos três grupos experimentais estudados provenientes da leitura por espectrofotometria.

Figura 5.7 – Médias e desvios padrão (em $\mu\text{g/mL}$) da concentração de HYP liberada após o emprego das soluções desmineralizadoras

O gráfico da figura 5.8 demonstra as diferenças na concentração da HYP por mg de dentina nos três grupos experimentais estudados provenientes da leitura por espectrofotometria.

Figura 5.8 – Médias e desvios padrão (em $\mu\text{g/mL/mg}$ de dentina) da concentração de HYP liberada após o emprego das soluções desmineralizadoras

A tabela 5.4 apresenta as médias e desvios padrão das concentrações de HYP, em $\mu\text{g/mL}$, para cada um dos três grupos experimentais.

Tabela 5.4 - Média e desvio padrão da concentração de HYP liberada em $\mu\text{g/mL}$. Letras iguais significam semelhança estatística ($p < 0,05$)

HYP $\mu\text{g/mL}$		
AF 1%	AF 10%	AF37%
8,74 $\pm$ 5,76 b	37,42 $\pm$ 12,20 a	4,38 $\pm$ 0,58 c

Já a tabela 5.5 apresenta os valores das médias e desvios padrão das concentrações de HYP calculadas em função da quantidade, em mg, de dentina utilizada para a realização do experimento, ou seja em $\mu\text{g/mL/mg}$ de dentina.

Tabela 5.5 - Média e desvio padrão da concentração de HYP liberada em $\mu\text{g/mL/mg}$ de dentina. Letras iguais significam semelhança estatística ($p < 0,05$)

HYP ($\mu\text{g/mL/mg}$ dentina)		
AF 1%	AF 10%	AF37%
0,22 $\pm$ 0,14 b	0,94 $\pm$ 0,30 a	0,08 $\pm$ 0,02 c

A partir dos resultados obtidos com a avaliação do cálcio liberado pelo condicionamento do pó de dentina, assim como aqueles obtidos pela avaliação da concentração do aminoácido hidroxiprolina liberado, foi possível realizar uma estimativa a respeito da porcentagem de colágeno solubilizado pela ação das metaloproteinases e outras proteases da dentina ativadas pelo processo de desmineralização.

É sabido que a dentina possui em sua composição aproximadamente 70%, em peso, de conteúdo mineral. Essa porção do tecido dentinário é formada pelos

cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Através do somatório dos pesos atômicos dos elementos químicos constituintes da molécula de hidroxiapatita, obtém-se o peso molecular. A partir do cálculo do peso da molécula de hidroxiapatita e conhecendo o peso atômico do elemento Ca é possível calcular a porcentagem, em peso, correspondente ao elemento Ca dentro da molécula de hidroxiapatita.

Sabe-se também que além do seu conteúdo mineral, a dentina é formada por cerca de 12%, em peso, de água e por aproximadamente 18%, também em peso, de matriz orgânica. A porção orgânica da dentina é formada por aproximadamente 90% de colágeno tipo I. Já a cadeia polipeptídica do colágeno possui cerca de 10% de sua composição formada pelo aminoácido hidroxiprolina.

Essas informações a respeito do conteúdo da dentina foram utilizadas para que se pudesse estimar qual das concentrações de ácido fosfórico conferiria maior atividade enzimática relativa à quantidade de matriz de dentina exposta pela desmineralização parcial do tecido e, portanto, passível de ser degradada.

Para mensurar a concentração de hidroxiprolina presente nos extratos de dentina foi utilizado, como descrito no capítulo Materiais e Métodos, 40 mg de pó de dentina. A partir do peso inicial foi possível calcular por meio das porcentagens já conhecidas e descritas acima, a quantidade, em μg , dos componentes estruturais da dentina como demonstrado na tabela 5.6. Portanto, pode-se dizer que a partir dos 40mg (40.000 μg) de dentina inicialmente disponíveis, teríamos 28.000 μg de cristais de hidroxiapatita, sendo cerca de 40% desse total formado pelo elemento Ca, ou seja, aproximadamente 11.200 μg de Ca. Seguindo esta mesma linha de raciocínio pode-se concluir que há ainda aproximadamente 4.800 μg de água e 7.200 μg de matriz orgânica.

Tabela 5.6 – Estimativa da porcentagem, em peso, da quantidade de cada componente constituinte do tecido dentinário. Cálculo em µg de cada componente do tecido dentinário a partir de 40mg de dentina utilizada para realização da análise por hidroxiprolina

Dentina	70% mineral $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	40% cálcio	
	12% água		
	18% matriz orgânica	90% colágeno	10% HYP
Dentina 40mg = 40.000µg	28.000µg mineral	11.200µg cálcio	
	4.800µg água		
	7.200µg matriz orgânica	6.480µg colágeno	648µg HYP

Do total, em µg, correspondente ao peso da matriz orgânica, calcula-se que haja cerca de 6.480 µg de colágeno (90% do total) e, conseqüentemente, 648 µg de hidroxiprolina (10% do total de aminoácidos) (Tabela 5.6).

Na tabela 5.7 é possível observar os cálculos realizados para estimar a porcentagem de colágeno degradado. Supondo-se que se 100% da dentina fosse desmineralizada, haveria a liberação de cerca de 11.200 µg de Ca. Como através da avaliação por espectrofotometria foi possível obter os valores de Ca de fato liberados em cada um dos três distintos tratamentos realizados na dentina, conseguimos calcular a porcentagem de desmineralização alcançada pelo uso de cada uma das concentrações de ácido fosfórico (Tabela 5.7).

Levando em conta a porcentagem calculada de desmineralização de cada uma das soluções de ácido fosfórico e também o conhecimento de que 6.480 µg de colágeno teria sido liberado caso houvesse 100% de desmineralização, foi possível calcular, por regra de três simples, o quanto de colágeno foi realmente exposto pela desmineralização provocada por cada grupo experimental e, conseqüentemente, o quanto de HYP haveria sido liberado caso 100% do colágeno exposto tivesse sido degradado, ou seja, 10% do total de colágeno exposto calculado (Tabela 5.7).

Como foram calculados os valores de HYP realmente liberados, por mg de dentina, e diante dos valores de HYP estimados caso tivesse ocorrido a degradação da totalidade de colágeno exposto, tornou-se possível obter a porcentagem de colágeno realmente degradado pelas proteases da dentina (Tabela 5.7) ativadas com a acidificação do meio pelo condicionamento ácido.

Tabela 5.7 – Cálculo estimado da porcentagem de colágeno degradado após exposição da matriz orgânica pela desmineralização alcançada por cada uma das concentrações das soluções de ácido fosfórico

Grupos	Cálcio liberado	Desmineralização (%)	Colágeno	HYP	HYP (ug/mL/mg dentina)	Colágeno Degradado (%)
Dentina	11.200µg	100 %	6.480µg	648µg	-----	-----
AF 1%	33,61µg	0,30 %	19,44µg	1,94µg	0,22	11,34%
AF10%	81,00µg	0,72 %	46,66µg	4,67µg	0,94	20,13%
AF37%	205,37µg	1,83 %	118,58µg	11,86µg	0,08	0,68%

É lícito enfatizar que o uso do ácido fosfórico 10% demonstrou ser o responsável pela maior taxa de degradação de colágeno exposto (20,13%). Em seguida, aparecem os valores intermediários (11,34%) de degradação do colágeno obtidos pela utilização do ácido fosfórico 1%. Por último, surgem os menores valores (0,68%) de degradação de colágeno obtidos pelo condicionamento da dentina com ácido fosfórico 37%.

5.5 CORRELAÇÕES

O teste de correlação permite avaliar a existência de relação entre o comportamento de duas ou mais variáveis e em que medida se dá tal interação. Para confrontar as relações existentes entre os resultados obtidos pela avaliação da atividade enzimática da MMP-2, pela concentração de HYP liberada e a concentração de cálcio liberada foi proposta a realização do teste de correlação de Pearson.

O gráfico da figura 5.9 demonstra a existência de uma correlação positiva ($r=0,89$) entre a atividade de MMP-2 e a mensuração de HYP (µg/mL), o que quer dizer que o aumento da atividade da protease MMP-2, está positivamente relacionado com o aumento da concentração do aminoácido hidroxiprolina liberado.

Figura 5.9 – Gráfico de correlação positiva de Pearson entre HYP (µg/mL) e atividade de MMP-2 (unidades arbitrárias)

O gráfico da figura 5.10 demonstra a existência de uma correlação negativa ($r = -0,36$) entre a concentração de cálcio liberado (µg/mL) e a concentração de HYP (µg/mL), ou seja, quanto maior a concentração de cálcio liberado pela desmineralização da dentina, menor foi a concentração de HYP liberada pela degradação do colágeno exposto pela perda do conteúdo mineral. Isto quer dizer que a maior exposição do colágeno pela desmineralização não está diretamente relacionada com sua maior degradação, uma vez que a liberação de HYP foi menor no grupo em que a desmineralização, ou seja, liberação de Ca foi maior.

Figura 5.10 – Gráfico de correlação negativa de Pearson entre HYP (µg/mL) e Ca (µg/mL)

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA POR ZIMOGRÁFIA *IN SITU*

A atividade das enzimas presentes no substrato dentinário ativadas após a desmineralização do tecido com as três diferentes concentrações de ácido fosfórico utilizadas neste estudo pode ser observada na figura 5.11. Imagens obtidas por microscopia confocal permitem identificar diferenças significativas na intensidade do fluoróforo utilizado para a marcação da atividade das proteases dentinárias após o conjugado gelatina-fluoróforo ter sido hidrolisado.

Quando o substrato foi desmineralizado com ácido fosfórico 1%, é possível detectar atividade enzimática, porém com baixa intensidade. O uso do ácido fosfórico 10% demonstrou um aumento bastante expressivo na intensidade do fluoróforo, o que denota um aumento considerável na atividade das enzimas livres de conteúdo mineral. Em contrapartida, quando o ácido fosfórico 37% foi utilizado é

possível notar uma queda da intensidade do fluoróforo, o que demonstra menor atividade enzimática nesta condição.

O valor da atividade enzimática foi mensurado através da intensidade do fluoróforo medida através da relação do número de pixels por área em μm^2 . O gráfico J da figura 5.11 representa a intensidade do fluoróforo liberado após a hidrólise da gelatina para cada um dos três grupos experimentais testados. A intensidade medida para o grupo em que foi utilizado o AF1% foi de 17,77 pixels/ μm^2 . Para o AF 10% a intensidade medida foi de 131,25 pixels/ μm^2 . Quando o AF37% foi aplicado sobre a dentina a intensidade mensurada foi de 18,09 pixels/ μm^2 .

As imagens A, D e G da figura 5.11 representam o substrato dentinário. Nelas é possível notar a orientação dos túbulos dentinários localizados próximos à câmara pulpar. Nas imagens B, E e H destaca-se a fluorescência obtida após a ocorrência da degradação gelatinolítica provocada pelas enzimas presentes no substrato. É importante ressaltar que neste tipo de avaliação não é possível identificar quais são as proteases presentes, mas sim o resultado de sua atividade. As imagens C, F e I, representam a sobreposição das imagens da dentina com as imagens da fluorescência resultante da degradação da gelatina pelas enzimas da matriz, tornando possível verificar a localização das enzimas no substrato. É possível perceber que as proteases estão distribuídas pelo tecido seguindo a orientação dos túbulos dentinários.

Os valores de intensidade do fluoróforo mensurados para cada condição experimental não foram analisados estatisticamente.

Figura 5.11– Substrato dentinário desmineralizado e incubado com gelatina conjugada com fluoresceína. (A), (D) e (G) Contraste Diferencial de Interferência (DIC) demonstra a densidade óptica da dentina. (B), (E) e (H) imagem da atividade enzimática por fluorescência. (C), (F) e (I) sobreposição das imagens DIC e fluorescentes. (J) Mensuração das emissões de fluorescência para os grupos avaliados.

6 DISCUSSÃO

A formação da interface adesiva em dentina é ainda hoje, como já relatado neste trabalho, o grande desafio da Odontologia Adesiva, justamente pela complexidade deste substrato formado por grande quantidade de matéria orgânica e água (Katchburian; Arana, 2012).

Em decorrência da composição da dentina, a camada híbrida formada a partir da combinação do conteúdo de colágeno com os monômeros resinosos dos sistemas adesivos, tende a sofrer degradação por hidrólise ao longo do tempo. Valores de resistência de união de restaurações em resina composta confeccionadas em dentina diminuem consideravelmente em função do tempo (Hashimoto et al., 2000; De Munck et al., 2003; Carrilho et al., 2004). A perda da efetividade da interface adesiva faz surgir como efeitos adversos a descoloração marginal das restaurações, a sensibilidade pós-operatória e, principalmente, o aparecimento de cárie recidivante em virtude da microinfiltração que ocorre por entre a restauração e o dente (Mjör, 1997; Mjör; Moorhead, 2000).

O colágeno da porção orgânica da camada híbrida sofre degradação por desestruturação de suas fibrilas causada pela ação de enzimas proteolíticas presentes na própria matriz (Hashimoto et al., 2003; Pashley et al., 2004; Hebling et al., 2005; Armstrong et al., 2006; Mazzoni et al., 2006; Nishitani et al., 2006b; Carrilho et al., 2007a,b). Os resultados apresentados neste trabalho confirmam esta constatação, uma vez que foi possível detectar a atividade das enzimas pelo método da zimografia e zimografia *in situ*, além da mensuração da concentração do aminoácido HYP liberado resultado da degradação do colágeno. Foi possível ainda estimar a porcentagem de degradação do colágeno para as condições experimentais estudadas.

Essa degradação só é possível porque a técnica adesiva da forma como é utilizada atualmente dificulta a completa permeação dos monômeros resinosos dos sistemas adesivos por toda a área desmineralizada pelo condicionamento ácido e, portanto, impede que as fibrilas de colágeno permaneçam completamente recobertas pelos monômeros resinosos (Spencer; Swafford, 1999; Spencer; Wang, 2002; Wang; Spencer, 2003).

São essas fibrilas expostas pela perda do conteúdo mineral e não completamente infiltradas pelos monômeros, os alvos das enzimas proteolíticas. A constatação de que essas enzimas poderiam ser as responsáveis pela degradação do colágeno exposto surgiu através de estudos que buscavam identificar os mecanismos pelos quais a doença cárie era capaz de destruir os tecidos dentais (Tjäderhane et al., 1998).

Traçando um paralelo entre as condições do ambiente onde a doença cárie se desenvolve e as condições impostas ao tecido dentinário durante a realização do procedimento adesivo, pode-se concluir que a dentina é exposta a situações muito semelhantes. Em ambas as condições o substrato dentinário é desmineralizado pela presença de ácidos. Na cárie esses ácidos são provenientes da fermentação de açúcares realizada pelas bactérias presentes no biofilme dental (Tjäderhane et al., 1998). No procedimento adesivo, a utilização do ácido fosfórico ou de *primers* ácidos autocondicionantes é feita objetivando a criação da micro-retenção mecânica das resinas compostas. A acidificação do tecido que acontece nas duas situações promove, além da perda de mineral, a liberação das metaloproteínases e outras enzimas que se tornam ativas em pH ácido (Tjäderhane et al., 1998; Van Strijp et al., 2003; Chaussain-Miller et al., 2006). No presente estudo, foi possível avaliar os efeitos da acidificação da dentina pela utilização do ácido fosfórico, substância usualmente utilizada para o condicionamento dos tecidos dentais.

Ainda fazendo a comparação entre as duas situações, isto é, cárie e procedimento adesivo deve-se enfatizar que as MMPs tendem a se manter ativas após a neutralização dos ácidos. Na cárie essa neutralização acontece pela capacidade de tamponamento da saliva, já no procedimento adesivo, ocorre após a lavagem do ácido fosfórico com água em abundância ou pela capacidade tampão da própria dentina, especialmente quando do uso dos sistemas autocondicionantes, cuja lavagem é dispensada (Oliveira et al., 2002). Portanto, enzimas com atividade proteolítica liberadas pela desmineralização seriam ativadas em baixo pH (Davis; Martin, 1990; Davis, 1991; Okada et al., 1995) seguida da neutralização do meio, tornando-se capazes de degradar o colágeno.

Diante do exposto pode-se concluir que o condicionamento ácido da dentina durante a realização do procedimento adesivo vem sendo responsabilizado pela “reativação” de pró-enzimas que haviam sido inativadas pela deposição dos cristais

de hidroxiapatita durante o processo de mineralização dos tecidos dentais (Fukae et al., 1990, 1992; Sulkala et al., 2001; Van Strijp et al., 2003). Logo, pode-se imaginar que a degradação da interface inicia-se desde o momento em que se faz o uso dos agentes condicionadores do tecido dentinário.

A partir da constatação de que enzimas da própria dentina estariam aptas a degradar o colágeno exposto muitos trabalhos foram realizados para avaliar a atividade colagenolítica de proteases da dentina sob diversas condições, além de terem confirmado a identidade dessas enzimas, identificando-as imunologicamente.

A grande maioria dos estudos publicados a esse respeito utilizou baixas concentrações de ácido fosfórico, como 1% ou 10% (Carrilho et al., 2009; Mazzoni et al., 2011a,b Mazzoni et al., 2012). Poucos trabalhos utilizaram o ácido fosfórico 37% (Hashimoto et al., 2003; Pashley et al., 2004), concentração esta, geralmente, utilizada clinicamente e cujo pH é o mais baixo em comparação com as demais soluções utilizadas nos projetos de pesquisa publicados recentemente.

Dessa forma, é de fundamental importância conhecer em detalhes, os efeitos do uso do ácido fosfórico 37% sobre as proteases dentinárias, além de compará-los com as demais concentrações utilizadas na literatura. Este é o primeiro trabalho que busca avaliar os efeitos das diferentes concentrações de ácido fosfórico sobre a atividade enzimática da dentina humana sadia.

Alguns autores descreveram o efeito de ácidos sobre as características da matriz dentinária (Zhang et al., 1998; Agee et al., 2000; El Feninat et al., 2001). Para muitos deles o tempo de exposição da dentina ao ácido com pH em torno de 0.4 a 0.9 durante o procedimento adesivo não causa alterações significativas na matriz (Zhang et al., 1998; El Feninat et al., 2001). Zhang et al. (1998) ao analisar a resistência à tração do colágeno desmineralizado com ácido fosfórico 37% não detectaram alterações significativas na resistência do colágeno, demonstrando que este não havia sofrido degradação.

Mais recentemente, Mazzoni et al. (2006) detectaram uma queda acentuada na atividade enzimática de MMPs após o condicionamento de amostras de dentina com ácido fosfórico 10%. Pashley et al. (2004) também detectaram queda da atividade enzimática da dentina. Para Pashley et al. (2004) houve redução de 65% da atividade de enzimas da matriz dentinária após a desmineralização com ácido fosfórico 37% em comparação com a atividade intrínseca de dentina mineralizada.

Estes achados contradizem a teoria que explica a reativação das pró-enzimas pela acidificação do meio no qual estas proteases estão presentes e, portanto, estariam preservando o colágeno. A diminuição do pH seria a causa da reativação enzimática por mudanças na conformação do polipeptídeo da enzima (Chaussain-Miller et al., 2006).

No presente estudo, a comparação dos efeitos das diferentes concentrações, com diferentes pH, de ácido fosfórico foi possível. Os resultados obtidos neste trabalho confrontam aqueles auferidos pelo estudo de Mazzoni et al. (2006). Diferentemente do que diz Mazzoni et al. (2006), a atividade da MMP-2 apresentou a maior taxa de atividade enzimática quando a dentina foi desmineralizada com ácido fosfórico 10% (pH=1.0), ou 1% (pH= 1.4). Quando o ácido fosfórico 37% (pH=0.4) foi utilizado a atividade enzimática da MMP-2 foi reduzida em 58% em relação aos valores medidos para o ácido fosfórico 10%. Os valores mensurados para atividade enzimática quando utilizado o AF1% e AF37% foram estatisticamente semelhantes. Em contrapartida, revalidamos os achados obtidos por Pashley et al. (2004), pois assim como no trabalho de Pashley et al 2004, o condicionamento do tecido dentinário com ácido fosfórico 37% reduziu sensivelmente a taxa de atividade enzimática neste estudo.

Portanto, a acidificação do ambiente em que estão as formas inativas das metaloproteínases ou de outras enzimas nem sempre favorece sua reativação. O uso do ácido fosfórico 37%, cujo pH está em torno de 0.4, seria ácido o suficiente para desnaturar as enzimas da dentina, inativando-as e impedindo que a degradação do colágeno pudesse ocorrer (Mazzoni et al., 2006). Dessa maneira, o uso clínico do ácido fosfórico 37% poderia proteger a porção orgânica da camada híbrida, afinal houve uma diminuição estatisticamente significativa da atividade enzimática da MMP-2 quando do uso do ácido fosfórico 37% em relação ao AF10%.

As imagens obtidas por microscopia confocal resultantes da realização da zimografia *in situ* ajudam a entender visualmente o que acontece com a atividade de proteases da dentina sob as diferentes condições de desmineralização. Assim como nos resultados obtidos pela zimografia convencional, o condicionamento da dentina com AF10% apresentou a maior taxa de atividade enzimática. Nas imagens é possível detectar que nessa condição há maior fluorescência o que significa que a gelatina aplicada sobre a fatia de dentina foi mais intensamente degradada pelas

enzimas dentinárias ali presentes. A degradação da gelatina libera o fluoróforo que emite a fluorescência verde captada pelo microscópio confocal. O uso do AF1% e AF37% apresentaram menor fluorescência, corroborando todos os resultados obtidos pelos demais testes.

A quantificação dos valores de fluorescência comprova através do gráfico J da figura 5.11 que o condicionamento da dentina com AF37% diminui a ativação das proteases dentinárias em relação ao AF10%. Mazzoni et al. (2012) apresentam imagens de zimografia *in situ* demonstrando a atividade enzimática na camada híbrida formada com o uso de AF 35%. Nesta condição a acidez dos monômeros do sistema adesivo utilizado pode estar contribuindo para a reativação das enzimas. No entanto, nesta situação não é possível determinar se a atividade enzimática observada traz ou não maiores consequências ao colágeno exposto, justamente por não haver comparação com outras soluções desmineralizadoras. Nesse sentido, o estudo comparativo das concentrações de AF nos permite prever qual a gravidade do tratamento desmineralizador sobre a integridade do colágeno e sobre a durabilidade da interface adesiva ao longo do tempo.

El Feninat et al. (2001) ao avaliarem a dentina desmineralizada com ácido fosfórico 37% por microscopia de força atômica não detectaram alterações na estrutura do colágeno, resultado este que corrobora os achados do presente estudo, uma vez que no presente estudo foi possível detectar menor concentração de HYP quando utilizado AF37% o que sugere menor degradação das fibrilas colágenas. El Feninat et al. (2001) afirmam ainda que a desmineralização da dentina com ácido fosfórico 37% por até 60 segundos é capaz de preservar a estrutura do colágeno. Diante dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se imaginar que a possível desnaturação das MMPs e demais enzimas dentinárias ajudaria a explicar os achados de El Feninat et al (2001), já que quanto maior o tempo de desmineralização da dentina com ácido fosfórico 37%, maior seria a desnaturação das proteases ou mais proteases poderiam ser desnaturadas, contribuindo com a preservação do colágeno. Zhang et al. (1998) também notaram a manutenção das propriedades estruturais do colágeno após condicionamento da dentina com ácido fosfórico 37%, mais uma vez confirmando os resultados aqui estabelecidos.

A concentração de cálcio avaliada neste trabalho contesta o conceito de que ácidos com altas concentrações utilizados por tempos menores promoveriam o

mesmo efeito desmineralizante sobre a dentina do que ácidos com baixas concentrações utilizados por tempos prolongados. As soluções com diferentes concentrações foram aplicadas por diferentes tempos, imaginando-se que poderia haver uma padronização da desmineralização. Quanto maior a concentração do ácido e, conseqüentemente, quanto menor o pH, menor foi o tempo utilizado para a desmineralização. Entretanto, embora houvesse uma compensação do tempo em relação à concentração do ácido, o efeito desmineralizante foi diferente para cada solução. Soluções mais concentradas desmineralizaram mais a dentina, liberando maior concentração de cálcio.

Quando o ácido fosfórico foi utilizado na concentração de 37%, maior foi a quantidade de cálcio liberado das moléculas de hidroxiapatita, portanto, maior deve ter sido a quantidade de colágeno exposto pela desmineralização. Conseqüentemente, mais profundamente o substrato dentinário teria sido desmineralizado se o condicionamento ácido tivesse sido realizado clinicamente, dificultando a infiltração dos sistemas adesivos. Nessa condição, embora tenha havido a maior taxa de desmineralização e, portanto, de exposição do colágeno, a matriz orgânica deve ter se mantido preservada. A manutenção da integridade das fibrilas de colágeno pode ser sugerida pela mensuração da concentração de HYP. Embora, mais colágeno tenha sido exposto, ou seja, ficado livre do conteúdo mineral, menor foi a concentração de HYP mensurada o que comprova a menor taxa de degradação do colágeno.

O teste de correlação realizado entre essas duas variáveis, ou seja, concentração de Ca e de HYP liberados pela desmineralização da dentina, confirma a existência de uma relação inversamente proporcional entre elas. Quanto maior a concentração de Ca liberado, menor foi a concentração de HYP detectada. A maior concentração de Ca liberado ocorreu com a utilização do AF37%, exatamente o grupo experimental em que a menor concentração de HYP foi detectada.

Estes resultados se somam àqueles obtidos pela avaliação da atividade enzimática por zimografia ou zimografia *in situ*. Quando o ácido fosfórico 37% foi utilizado para a desmineralização houve diminuição da atividade enzimática de MMP-2 na zimografia e menor atividade inespecífica na zimografia *in situ* o que confirma o fato de ter havido menor liberação de HYP.

Em contrapartida, quando o ácido fosfórico foi utilizado na concentração de 10%, a quantidade de hidroxiprolina liberada foi estatisticamente maior, embora a desmineralização tenha sido menor em relação ao ácido fosfórico 37%. Corroborando este achado, a atividade de MMP-2 apresentou a maior taxa quando o ácido fosfórico 10% foi utilizado. Portanto, é possível concluir que a capacidade de desmineralização do ácido fosfórico não é proporcional à degradação do colágeno exposto.

O gráfico da figura 5.9 que demonstra uma correlação positiva entre atividade de MMP-2 e a concentração de HYP liberada revela um comportamento diretamente proporcional entre essas duas variáveis, ou seja, quanto maior a atividade da MMP-2, maior foi a concentração de HYP liberada. Este achado confirma o comportamento enzimático esperado em relação à degradação do colágeno, isto quer dizer que quando existem condições favoráveis à atividade das enzimas elas podem exercer seu papel fisiológico de forma intensa e, portanto, maior será a degradação de seu substrato, com conseqüente aumento da concentração de HYP liberada. O que podemos concluir a partir daí é que o uso clínico do ácido fosfórico 37% pode não criar as condições mais favoráveis à atividade proteolítica das MMPs e que o uso do AF10% poderia propiciar as melhores condições para que este fenômeno pudesse ser observado.

A mensuração da quantidade de HYP liberada, conseqüência da degradação do colágeno por ação das proteases, vem corroborar com a interpretação de que pode estar havendo desnaturação das proteases desmineralizadas quando utilizado o ácido fosfórico 37%. A desnaturação das enzimas da dentina impediria a degradação do colágeno exposto, diminuindo a concentração de HYP liberada. Por outro lado, o uso do ácido fosfórico 10% por permitir o aumento da atividade da MMP-2, aumentou a degradação do colágeno exposto, mesmo sem ter conseguido alcançar a maior taxa de desmineralização. Logo, mesmo não tendo a maior quantidade de colágeno exposto, a ação enzimática da MMP-2 e de demais enzimas mostrou-se mais eficiente quando o AF10% foi utilizado. Diante desta constatação pode-se imaginar que os adesivos autocondicionantes, cuja concentração está mais próxima do AF10%, poderiam desencadear a ativação de proteases da dentina de forma mais efetiva do que quando utilizados os sistemas adesivos convencionais que utilizam o ácido fosfórico 37% como primeiro passo da técnica adesiva. Para

que seja possível constatar esta possível grande desvantagem destes sistemas novos estudos devem ser realizados.

Com os resultados obtidos pela análise espectrofotométrica de cálcio e de hidroxiprolina foi possível estimar o percentual de degradação do colágeno em cada uma das três condições experimentais estudadas. Essa estimativa foi realizada com base nos valores, em porcentagem, estabelecidos pela ciência para a quantificação dos constituintes do tecido dentinário. Esse cálculo confirma as hipóteses levantadas por este estudo. Foi possível calcular a porcentagem de desmineralização das amostras de dentina tendo como base a mensuração do cálcio liberado pelos grupos experimentais e levando em consideração a quantidade de cálcio que teria sido liberado caso cem por cento da dentina tivesse sido desmineralizada. O ácido fosfórico 37% apresentou a maior taxa de desmineralização em porcentagem.

A quantidade, em µg, de colágeno liberado pela desmineralização também pode ser estimada, e mais uma vez os cálculos confirmam os resultados obtidos. Por ter a maior porcentagem de desmineralização, o grupo em que foi utilizado o ácido fosfórico 37% apresentou a maior quantidade de colágeno exposto (Tabela 5.7), em contrapartida, o grupo em que foi utilizado o ácido fosfórico 1%, por ter a menor taxa de desmineralização apresentou a menor quantidade de colágeno exposto (Tabela 5.7). A radiografia do pó de dentina apresentada no apêndice A pode ser observada para a comprovação da capacidade de desmineralização apresentada pelas três diferentes soluções desmineralizantes. É possível ainda comparar radiograficamente os grupos experimentais com a dentina mineralizada.

Levando em consideração a quantidade de HYP liberada pelos grupos em função do peso inicial de dentina (40 mg) utilizado para a análise do conteúdo de hidroxiprolina e a porcentagem de desmineralização calculada, foi possível confirmar que o grupo em que houve a menor taxa de atividade de MMP-2, ou seja, AF 37%, apresentou a menor porcentagem de degradação do colágeno exposto (0,68%), mesmo tendo a maior quantidade de colágeno exposto. Em contrapartida, o grupo em que a taxa de atividade da MMP-2 foi maior, ou seja, o AF 10% houve a maior porcentagem de degradação do colágeno exposto (20,13%) (Tabela 5.7).

Entre as metaloproteinases já identificadas na dentina humana, destacam-se as MMP-2 e MMP-9 que possuem atividade gelatinolítica (Chaussain-Miller et al., 2006). A análise dos zimogramas realizados neste estudo, demonstrou a atividade

de uma enzima localizada na altura dos 72 KDa em todos os substratos avaliados. A identidade imunológica desta enzima (MMP-2) foi confirmada através de *immunoblotting* com anticorpo específico anti-MMP-2. Embora tenha sido detectada por zimografia e imunohistoquímica em dentina (Mazzoni et al., 2007, 2009), a atividade da MMP-9, não foi detectada nos zimogramas aqui analisados, assim como no trabalho realizado por De Munck et al. (2009). O *immunoblotting* com anticorpo anti-MMP-9 também não confirmou a presença desta enzima nas radiografias reveladas pelo presente estudo. De Munck et al. (2009) acreditam que o procedimento adesivo nem sempre libera ou ativa todas as MMPs. De fato, o condicionamento ácido pode causar a desnaturação de enzimas antes que estas possam exercer sua atividade. Isto pode estar acontecendo com a MMP-9, independentemente da concentração ou pH do ácido fosfórico utilizado. A mistura do pó de dentina com a substância ácida é capaz de liberar enzimas, no entanto, o contato direto do ácido com a enzima pode destruí-la, ou melhor, desnaturá-la (De Munck et al., 2009). A MMP-9 pode ser mais suscetível a essa destruição em relação à MMP-2 e desta forma, desnatura em qualquer uma das concentrações de ácido fosfórico, bastando apenas estar em contato com a acidez do meio.

Diante dos resultados apresentados neste trabalho pode-se concluir que o uso do condicionamento ácido da forma como ele é feito atualmente na prática clínica (condicionamento com ácido fosfórico 37%) pode minimizar os efeitos degradantes do baixo pH sobre o colágeno dentinário. Em contrapartida, estudos realizados com pó de dentina que utilizam concentrações menores de ácido fosfórico (1% ou 10%) podem estar sobreestimando a atividade das MMPs sobre as fibrilas de colágeno em relação ao que de fato acontece durante o procedimento clínico.

De qualquer forma, mesmo tendo sido detectada menor atividade da MMP-2 quando utilizado o ácido fosfórico 37% e, conseqüentemente, menor degradação do colágeno exposto é importante que se faça o uso de inibidores inespecíficos da atividade enzimática, como a clorexidina, durante o procedimento adesivo. Estudos demonstram que mesmo em baixas concentrações, a clorexidina tem se mostrado eficiente na manutenção dos valores de resistência adesiva ao longo do tempo (Loguercio et al., 2009; Stanislawczuk et al., 2011). Sabe-se que os monômeros dos sistemas adesivos por sua característica ácida podem reativar outras MMPs (Mazzoni et al., 2006) ou catepsinas que por ventura não tenham sido ativadas

durante o condicionamento ácido. Essas outras enzimas expostas pela desmineralização provocada pelo condicionamento ácido, mas ativadas pelos sistemas adesivos podem degradar o colágeno mantido intacto pela desnaturação das proteases após aplicação do ácido fosfórico 37%. Esta concentração do ácido fosfórico demonstrou ser capaz de desmineralizar a dentina em maior porcentagem e de expor maior quantidade de colágeno que pode então, se tornar suscetível à degradação enzimática iniciada pelos monômeros resinosos dos sistemas adesivos.

Vale ainda ressaltar que outros estudos devem ser desenvolvidos para que as condições de ativação das enzimas endógenas da dentina pelos sistemas adesivos possam ser melhor compreendidas. Esta constatação se faz pertinente, justamente pelo fato de que estudos que mapeiem a ativação de enzimas em cada etapa do procedimento adesivo da forma como ele é realizado clinicamente ainda não foram realizados, assim como as diferentes concentrações de ácido fosfórico também ainda não tinham sido testadas.

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos por esta investigação podemos afirmar que as hipóteses nulas inicialmente propostas foram rejeitadas.

- 1) As diferentes concentrações das soluções de ácido fosfórico induzem diferentes respostas na atividade gelatinolítica da MMP-2. Amostras de dentina tratadas AF10% apresentaram maior taxa de atividade enzimática em relação àquela obtida pelo tratamento da dentina com AF37%, cuja atividade foi sensivelmente reduzida. O uso do AF1% apresentou valores de atividade enzimática estatisticamente semelhantes aos demais grupos. A atividade enzimática da MMP-9 não foi detectada.
- 2) Foi possível identificar imunologicamente através da utilização de anticorpo específico (anti-MMP-2 e anti-MMP-9) a metaloproteinase-2 extraída pelo protocolo de desmineralização com ácido fosfórico. MMP-2 com 72KDa foi identificada nos controles e nas amostras de extratos de dentina. MMP-9 com 95KDa foi identificada apenas nos controles (enzimas recombinantes).
- 3) A solubilização do colágeno exposto pela desmineralização do tecido dentinário é dependente da concentração da solução de ácido fosfórico empregada. Quando a dentina foi desmineralizada com AF10% houve a maior degradação do colágeno exposto (20,13%). Com a utilização de AF1% a porcentagem de degradação do colágeno exposto foi intermediária (11,34%). E quando foi utilizado AF37%, houve uma redução significativa (0,68%) da taxa de degradação do colágeno exposto pela desmineralização da dentina.

A análise dos resultados e a rejeição das hipóteses nulas sugeridas inicialmente nos permite ainda concluir, que a aplicação clínica do AF37% pode estar protegendo a interface adesiva ao invés de induzir sua degradação como se

imaginava até então. A acidificação do meio pode realmente reativar metaloproteinases da matriz dentinária, mas ao mesmo tempo, pode inativá-las por desnaturação.

O emprego de soluções de ácido fosfórico com concentrações menores do que aquelas utilizadas clinicamente, ou seja, AF1% ou AF10%, utilizadas em estudos publicados na literatura podem estar sobreestimando a influência do condicionamento ácido realizado clinicamente ou até mesmo sobreestimando a influência dos sistemas adesivos na ativação de proteases da dentina, uma vez que a atividade enzimática da dentina mensurada após a aplicação dos sistemas adesivos pode ter sido iniciada com a utilização de concentrações mais baixas de ácido fosfórico (AF1% ou AF10%) que causam maior atividade proteolítica em relação à concentração do AF utilizado clinicamente.

REFERÊNCIAS¹

- Agee K, Zhang Y, Pashley DH. Effects of acids and additives on the susceptibility of human dentine to denaturation. *J Oral Rehabil*. 2000;27(2):136-41.
- Armstrong SR, Jessop JL, Vargas MA, Zou Y, Qian F, Campbell JA, Pashley DH. Effects of exogenous collagenase and cholesterol esterase on the durability of the resin-dentin bond. *J Adhes Dent*. 2006;8:151-60.
- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4(2):197-250.
- Bornstein P, Sage H. Structurally distinct collagen types. *Annu Rev Biochem*. 1980;49: 957-1003.
- Botta SB, Ana PA, Santos MO, Zezell DM, Matos AB. Effect of dental tissue conditioners and matrix metalloproteinase inhibitors on type I collagen microstructure analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012;100(4):1009-16.
- Bowen RL, Eick JD, Henderson DA, Anderson DW. Smear layer: removal and bonding considerations. *Oper Dent Suppl*. 1984;3:30-4.
- Brackett WW, Ito S, Tay FR, Haisch LD, Pashley DH. Microtensile dentin bond strength of self-etching resins: effect of a hydrophobic layer. *Oper Dent*. 2005;30(6):733-8.
- Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater*. 2008;24(1):90-101.
- Breschi L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vita F, Carrilho M, Cadenaro M, Foulger S, Mazzoti G, Tay FR, Di Lenarda R, Pashley D. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. *J Adhes Dent*. 2009;11(3):191-8.
- Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res*. 1955;34(6):849-53.
- Burrow MF, Satoh M, Tagami J. Dentin bond durability after three years using a dentin bonding agent with and without priming. *Dent Mater*. 1996;12(5):302-7.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver.

Butler WT, Richardson WS. Bioquímica das proteínas do dente. In: Menaker L, Morhart RE, Navia JM. Cáries dentárias – bases biológicas 1ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1984.Cap. 6, p.150-69.

Cadenaro M, Antonioli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Prati C, et al. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2005;113(6):525-30.

Carrilho MRO, Carvalho RM, Pashley DH. Durabilidade da resistência adesiva à dentina: efeito da armazenagem. *Pesq Odont Bras Suplemento.* 2001;15:95.

Carrilho MR, Reis A, Loguercio AD, Rodrigues Filho LE. Bond strength of four adhesive systems to dentin. *Pesq Odontol Bras.* 2002;16(3):251-6.

Carrilho MRO, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Effects of storage media on mechanical properties of adhesive systems. *Am J Dent.* 2004;17:104-8.

Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Yiu C, Pashley DH. Durability of resin-dentin bonds related to water and oil storage. *Am J Dent.* 2005a;18(6):315-9.

Carrilho MR, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L, Carvalho RM. Mechanical stability of resin-dentin bond components. *Dent Mater.* 2005b;21(3):232-41.

Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res.* 2007a;86: 90-4.

Carrilho MRO, Geraldeli S, Tay FR, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, Pashley DH. In vivo preservation of hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res.* 2007b;86:529-33.

Carrilho MR, Tay FR, Sword J, Donnelly AM, Agee KA, Nishitani Y, et al. Dentine sealing provided by smear layer/smear plugs vs. adhesive resins/resin tags. *Eur J Oral Sci.* 2007c;115(4):321-9.

Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjäderhane L, Mazzoni A, Breschi L, Foulger S, Pashley DH. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;90(1):373-80.

Carvalho RM, Yoshiyama M, Pashley EL, Pashley DH. In vitro study on the dimensional changes of human dentine after demineralization. *Arch Oral Biol.* 1996;41(4):369-77.

Carvalho RM, Ciucchi B, Sano H, Yoshiyama M, Pashley DH. Resin diffusion through demineralized dentin matrix. *Rev Odontol USP.* 1999;13(4):417-24.

Carvalho RM, Tay F, Sano H, Yoshiyama M, Pashley DH. Long-term mechanical properties of EDTA-demineralized dentin matrix. *J Adhes Dent.* 2000;2:193-199.

Carvalho RM, Chersoni S, Frankenberger R, Pashley DH, Prati C, Tay FR. A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. *Biomaterials.* 2005;26(9):1035-42.

Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res*. 2006;85:22-32.

Chersoni S, Suppa P, Grandini S, Goracci C, Monticelli F, Yiu C, et al. In vivo and in vitro permeability of one-step self-etch adhesives. *J Dent Res*. 2004;83(6):459-64.

Davis GE, Martin BM. A latent Mr 94,000 gelatin-degrading metalloprotease induced during differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells: a member of the collagenase family of enzymes. *Cancer Res*. 1990;50(4):1113-20.

Davis GE. Identification of an abundant latent 94-kDa gelatin-degrading metalloprotease in human saliva which is activated by acid exposure: implications for a role in digestion of collagenous proteins. *Arch Biochem Biophys*. 1991;1;286(2):551-4.

De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, Lambrechts P, Vanherle G. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res*. 2003;82:136-140.

De Munck J, Van den Steen PE, Mine A, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, Van Meerbeek B. Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces. *J Dent Res*. 2009;88(12):1101-6.

De Vito-Moraes AG, Francci C, Carvalho CN, Soares SP, Braga RR. Microshear bond strength of self-etching systems associated with a hydrophobic resin layer. *J Adhes Dent*. 2011;13(4):341-8.

DeVito-Moraes AG. Avaliação da resistência de união e caracterização da camada híbrida formada por adesivos experimentais a base de metacrilato hidrófobo ou solvatado em 10% e 30% de etanol, aplicados sobre dentina saturada com etanol em um estudo de longevidade [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2009.

Donmez N, Belli S, Pashley DH, Tay FR. Ultrastructural correlates of in vivo/in vitro bond degradation in self-etch adhesives. *J Dent Res*. 2005;84: 355-359.

Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(3):161-74.

Eick JD, Cobb CM, Chappell RP, Spencer P, Robinson SJ. The dentinal surface: its influence on dentinal adhesion. Part I. *Quintessence Int*. 1991;22(12):967-77.

El Feninat F, Ellis TH, Sacher E, Stangel I. A tapping mode AFM study of collapse and denaturation in dentinal collagen. *Dent Mater*. 2001;17(4):284-8.

Eliades G, Palaghias G, Vougiouklakis G. Effect of acidic conditioners on dentin morphology, molecular composition and collagen conformation in situ. *Dent Mater*. 1997;13(1):24-33.

Eliades G, Vougiouklakis G, Palaghias G. Effect of dentin primers on the morphology, molecular composition and collagen conformation of acid-demineralized dentin in situ. *Dent Mater.* 1999;15:310-317.

Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater.* 2006;22(3):211-22.

Fritz UB, Finger WJ. Bonding efficiency of single-bottle enamel/dentin adhesives. *Am J Dent.* 1999;12(6):277-82.

Fukae M, Tanabe T, Yamada M. Mineralized phase matrix proteases of newborn rat calvaria. *J Bone Min Metab.* 1990;8:136-142.

Fukae M, Tanabe T, Yamada M. An active neutral metalloproteinase bound to the insoluble collagen in the mineralized phase matrix of adult rat calvaria. *Calcif Tissue Int.* 1992;51:151-155.

Fusayama T, Nakamura M, Kurosaki N, Iwaku M. Non-pressure adhesion of a new adhesive restorative resin. *J Dent Res.* 1979;58(4):1364-70.

Gendron R, Greiner D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2,8 and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999;6: 437-39.

Goracci C, Sadek FT, Monticelli F, Cardoso PE, Ferrari M. Microtensile bond strength of self-etching adhesives to enamel and dentin. *J Adhes Dent.* 2004;6:313-18.

Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1962;15;48:1014-22.

Gwinnett AJ. Smear layer: morphological considerations. *Oper Dent Suppl.* 1984;3:2-12.

Gwinnett AJ. Moist versus dry dentin: its effect on shear bond strength. *Am J Dent.* 1992;5(3):127-9.

Gwinnett AJ, Yu S. Effect of long-term water storage on dentin bonding. *Am J Dent.* 1995;8(2):109-11.

Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res.* 2000;79(6):1385-91.

Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Sano H, Tay FR, Oguchi H, Araki Y, Kubota M. Over-etching effects on micro-tensile bond strength and failure patterns for two dentin bonding systems. *J Dent.* 2002;30(2-3):99-105.

Hashimoto M, Tay FR, Ohno H, Sano H, Kaga M, Yiu C, Kumagai H, Kudou Y, Kubota M, Oguchi H.. SEM and TEM analysis of water degradation of human dentinal collagen. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2003;66B:287-298.

Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res*. 2005;84:741-746.

Inoue S, Vargas MA, Abe Y, Yoshida Y, Lambrechts P, Vanherle G, Sano H, Van Meerbeek B. Microtensile bond strength of eleven contemporary adhesives to dentin. *J Adhes Dent*. 2001;3(3):237-45.

Ishiguro K, Yamashita K, Nakagaki H, Iwata K, Hayakawa T. Identification of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in human teeth and its distribution in cementum and dentin. *Arch Oral Biol*. 1994;39: 345–9.

Ito S, Hashimoto M, Wadgaonkar B, Svizero N, Carvalho RM, Yiu C, et al. Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomaterials*. 2005;26(33):6449-59.

Kanca J. Effect of resin primer solvents and surface wetness on resin composite bond strength to dentin. *Am J Dent*. 1992a;5(4):213-5.

Kanca J. Resin bonding to wet substrate. 1. Bonding to dentin. *Quintessence Int*. 1992b;23(1):39-41.

Kanca J. Etchant composition and bond strength to dentin. *Am J Dent*. 1993;6(6):287-90.

Katchburian E, Arana V. *Histologia e Embriologia Oral*. 3° ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2012.

Kato G, Nakabayashi N. The durability of adhesion to phosphoric acid etched, wet dentin substrates. *Dent Mater*. 1998;14(5):347-52.

Kato MT, Hannas AR, Leite AL, Bolanho A, Zarella BL, Santos J, Carrilho M, Tjäderhane L, Buzalaf MA. Activity of matrix metalloproteinases in bovine versus human dentine. *Caries Res*. 2011;45(5):429-34.

Koshiro K, Inoue S, Sano H, et al. In vivo degradation of resin-dentin bonds produced by a self-etch and an etch-and-rinse adhesive. *Eur J Oral Sci* 2005;113: 341-348.

Landis WJ. Mineral characterization in calcifying tissues: atomic, molecular and macromolecular perspectives. *Connect Tissue Res*. 1996;34(4):239-46.

Linde A, Robins SP. Quantitative assessment of collagen crosslinks in dissected predentin and dentin. *Coll Relat Res*. 1988;8:443-450.

Loguercio AD, Stanislawczuk R, Polli LG, Costa JA, Michel MD, Reis A. Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin bond strength durability. *Eur J Oral Sci*. 2009;117(5):587-96.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.

- Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, et al. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mater.* 2006;22(10):973-80.
- Marshall Jr GW, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent.* 1997;25(6):441-58.
- Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentin. *Arch Oral Biol.* 2000;45:757-765.
- 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;27:4470-6.
- Mazzoni A, Manello F, Tay FR, Tonti GAM, Papa S, Mazzotti G, DiLenarda R, Pashley DH, Breschi L. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res.* 2007;86:436-440.
- Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri A Jr, Carrilho M, Tjäderhane L, Di Lenarda R, Breschi L Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis. *J Biomed Mater Res A.* 2009;1;88(3):697-703.
- Mazzoni A, Papa V, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L, Ruggeri A Jr, Gobbi P, Mazzotti G, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. Immunohistochemical and biochemical assay of MMP-3 in human dentine. *J Dent.* 2011a;39(3):231-7.
- Mazzoni A, Carrilho M, Papa V, Tjäderhane L, Gobbi P, Nucci C, Di Lenarda R, Mazzotti G, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. MMP-2 assay within the hybrid layer created by a two-step etch-and-rinse adhesive: biochemical and Immunohistochemical analysis. *J Dent.* 2011b;39(7):470-7.
- Mazzoni A, Nascimento FD, Carrilho M, Tersariol I, Papa V, Tjäderhane L, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. MMP activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. *J Dent Res.* 2012;91(5):467-72.
- Miguez PA, Pereira PN, Atsawasuan P, Yamauchi M. Collagen cross-linking and ultimate tensile strength in dentin. *J Dent Res.* 2004;83:807-810.
- Mjör IA. Histology of the human tooth. In: Mjör IA & Pindborg JJ. *Dentin and Pulp* Copenhagen: Scandinavian University Books. Ed. Munksgaard 1973;Cap2,p45-76.
- Mjör I. The reasons for replacement and the age of failed restorations in general dental practice. *Acta Odont Scan.* 1997;55:57-63.
- Mjör I, Moorhead J. Reasons for replacement of restorations in permanent teeth in general dental practice. *Int Dent J.* 2000;50:361-66.

Moon PC, Weaver J, Brooks CN. Review of matrix metalloproteinases' effect on the hybrid dentin bond layer stability and chlorhexidine clinical use to prevent bond failure. *Open Dent J*. 2010; 20(4):147-52.

Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res*. 1982;16(3):265-73.

Nishitani Y, Yoshiyama M, Donnelly AM, Agee KA, Sword J, Tay FR, Pashley DH. Effects of resin hydrophilicity on dentin bond strength. *J Dent Res*. 2006a;85(11):1016-21.

Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, Carvalho RM, Tjäderhane L, Tay FR, Pashley DH. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci*. 2006b;114:160-66.

Okada Y, Naka K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi I, Fujimoto N, Sato H, Seiki M. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. *Lab Invest*. 1995;72(3):311-22.

Okamoto Y, Heeley JD, Dogon IL, Shintani H. Effects of phosphoric acid and tannic acid on dentine collagen. *J Oral Rehabil*. 1991;18:507-512.

Okuda M, Pereira PN, Nakajima M, Tagami J. Relationship between nanoleakage and long-term durability of dentin bonds. *Oper Dent*. 2001;26(5):482-90.

Oliveira SS, Marshall SJ, Hilton JF, Marshall GW. Etching kinetics of a self-etching primer. *Biomaterials*. 2002;23:4105-12.

Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(3):221-33.

Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of MMPs immature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci*. 2003;111(2):117-27.

Pashley DH. Smear layer: physiological considerations. *Oper Dent*. 1984;3 Suppl:13-29.

Pashley DH, Ciucchi B, Sano H, Horner JA. Permeability of dentin to adhesive agents. *Quintessence Int*. 1993;24(9):618-31.

Pashley DH, Agee KA, Nakajima M, Tay FR, Carvalho RM, Terada RS, Harmon FJ, Lee WK, Rueggeberg FA. Solvent-induced dimensional changes in EDTA-demineralized dentin matrix. *J Biomed Mater Res*. 2001;56(2):273-81.

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.

Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, Donnelly A, García-Godoy F. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *Am J Dent*. 2007;20(1):7-20.

Paul SJ, Leach M, Rueggeberg FA, Pashley DH. Effect of water content on the physical properties of model dentine primer and bonding resins. *J Dent*. 1999a;27(3):209-14.

Paul SJ, Welter DA, Ghazi M, Pashley DH. Nanoleakage at the dentin adhesive interface vs microtensile bond strength. *Oper Dent*. 1999b;24(3):181-8.

Perdigão J. An ultra-morphological study of human dentine exposed to adhesive systems. Thesis (Doctor in Medical Sciences). Leuven: Katholieke Universiteit te Leuven; 1995.

Perdigão J, Lopes M. Dentin bonding--questions for the new millennium. *J Adhes Dent*. 1999;1(3):191-209.

Rivera EM, Yamauchi M. Site comparisons of dentine collagen cross-links from extracted human teeth. *Arch Oral Biol*. 1993;38: 541-46.

Rosales-Leal JI, Osorio R, Holgado-Terriza JA, Cabrerizo-Vilchez MA, Toledano M. Dentin wetting by four adhesive systems. *Dent Mater*. 2001;17(6):526-32.

Sadek FT, Pashley DH, Nishitani Y, Carrilho MR, Donnelly A, Ferrari M, Tay FR. Application of hydrophobic resin adhesives to acid-etched dentin with an alternative wet bonding technique. *J Biomed Mater Res A*. 2008;84(1):19-29.

Sano H, Shono T, Takatsu T, Hosoda H. Microporous dentin zone beneath resin-impregnated layer. *Oper Dent*. 1994;19(2):59-64.

Sano H, Takatsu T, Ciucchi B, Horner JA, Matthews WG, Pashley DH. Nanoleakage: leakage within the hybrid layer. *Oper Dent*. 1995;20(1):18-25.

Sano H, Yoshikawa T, Pereira PN, Kanemura N, Morigami M, Tagami J, Pashley DH. Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, in vivo. *J Dent Res* 1999;78(4):906-11.

Santos J, Carrilho M, Tervahartiala T, Sorsa T, Breschi L, Mazzoni A, Pashley D, Tay F, Ferraz C, Tjäderhane L. Determination of matrix metalloproteinases in human radicular dentin. *J Endod*. 2009;35(5):686-9.

Scaffa PM, Vidal CM, Barros N, Gesteira TF, Carmona AK, Breschi L, Pashley DH, Tjäderhane L, Tersariol IL, Nascimento FD, Carrilho MR. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. *J Dent Res*. 2012;91(4):420-5.

- Sideridou I, Tserki V, Papanastasiou G. Study of water sorption, solubility and modulus of elasticity of light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials*. 2003;24(4):655-65.
- Sorsa T, Tjäderhane L, Konttinen YT. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med*. 2006;38(5):306-21.
- Stanislawczuk R, Reis A, Loguercio AD. A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin-dentin interfaces. *J Dent*. 2011;39(1):40-7.
- Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, Tjäderhane L. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *J Dent Res*. 2001;80:1545-49.
- Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res*. 2002;81(9):603-7.
- Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinases-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol*. 2007;52:121-27.
- Spencer P, Swafford JR. Unprotected protein at the dentin-adhesive interface. *Quintessence Int*. 1999;30(7):501-7.
- Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res*. 2002;62(3):447-56.
- Swift Jr EJ, Perdigão J, Heymann HO. Bonding to enamel and dentin: a brief history and state of the art. *Quintessence Int*. 1995;26(2):95-110.
- Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res*. 1998;77:1622-29.
- Taskiran D, Taskiran E, Yerkar H, et al. Quantification of total collagen tendon by the Sirius red method. *J Med Sci*. 1999;29:7-9.
- Tay FR, Gwinnett AJ, Wei SH. The overwet phenomenon: an optical, micromorphological study of surface moisture in the acid-conditioned, resin-dentin interface. *Am J Dent*. 1996a;9(1):43-8.
- Tay FR, Gwinnett AJ, Wei SH. The overwet phenomenon: a transmission electron microscopic study of surface moisture in the acid-conditioned, resin-dentin interface. *Am J Dent*. 1996b;9(4):161-6.

Tay FR, Gwinnett AJ, Wei SH. The overwet phenomenon: a scanning electron microscopic study of surface moisture in the acid-conditioned, resin-dentin interface. *Am J Dent*. 1996c;9(3):109-14.

Tay FR, Gwinnett JA, Wei SH. Micromorphological spectrum from overdrying to overwetting acid-conditioned dentin in water-free acetone-based, single-bottle primer/adhesives. *Dent Mater*. 1996d;12(4):236-44.

Tay FR, Gwinnett JA, Wei SH. Relation between water content in acetone/alcohol-based primer and interfacial ultrastructure. *J Dent*. 1998;26(2):147-56.

Tay FR, Pashley DH. Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater*. 2001;17(4):296-308.

Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Itthagarun A. Single-step adhesives are permeable membranes. *J Dent*. 2002a;30(7-8):371-82.

Tay FR, Pashley DH, Yoshiyama M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. *J Dent Res*. 2002b;81(7):472-6.

Tay FR, Carvalho RM, Pashley DH. Water movement across bonded dentin-too much of a good thing. *J Appl Oral Sci*. 2004;12:12-25.

Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Pääkkönen V, Martins MT, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, Salo T, Tjäderhane L. Cysteine Cathepsins in Human Dentin-Pulp Complex. *J Endod*. 2010;36(3):475-81.

Van Landuyt KL, Peumans M, De Munck J, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Extension of a one-step self-etch adhesive into a multi-step adhesive. *Dent Mater*. 2006;22(6):533-44.

Van Landuyt KL, 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(26):3757-85.

Van Meerbeek B, Inokoshi S, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Morphological aspects of the resin-dentin interdiffusion zone with different dentin adhesive systems. *J Dent Res*. 1992;71(8):1530-40.

Van Meerbeek B, Dhem A, Goret-Nicaise M, Braem M, Lambrechts P, VanHerle G. Comparative SEM and TEM examination of the ultrastructure of the resin-dentin interdiffusion zone. *J Dent Res*. 1993;72(2):495-501.

Van Meerbeek B, Vargas M, Inoue M, Yoshida Y, Peumans M, Lambrechts P, et al. Adhesives and cements to promote preservation dentistry. *Oper Dent*. 2001;6Suppl:119-44.

- Van Meerbeek B, Van Landuyt K, De Munck J, Hashimoto M, Peumans M, Lambrechts P, et al. Technique-sensitivity of contemporary adhesives. *Dent Mater J*. 2005;24(1):1-13.
- Van Meerbeek B, Van Landuyt K, De Munck J, Hashimoto M, Peumans M, Lambrechts P, Yoshida Y, Inoue S, Suzuki K. Technique-sensitivity of contemporary adhesives. *Dent Mater J*. 2005;24(1):1-13.
- van Strijp AJ, van Steenberghe TJ, ten Cate JM. Bacterial colonization of mineralized and completely demineralized dentine in situ. *Caries Res*. 1997;31(5):349-55.
- van Strijp AJ, Jansen DC, DeGroot J, ten Cate JM, Everts V. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. *Caries Res*. 2003;37:58-65.
- Veis A, Schlueter RJ. The macromolecular organization of dentine matrix collagen. I. Characterization of dentine collagen. *Biochemistry*. 1964;3:1650-57.
- Watanabe I, Nakabayashi N, Pashley DH. Bonding to ground dentin by a phenyl-P self-etching primer. *J Dent Res*. 1994;73(6):1212-20.
- Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res*. 2003;82(2):141-5.
- White A. *Principles of Biochemistry*. 4th. Ed. New York: McGraw Hill Book Company; 1968
- Wohlleb M, Carmichael DJ. Biochemical characterization of guanidinium chloride-soluble dentine collagen from lathyritic-rat incisors. *Biochem. J* 1979;1;181(3):667-76.
- Yang DM, Li YJ, Su Y, Sun YL. Effect of host derived matrix metalloproteinase on the degradation of root dentin collagen. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2006, 41(5):275-8.
- Yiu CK, King NM, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Carrilho MR, Tay FR. Effect of resin hydrophilicity and water storage on resin strength. *Biomaterials*. 2004;25(26):5789-96.
- Yiu CK, Pashley EL, Hiraishi N, King NM, Goracci C, Ferrari M, Carvalho RM, Pashley DH, Tay FR. Solvent and water retention in dental adhesive blends after evaporation. *Biomaterials*. 2005;26(34):6863-72.
- Zhang Y, Agee K, Nör J, Carvalho R, Sachar B, Russell C, Pashley D. Effects of acid-etching on the tensile properties of demineralized dentin matrix. *Dent Mater*. 1998;14:222-8.

APÊNDICE A – Avaliação radiográfica do grau de desmineralização do pó de dentina após aplicação das soluções de ácido fosfórico

M: Dentina Mineralizada, AF1%: dentina desmineralizada com ácido fosfórico 1%, AF10%: dentina desmineralizada com ácido fosfórico 10%, AF37%: dentina desmineralizada com ácido fosfórico 37%.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 16/11
CAAE 0014.0.017.000-11

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**Estudo da influência das soluções desmineralizadoras na atividade colagenolítica da dentina humana desmineralizada**", de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) André Guaraci De Vito de Moraes sob orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) Carlos Eduardo Francci.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 19 de abril de 2011.

Profa. Dra. Marcia Turolia Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP