UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MARINA CICCONE GIACOMINI

**Efeito de inibidores proteolíticos na adesão de dentina
desmineralizada por cárie ou erosão**

BAURU
2015

MARINA CICCONE GIACOMINI

**Efeito de inibidores proteolíticos na adesão de dentina
desmineralizada por cárie ou erosão**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Dentística.

Orientador: Prof^a. Dr^a Linda Wang

Versão Corrigida

BAURU
2015

Giacomini, Marina Ciccone

G346e Efeito de inibidores proteolíticos na adesão de
dentina desmineralizada artificialmente por cárie ou
erosão/ Marina Ciccone Giacomini. – Bauru, 2014.

90 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia
de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof^a. Dr^a. Linda Wang

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Comitê de Ética da FOB-USP

CAAE: 16558913.2.0000.5417

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família e ao meu namorado, fonte de apoio constante.

À Deus, por estar presente e sempre guiar meus passos e decisões ao decorrer da vida.

Aos meus pais, Graziela e José Eduardo, pelo constante incentivo e apoio em todas as decisões que tomei sempre levando os valores de casa para me tornar uma profissional de sucesso. Esta conquista é nossa.

Ao meu namorado Felipe, por estar ao meu lado, me ajudando, me incentivando, nos momentos bons e momentos não tão bons assim. Esta conquista é sua também.

À minha família, a minha tia Tania, ao meu avô Adalto (in memoriam), a minha avó Neusa, ao meu avô Gerson e a minha avó Vera (in memoriam) por serem os anjos da guarda, tornando essa caminhada mais agradável possível.

À Prof^a. Dr^a. Linda Wang, que me acolheu e me lapidou desde a graduação com sua ética ímpar e generosidade. Acompanhou e auxiliou no meu crescimento pessoal e profissional, se tornando uma pessoa especial e inesquecível, a qual levarei para o resto da vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por me permitir, com saúde e fé, vivenciar e aprender diante de todas essas experiências que me foram proporcionadas.

Aos meus pais, Graziela e José Eduardo, por desde sempre me incentivar e me amparar durante os tropeços da vida, por acreditarem no meu potencial e criar um alicerce no qual sei que posso contar. E ao meu animal de estimação, Nuno (in memoriam) por ter sido um amigo e companheiro por 18 anos.

Ao meu namorado, Felipe, meu melhor amigo e namorado, obrigada pela compreensão, pelo apoio e por ser acima de tudo meu amigo e companheiro de vida.

Áminha avó Neusa, por ser uma segunda mãe e fazer meus dias mais felizes e doces.

Áminha tia Tania, pelos conselhos dados em momentos oportunos.

Às minhas tias Maria Nair e Renneé pelo incentivo, pelas risadas e pela ajuda.

Áminha família e amigos por toda a paciência e compreensão. Minha amiga, Izabella Rosso, desde a graduação acompanhando a minha jornada e mesmo com a distância ouvir (ou ler) meus desabafos e me fazer rir das situações mais inesperadas possíveis.

Às amigas unidas pela biocompatibilidade, Camila Machado, Martha, Adriana Cruz e Analuísa pela amizade, pelo companheiro e por tudo o que passamos nesse período. O quarteto com duas mascotes, Lola e Kika, virou um quinteto com um presente lindo que Deus mandou para nos alegrar e mais um motivo para nos unir. Muito obrigada por fazerem parte da minha vida e que continuemos essas amizades tão bonita que construímos ao decorrer do tempo.

Aos colegas da turma de mestrado, cada um de um lugar, cada um com costumes diferentes e sempre com alguma coisa à ensinar. Aprendi um pouco com cada um e levarei para sempre.

Ádupla de clínica, Letícia Brianezzi, obrigada pela ajuda, pela paciência e pelo conhecimento adquirido em equipe. Todos os dias foram proveitosos.

Áminha “mãe-estrangeira” Leslie, obrigada por me ensinar e me orientar com todo o carinho possível durante os primeiros passos na carreira científica. Você foi imprescindível para minha formação pessoal e profissional.

Á minha aluna de iniciação científica, Thaís Machado, pelo auxílio na pesquisa. Seu trabalho foi fundamental para o resultado final.

Aos colegas do doutorado, pelo apoio, por socorrer nos momentos de desespero e por sempre dar algumas dicas imprescindíveis para realizar um trabalho bem sucedido. Kiki, você é uma pessoa fantástica, sempre disposta a ajudar com um sorriso no rosto. Obrigada por todo apoio e pelas ajudas mesmo estando quilômetros distante. Rafael ou Jack, Marina Studart, Diana, Odair, me lembro de vocês quando eu estava na graduação e vocês no início do mestrado, obrigada pela disponibilidade.

Às turmas LI, LII e LIII do curso de odontologia, sem vocês o mestrado não teria tanta graça. Obrigada pela paciência e por me ensinar tanto e por fazerem da clínica um ambiente alegre, porem de muito trabalho. Desejo muito sucesso à todos vocês.

À equipemaís linda da FOB, Kiki, Larissa, Rafael Simões, Marília Velo, Diana Gadelha obrigada pelo auxílio, por sempre estarem dispostos à ajudar os mais novos e por de fato sermos uma equipe.

À Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo por me proporcionar primeiramente uma graduação completa, de excelente qualidade e posteriormente uma pós graduação do mesmo nível.

Aos professores do departamento de Dentística: Prof. Dr. Adilson Yoshio Furuse, Prof. Dr. Aquira Ishikiríama, Prof. Dr. Carlos Eduardo Francischone, Prof. Dr. Eduardo Batista Franco, Prof. Dr. José Carlos Pereira, Prof. Dr. José Mondelli, Prof^a. Dr.^a Juliana Fraga Soares Bombonatti, Prof^a. Dr.^a Linda Wang, Prof^a. Dr.^a. Maria Fídela de Lima Navarro, Prof^a. Dr.^a. Maria Teresa Atta, Prof. Dr. Rafael Francisco Lia Mondelli, Prof. Dr. Sérgio Kiyoshí Ishikiríama obrigadapor cada palavra, cada conselho e cada crítica, sempre construtiva, para a formação de pessoas e profissionais melhores e completos. Cada elogio recebido me incentivou e me fez acreditar que eu estava no caminho certo.

Aos professores de materiais dentários, Prof. Dr. Paulo Francisconi e Prof^a. Dr.^a. Ana Flávia Borges, pelos ensinamentos, pelos auxílios e por fazer o departamento de materiais dentários um ambiente agradável.

Ao prof. Dr. Heitor Marques Honório, pela colaboração essencial na realização da estatística dessa pesquisa.

Aos funcionários do departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos, especialmente Nelson, Charlene, Audria, Natália, Rita, Elísio, Zuleica, Sandra e Alcides. Obrigada por nos ajudarem em tudo, nos socorrendo e facilitando nossos dias. O apoio e o incentivo que recebemos diariamente de vocês são essenciais.

Ao Edímauro, pela ajuda e disponibilidade na realização da Microscopia.

As funcionários da pós graduação Leticia, Hebe, Cleusa, Leila, Eliane, Fátima, Margareth, obrigada pela disponibilidade e auxílios com os mais diversos assuntos.

Aos demais funcionários da faculdade, por contribuírem para funcionamento da instituição e, de alguma forma, estarem sempre dispostos a ajudar em nossos trabalhos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Prof^a. Dr^a. Linda Wang, um dos primeiros professores que conheci quando entrei na graduação em 2008. Lembro que estávamos na disciplina de Saúde Coletiva, você como tutora, e então começamos a falar sobre o motivo de cada um ter escolhido a odontologia como profissão. Falei que tinha interesse pela área acadêmica e na semana seguinte você marcou uma reunião, a primeira e então me tornei aluna de Iniciação Científica. Uma professora exigente, determinada, competente, muito carinhosa, do tipo mãe que me acompanhou pela primeira vez em um laboratório para dar início às pesquisas. Com o passar do tempo, primeiro e segundo ano de graduação e a ideia de fazer mestrado se consolidava e claro que a orientadora seria a mesma. E aqui estou eu, defendendo o mestrado e rumo ao doutorado. E esse ano você foi nome de turma, uma professora tão jovem e que faz já fez tanta coisa, fiquei muito orgulhoso e feliz por você. São 6 anos de uma convivência harmoniosa, alegre, apesar das dificuldades e de muito aprendizado. Obrigada pela disponibilidade, paciência, generosidade, pelas dicas e pelas críticas sempre da maneira mais construtivas, para me tornar uma profissional completa próxima à você. Saiba que me espelho muito em você tanto pessoalmente quanto profissionalmente. Muito obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Zago digníssimo reitor da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Ignacio María Poveda Velasco, secretário Geral da Universidade de São Paulo.

À Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado, diretora da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson, presidente da comissão da pós graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo fundamental suporte financeiro concedido para realização dessa pesquisa (Processo: 2013/12203-3).

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charles Chaplin

RESUMO

A longevidade da interação estabelecida entre a união do material restaurador e substrato tem sido o foco principal da Odontologia Adesiva. Se por um lado, a dentina é alterada por desafios como a erosão e a cárie dentária, por outro lado, tecnologias que atendam às condições distintas do substrato e que possibilitem união química tem sido desenvolvidas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de um sistema adesivo restaurador universal (modo convencional) na resistência de união (RU) à dentina em diferentes condições (artificialmente erodida ou cariada) e pré-tratadas com inibidores proteolíticos. Noventa molares hígidos foram selecionados e preparados, obtendo-se superfícies planas que foram tratadas com lixa 600 por 1 minuto. Os espécimes foram aleatoriamente divididos em três grupos iniciais, de acordo com o substrato: N- sem simulação de desafio ácido (mantidos em saliva artificial); ERO- simulação de erosão (3x5min/5dias com suco de laranja) e CA- simulação de cárie artificial (6h desmineralizante+ 18h-remineeralizante/ 5 dias + 48 remineralizante). Em seguida, cada um desses grupos foi redividido em três subgrupos, de acordo com o pré-tratamento da dentina: A- tratado com água; CHX- tratado com clorexidina a 2% e E-64- tratado com o inibidor E-64 a 5 μ M. No total, formaram-se, 9 grupos (n=10): N-A, N-CHX, N-E-64, ERO-A, ERO-CHX, ERO-E-64, CA-A, CA-CHX, CA-E-64. Todos os espécimes foram restaurados com adesivo Adper Single Bond Universal[®] e com resina composta Filtek Z250. Os dentes foram cortados para a obtenção dos palitos (área de 0,64mm² aproximadamente), que foram submetidos ao ensaio de microtração em máquina de teste a 0,5mm/min em 7 dias e 6 meses. O modo de fratura foi classificado de acordo com a análise das interfaces com microscopia ótica 40X. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade e analisados por ANOVA a três critérios e teste de Tukey (p<0,05). Os resultados demonstraram que houve interação entre o substrato x tratamento (p=0,0011) e substrato x tempo (p=0,0003). A dentina alterada por erosão e cárie artificialmente contribuíram negativamente na RU do sistema adesivo. O uso de clorexidina afetou negativamente a RU em todas as condições testadas. O E-64 mostrou-se efetiva em manter a estabilidade da união aos 6 meses para os substratos alterados. O sistema adesivo universal apresenta-se promissor para ser utilizado na dentina alterada, mantendo a resistência de união ao longo do tempo. O uso de E-64 não comprometeu a união à dentina, ao contrário do impacto no uso da solução de clorexidina.

Palavras chaves: Dentina; Adesivos dentinários; Cárie Dentária; Erosão Dentária; Inibidores enzimáticos.

ABSTRACT

Effect of proteolytic inhibitors in carious and eroded dentin adhesion

The longevity of the interaction established between restorative material and substrate has been the main focus of Adhesive Dentistry. Dentin is altered through challenges as dental erosion and caries and, on the other hand, technologies that attend for particular conditions of the substrate and favors for the chemical bonding has been developed. The aim of this study was to evaluate the performance of a universal adhesive system (etch-and-rinse mode) on bonding strength (BS) to dentin in different conditions (artificial caries or erosion) and pretreated with proteolytic inhibitors. Ninety molars were selected and prepared, obtaining flat surfaces treated with 600 sandpaper for 1 minute. The specimens were randomly divided into three groups according to the substrate: N- with no challenges (stored in artificial saliva), ERO-artificial erosion simulation (3x5min/5days with orange juice) and CA- artificial caries simulation (6h demineralizing+ 18h-remineralizing/ 5 days + 48 remineralizing). Then, each of these groups was redivided into three subgroups according to the pretreatment of dentin: A- treated with water; CHX-treated with 2% chlorhexidine and E-64- treated with 5 µM E-64 inhibitor. Therefore, they constituted 9 groups (n = 10): N-A, N-CHX, N-E-64, ERO-A, ERO-CHX, ERO-E-64, CA-A, CA-CHX, CA-E-64. All specimens were restored with Adper Single Bond ® Universal and composite resin Filtek Z250. The teeth were cut to obtain sticks (area of approximately 0.64 mm²), which were subjected to the microtensile bond test in the testing machine at 0.5 mm/min after 7 days and 6 months. The failure mode was classified according to the analysis of interfaces by optical microscopy 40X. Data was tested to verify normal distribution and homogeneity to be analyzed with three-way ANOVA and Tukey tests (p <0.05). Data revealed interaction between substrate x treatment (p=0.0011) and between substrate x time (p=0.0003). Dentin affected by artificial erosion and caries negatively contributed to the BS. The use of chlorhexidine negatively affected the RU for all tested conditions. E-64 showed to be effective to maintain the bonding stability to affected dentin for 6 months. The universal bonding system seems to be promissory to be employed to affected dentin, maintaining the BS overtime. The use of E-64 did not affect the bonding to dentin, controversial to the use of chlorhexidine.

Key words: Dentin; Dentin-bonding agents; Dental caries; Dental Erosion; Enzyme inhibitors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1	- Apresentação da formulação química do digluconato de clorexidina	33
Figura 2	- Apresentação da formulação química do inibidor proteolítico E-64	35
Figura 3	- Preparo da superfície dos espécimes	47
Figura 4	- Tratamento restaurador adesivo.	55
Figura 5	- Teste de microtração.	57

LISTA DE QUADROS E TABELAS

-QUADROS

Quadro 1	Distribuição dos grupos testados	49
Quadro 2	Constituição química das soluções	50
Quadro 3	Protocolo de aplicação dos inibidores enzimáticos	51
Quadro 4	Informações sobre as fontes primárias para o preparo das soluções inibidoras proteolíticas.....	52
Quadro 5	Composição do sistema adesivo utilizado.....	52

-TABELAS

Tabela 1	- Valores de média (MPa) e desvio padrão das condições testadas, considerando a interações entre substrato e tratamento	63
Tabela 2	- Valores de media (MPa) e desvio padrão das condições testadas, considerando a interações entre substrato e tempo	64
Tabela 3	- Valores em porcentagem dos modos de fratura considerando o substrato normal	64
Tabela 4	- Valores em porcentagem dos modos de fratura considerando o substrato erodido	65
Tabela 5	- Valores em porcentagem dos modos de fratura considerando o substrato cariado	65

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
cm ²	Centímetro quadrado
CT(s)	Cisteíno Catepsina(s)
CHX	Clorexidina
DES	Desmineralização
EUA	Estados Unidos da América
KCl	Cloreto de potássio
Kgf	Kilograma Força
MDP	10- metacrilodecil fosfato dehidrogenado
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
mm/min	Milímetro por minuto
MMP(s)	Metaloproteinase(s)da Matriz
MPa	Megapascal
p	Desvio padrão
pH	potencial Hidrogeniônico
Ppm	Parte Por Milhão
RE	Remineralização
SP	São Paulo
s	Segundo
X	vez(es)
μTBS	<i>microtensil bond strength</i>
μM	micro Molar
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	SUBSTRATO DENTINÁRIO.....	23
2.2	PAPEL DAS ENZIMAS NA MATRIZ ORGÂNICA DENTINÁRIA.....	29
2.3	INIBIDORES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	33
2.3.1	Clorexidina.....	33
2.3.2	E-64	34
2.4	SISTEMA ADESIVO UNIVERSAL.....	35
3	PROPOSIÇÃO	39
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	45
4.2	SELEÇÃO E CORTE DOS CORPOS DE PROVA.....	45
4.3	PADRONIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES.....	47
4.4	FASE EXPERIMENTAL IN VITRO	47
4.4.1	Indução de lesão erosiva e lesão de cárie artificial em dentina	49
4.5	TRATAMENTO RESTAURADOR ADESIVO.....	51
4.6	TESTE DE MICROTRAÇÃO	55
4.7	ANÁLISE DE MODO DE FRATURA DA INTERFACE	57
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
5	RESULTADOS	61
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O conceito adesivo constitui-se na principal base dos procedimentos restauradores diretos e indiretos e apesar de ser considerado promissor ainda apresenta limitações que desafiam os profissionais (PASHLEY et al., 2011; VAN MEERBEEK et al., 2011).

Uma parcela significativa dos trabalhos científicos utiliza o substrato dentinário hígido para averiguar o impacto do mecanismo de ação das mais variadas estratégias propostas na adesão. Entretanto, em grande parte das situações clínicas, o substrato dentário a ser restaurado corresponde a uma condição alterada, diferente do que é encontrado nos principais estudos laboratoriais (HAJ-ALI et al., 2006; WANG, SPENCER, WALKER, 2007; KOMORI et al., 2009; FRANCISCONI-DOS-RIOS et al., 2014). Dessa forma, o uso de substratos naturalmente alterados e a simulação das principais condições de desafio desmineralizador tem sido reproduzido em laboratório na tentativa de aproximá-los dos desafios reais (KOMORI et al., 2009; FRANCISCONI-DOS-RIOS et al., 2014).

A desmineralização de substratos dentários provoca alterações mínimas ou substanciais, dependendo do agente etiológico, de sua intensidade e frequência. Clinicamente, os dois eventos desmineralizadores mais significativos são a cárie e a erosão. A doença cárie provoca lesões nos tecidos duros e na dentina altera o componente inorgânico e orgânico, (KIDD, 2011, HAJ-ALI et al., 2006; WANG et al., 2006; BALOOCH et al., 2008; PUGACH et al., 2009). Neste processo, a matriz orgânica se apresenta com perda mineral, porém não totalmente desprovida e a trama de colágeno apresenta-se desorganizada. Além da cárie dentária, existem diferentes processos crônicos e destrutivos que podem afetar os dentes levando à perda irreversível de estrutura dentária, destacando-se a erosão dentária (IMFELD, 1996; MAGALHÃES et al., 2009; LUSSI et al. 2011; SHELLIS et al., 2011; GANSS et al., 2014). Este evento cada vez mais freqüente tem ocorrido devido à mudança de hábitos alimentares e distúrbios gástricos que favorecem a presença de componente ácido na cavidade bucal (IMFELD, 1996; MAGALHÃES et al., 2009; GANSS et al., 2014). Similarmente à cárie, a erosão dentária se estabelece mediante condições multifatoriais (MAGALHÃES et al., 2009). Porém, ao contrário da cárie, não ocorre o

envolvimento de microrganismos neste processo e consequentemente, não se evidencia a mesma intensidade no comprometimento da matriz orgânica como ocorre com a dentina cariada (BALOOCH et al., 2008; PUGACH et al., 2009; GANSS et al., 2014). A principal fonte de erosão dentária extrínseca é provocada pelo consumo de bebidas ácidas como o suco de laranja, que apresenta o ácido cítrico em sua composição, um ácido orgânico e um dos mais erosivos devido a sua propriedade quelante (JENSDOTTIR et al 2006; GARONE FILHO, 2008).

O ácido cítrico apresenta o íon citrato capaz de quelar íons metálicos, como o cálcio, sendo que esse é um dos mecanismos pelo qual as bebidas que contém ácido cítrico, como o suco de laranja, provocam erosão dentária (GANSS; LUSSI, 2014). Entretanto, vale lembrar, que a erosão depende de alguns fatores como pH, capacidade de tamponamento e quelação.

Essas alterações estruturais da dentina podem resultar em diferenças na qualidade do processo adesivo. Inicialmente, apenas a perda mineral era considerada responsável pelo comprometimento da qualidade adesiva. Com base neste fator, os sistemas adesivos foram elaborados essencialmente de forma que pudessem aproveitar as vias de infiltração promovidas por um agente ácido para que os monômeros resinosos pudessem preencher e estabelecer uma união mecânica com o substrato (PASHLEY et al., 2011; VAN MEERBEECK et al., 2005; VAN MEERBEECK et al., 2011).

Tanto na lesão de cárie quanto na lesão erosiva existe a presença da camada orgânica desmineralizada, a qual é composta principalmente por colágeno (90%), e por proteínas não colágenas (10%). Evidências mais recentes são consistentes em demonstrar que o impacto da matriz orgânica não se limita apenas devido ao comprometimento da integridade das fibrilas de colágeno. Esta camada pode ser afetada também por enzimas do próprio hospedeiro, como as metaloproteinases (MMPs) e as cisteíno-catepsinas (CTs), que estão presentes tanto na saliva quanto nos tecidos duros dentais (HANNAS et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2011; VIDAL et al., 2012; SCAFFA et al. 2012; TJÄDERHANE et al., 2013). Tanto as MMPs quanto as CTs estão presente no complexo dentino-pulpar em sua forma latente e estas passam a sua forma ativa inicialmente pela perda da proteção dos minerais frente a uma queda de pH. Sugerem-se que elas agem de forma sinérgica e podem estar

relacionadas à degradação da interface adesiva por meio da degradação hidrolítica das fibrilas de colágeno. (TJÄDERHANE et al., 2013, VIDAL et al., 2012, SCAFFA et al., 2012, NASCIMENTO et al., 2011, CARRILHO et al., 2007a, CARRILHO et al., 2007b).

Diversos estudos *in situ* foram realizados utilizando inibidores de proteases já conhecidos, como a clorexidina (GENDRON et al., 1999), o chá verde (DEMEULE et al., 2000, MAGALHÃES et al., 2009b), sulfato ferroso (KATO et al., 2010), E-64 (SCAFFA et al. 2012), demonstrando o potencial destes agentes. Dentre esses inibidores, a clorexidina na forma de solução aquosa já era amplamente empregada como agente antimicrobiano, sendo de fácil acesso e de baixo custo. Todavia foi constatado que ela apresenta função na inibição inespecífica da atividade proteolítica, abrangendo o grupo das MMPs (GERDRON et al., 1999). Mais recentemente, o E-64 vem sendo investigado como potencial inibidor específico de cisteíno-catepsinas para averiguar sua possibilidade na preservação da estabilidade de união dentina (SCAFFA et al., 2012).

À luz dessas evidências, um sistema restaurador universal foi proposto de forma a permitir uma maior flexibilidade de emprego clínico, podendo ser utilizado tanto na forma convencional como auto-condicionante (PERDIGÃO et al., 2012, MUÑOZ et al., 2015). Por meio desta tecnologia, destacam-se os produtos que utilizam o monômero resinoso metacrilóiloxidecil dihidrogênio fosfato (MDP), que tem apresentado resultados de longevidade promissores (MUÑOZ et al., 2015).

Com perspectivas interessantes tanto do ponto de vista biológico com o uso de inibidores enzimáticos e o aperfeiçoamento da tecnologia de materiais, há a necessidade de se investigar o impacto da interação destas estratégias, bem como se funcionam satisfatoriamente nos principais substratos dentinários representativos da condição clínica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SUBSTRATOS DENTINÁRIOS

O entendimento de que a adesão não depende apenas do material adesivo, mas também das características do substrato dental impulsionaram os estudos para melhor compreensão da dentina e suas principais alterações que possam influenciar na sua interação (HAJ-ALI et al., 2006).

A dentina normal, hígida, apresenta cristais de hidroxiapatita organizados, formando as paredes dos túbulos dentinários (dentina peritubular) e, também encontram-se imersos na matriz dentinária composta pela rede de colágeno (dentina intertubular). Essa morfologia da dentina caracterizada por inúmeros túbulos e canalículos que atravessam toda a sua espessura, confere grande permeabilidade a essa estrutura e é fundamental para o entendimento das reações e processos de difusão que ocorrem entre o dente e o meio bucal (MARSHALL et al., 1997; BERTASSONI et al., 2012; BERTASSONI, STANKOSKA, SWAIN, 2012). A matriz intertubular é composta, principalmente, por colágeno do tipo I, associada a proteínas não colágenas e proteoglicanas, formando assim uma matriz tridimensional reforçada por cristais de hidroxiapatita (BALOOCH et al., 2008; PUGACH et al. 2009).

Uma vez expostos aos desafios na cavidade bucal, a dentina é um substrato que mesmo sem uma exposição direta, sofre alterações que podem provocar impacto na interação com o material restaurador (WANG, SPENCER, WALKER, 2007; KOMORI et al., 2009; FRANCISCONI-DOS-RIOS et al., 2014). A cárie dentária e a erosão são os eventos clínicos mais associados a este efeito e diferem tanto na etiologia quanto nas características histológicas.

A cárie é o principal evento clínico que promove, sobretudo, alterações no esmalte e dentina. Corresponde a uma doença multifatorial, que causa a destruição dos tecidos dentais duros como consequência aos ácidos provenientes do metabolismo bacteriano (KIDD, 2011). As bactérias constituintes do biofilme são metabolicamente ativas, causando alterações constantes no pH oral (KIDD, 2011) e,

desta forma, a estrutura dentária está constantemente sofrendo processos de desmineralização-remineralização, conhecido como processo DES-RE. Esse processo fundamenta a natureza dinâmica da cárie, que se caracteriza por uma constante perda e ganho de minerais pela estrutura dentária. Enquanto o equilíbrio for mantido, não haverá perda nem ganho significativo de minerais, porém quando ocorre o desequilíbrio onde a DES é maior do que a RE, ocorre a perda de substância no esmalte e haverá então uma manifestação clínica (KIDD, 2011). A partir desta evolução da camada subsuperficial, na junção amelodentinária, o comprometimento da dentina se estabelece. Assim, as lesões de cárie se formam em uma superfície dentária coberta por biofilme e são causadas pela produção de ácido e fermentação do açúcar. As lesões são caracteristicamente de subsuperfície com uma camada externa relativamente intacta (ARENDS;DIJKMAN; CHRISTOFFERSEN, 1987; HONÓRIO et al., 2008b; MAGALHÃES et al., 2009).

Nas lesões de cárie, o efeito dos ácidos promove um impacto mais agressivo. Além da perda mineral, ocorre o comprometimento total da integridade da fibrila de colágeno. As lesões de cárie apresentam diferentes camadas de dentina: dentina cariada infectada e dentina cariada afetada. A dentina infectada é a mais superficial, desvitalizada, onde as fibrilas de colágeno estão degradadas de forma irreversível e esta é a dentina removida durante o procedimento clínico. Por outro lado, a dentina afetada geralmente não é removida durante o tratamento e em contraste com a dentina não cariada, minerais ácido-resistentes ocluem frequentemente os túbulos dentinários (HAJ-ALI et al.,2006). Resultados de estudos de testes de união sugerem que as características da dentina cariada afetada tem impacto direto sobre a interface dentina/adesivo. Essa diferença encontrada nos valores de resistência de união pode estar relacionada com a diferença estrutural entre dentina não cariada e dentina cariada afetada, influenciada por alguns fatores como o padrão da dentina desmineralizada, a penetração do sistema adesivo e por consequência a adesão da interface dentina/adesivo (HAJ-ALI et al., 2006, BALOOCH et al., 2008, PUGACH et al., 2009).

Pugach et al. (2009) observaram diferenças estruturais e nas propriedades mecânicas das diferentes camadas da dentina na lesão de cárie. Considerando 4 zonas da lesão cariosa, as porções cariadas apresentam menor teor mineral, sobretudo na dentina peritubular e redução das propriedades mecânicas. Os autores

também chamam a atenção de que a condição desidratada intensifica a diferença comparada à dentina normal.

Nesta comparação entre a dentina sadia e modificada pela cárie, os estudos tem apontado para a relevância da presença de minerais não apenas extrafibrilar, porém a interfibrilar, que se deposita nos *gaps* regulares das fibrilas de colágeno e são provavelmente responsáveis pelo início da nucleação dos cristais de apatita. Esta característica a torna essencial para a elasticidade e dureza do tecido dentinário, apesar de sua quantidade ser bem menor comparada à dentina extrafibrilar (BALOOCH et al., 2009).

Wang et al., 2006 também evidenciaram alterações químicas e estruturais da dentina cariada em relação à dentina normal, bem como a diferença na composição mineral após sofrer ciclo de desmineralização e remineralização. Essa modificações tanto na estrutura quanto na composição também induzem grandes diferenças no perfil da interface dentina/adesivo, de forma que uma interface dentina cariada (afetada)/adesivo mais ampla e complexa foi observada. Como consequência, o adesivo penetrou de forma irregular e diminuiu nas áreas de desmineralização de maior profundidade.

Diante deste cenário, trabalhos que utilizam o substrato cariado afetado natural ou artificialmente criado tem sido empregados para avaliar o desempenho de diferentes abordagens adesivas (WANG et al., 2006; KOMORI et al., 2009; MOHAMED et al., 2014).

Para se reproduzir as lesões de cárie *in vitro* existem diversos modelos experimentais descritos na literatura (FEATHERSTONE et al., 1996). Espécimes de tecido dentário duro são geralmente expostos a soluções ou géis desmineralizantes, simulando as condições do fluido do biofilme dentário e, consequentemente, permitindo a formação de lesão de cárie inicial (LYNCH; MONY; TEN CATE, 2007; QUEIROZ et al., 2008; MORON et al., 2013).

Diferenças no grau inicial de saturação de minerais, concentração de fluoreto, tipo de ácido e viscosidade dos agentes desmineralizantes podem resultar em diferenças consideráveis nas características físicas e mecânicas do tecido dentário desmineralizado, como a distribuição mineral (ARENDS; DIJKMAN;

CHRISTOFFERSEN, 1987), composição química (LYNCH; TEN CATE, 2006) e dureza (MAGALHÃES et al., 2009). As lesões de cárie artificial podem responder de forma diferente, dependendo do grau de mineralização da camada de superfície. A ciclagem DES-RE corresponde a um dos protocolos mais utilizados, uma vez que simula as etapas desmineralizante e remineralizante sob o aspecto dinâmico (VIEIRA et al., 2005).

Marquezan et al., 2009 compararam diferentes protocolos incluindo o modelo de ciclagem de pH e também modelo microbiológico, ambos por 14 dias por meio de análises por microdureza e por aspecto morfológico. As observações das duas análises foram coerentes, demonstrando que o modelo de ciclagem seria útil na reprodução de uma dentina próxima da condição afetada, enquanto que o modelo biológico promoveu maior desmineralização, em condição mais similar a uma dentina infectada. Nas imagens por microscopia eletrônica de varredura, observou-se na cárie natural uma superfície dentinária irregular, com extensa desmineralização da dentina intertubular, remoção de fibrilas de colágeno e abertura dos túbulos dentinários. Na análise das imagens da dentina desmineralizada pelo modelo de ciclagem, a desmineralização intertubular se apresenta mais moderada com maior abertura dos túbulos dentinários. Na condição simulada com o modelo microbiológico, uma regularidade intermediária entre a dentina natural e promovida por ciclagem é observada, com características mais próximas a encontrada para a dentina cariada natural, porém com abertura tubular menor.

Na erosão, a superfície dentária é desmineralizada por ácidos (extrínsecos ou intrínsecos) diretamente, sem o envolvimento bacteriano. Inicialmente, ocorre uma desmineralização parcial (amolecimento) da superfície do esmalte, a qual pode levar à completa perda do tecido pela contínua desmineralização e pela abrasão intraoral (HONÓRIO et al. 2008b, MAGALHÃES et al., 2009; HUYSMANN et al., 2001).

A reprodução dessas condições em experimentos laboratoriais é proposta no intuito de simular estes desafios de forma a se aproximar da realidade e tal qual ocorre com a simulação de cárie artificial, estes protocolos apresentam grande variação nesta tentativa, dependendo do fator principal a ser analisado (HONÓRIO et al., 2008a; WEST; DAVIES; AMAECHI, 2011; SHELLIS et al., 2011; SCHLUETER

et al., 2011). Shellis et al. em 2014 abordaram sobre a relevância dos fatores a serem considerados na erosão dentária e na reprodução de modelos. Em experimentos laboratoriais, os modelos são propostos no intuito de simular estes desafios de forma realista e tal qual ocorre com a simulação de cárie artificial, estes protocolos apresentam grande variação nesta tentativa, dependendo do fator principal a ser analisado (HONÓRIO et al., 2008a; WEST; DAVIES; AMAECHI, 2011.)

Os desafios simuladores provocam as características morfológicas da camada superficial da dentina, baseado na condição de que as alterações induzidas pelo processo de erosão artificial promovem a perda mineral e a exposição da matriz orgânica, principalmente as fibrilas de colágeno e o alargamento da embocadura do túbulos dentinários (MIRKARIMI; TOOMARIAN, 2012; ZIMMERLI et al., 2012).

A erosão dental se inicia com um primeiro ataque por ácido ao substrato dentário, resultando na perda da integridade estrutural e resistência mecânica. Essa fase foi denominada “amolecimento” (*softening*) por Koulourides (1968). Essa primeira fase é seguida por uma perda em volume com a persistência dessa camada amolecida na superfície do tecido remanescente (LUSSI et al., 2011). Esse processo é acompanhado por uma contínua dissolução que ocorre camada por camada dos cristais de esmalte, atingindo dessa forma a dentina (LUSSI et al., 2011). Sabe-se que esmalte e dentina se diferem histológica e biologicamente. O esmalte dentário contém menos mineral solúvel que a dentina, por isso a erosão tende a ser mais lenta (LUSSI et al., 2011; SHELLIS et al., 2011). Tal qual a dentina acometida pela cárie, a erosão dentária pode conduzir a uma formação de dentina reparadora ou reacionária.

O mecanismo de evolução da erosão dentária em dentina ainda não está completamente elucidado. Quando o ácido atinge a dentina, ocorre uma dissolução da junção dentina peri e intertubular e logo em seguida da dentina peritubular é atingida (BUZALAF et al., 2012). mas a porção orgânica não é degradada de forma evidente (KINNEY et al., 1995). O resultado é que não há perda em massa, em vez disso há uma estrutura remanescente esponjosa e desmineralizada (LUSSI; GANSS, 2014).

Entre os agentes utilizados na simulação da erosão dentária, as bebidas ácidas são bastante consumidas destacando-se o suco de laranja, que é um dos agentes etiológicos mais significativos, constatado por diversas metodologias (LUSSI et al., 2009; WANG et al., 2011; SHELLIS et al., 2014). O suco de laranja industrializado, composto por ácido cítrico é um ácido orgânico e um dos mais erosivos devido a sua propriedade quelante (GARONE; ABREU 2008).

Simultaneamente aos eventos que ocorrem com a integridade e a relação das fibrilas de colágeno com o impacto da desmineralização propriamente dita, decorrida de lesões de cárie ou erosão, há de se considerar o papel de enzimas encontradas na matriz orgânica. O colágeno humano desmineralizado pode ser degradado por collagenases e outras enzimas proteolíticas (TJÄDERHANE et al., 1998; GANSS; LUSSI; SCHLUETER, 2004; HANNAS et al., 2007). Deve-se considerar também que a taxa de desmineralização intraoral é mais lenta que em experimentos, logo a ação das enzimas proteolíticas pode ser suficiente para remover essa estrutura, assim que o mineral for dissolvido (LUSSI; GANSS, 2014). Sugere-se que a degradação da matriz orgânica exposta pela erosão também seja decorrente da ação das enzimas do próprio hospedeiro, similar ao que ocorre na cáriedental (TJÄDERHANE et al., 1998; KATO et al. 2009; MAGALHÃES et al., 2009; KATO et al., 2010). Uma vez que no processo erosivo prevalece o mecanismo de desmineralização, ainda não há evidências contundentes do envolvimento da matriz orgânica. Entretanto, a perda do mineral expõe as enzimas proteolíticas intrínsecas da dentina (KATO et al., 2009; KATO et al., 2010). Em substrato artificialmente erodido, trabalhos como de KATO et al., 2009; KATO et al., 2010 apontam para o fato de que estas enzimas colaboram no desgaste da dentina exposta pelo agente erosivo. No trabalho de FRANCISCONI-DOS-RIOS et al., 2014, imagens obtidas por meio da microscopia de confocal a laser indicam que a formação de *tags* foi irregular, heterogênea e mais superficial comparativamente à dentina normal, sugerindo que as fibrilas de colágeno desmineralizadas acabam por se colapsar mais superficialmente, dificultando a penetração adequada do sistema adesivo.

Clinicamente, as lesões erosivas em esmalte podem não provocar nenhum sensibilidade ou incomodo aos pacientes. De acordo com a evolução da lesão, ainda em esmalte, a restauração da lesão pode ser realizada com o objetivo de

restabelecer estética e prevenir a progressão (REIS et al., 2009). Porém, em casos mais avançados, a lesão atinge a dentina, provocando hipersensibilidade dentinária e levando a perda da integridade estrutural (BARLETT et al., 2008).

Como resultado do procedimento erodido, a dentina se torna gradualmente esclerótica, superfície visivelmente brilhante, hipermineralizada e com fechamento dos túbulos dentinários. Estudo realizado por Zimmerli (2012) em dentina humana relataram que a resistência de união a dentina esclerótica é mais baixa que resistência de união a dentina normal, fato que pode ser explicado pela característica hipermineralizada com fechamento dos túbulos como descrito.

Tanto no processo carioso como erosivo, há recursos fisiológicos e mecânicos capazes de conter suas consequências, mas caso não sejam suficientes, ainda assim há perda de estrutura dentária. As lesões localizadas nos tecidos mineralizados são consideradas sinais da doença, os quais podem ser distribuídos em uma escala que se comporta desde perdas incipientes em nível ultraestrutural, até a destruição total do dente (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

Quando restaurar se torna necessário, os materiais adesivos correspondem a um dos recursos mais aplicados, estimulando estudos relacionados ao comportamento dos materiais restauradores quando submetidos a desafios cariosos ou erosivos (FRANCISCONI et al., 2008; RIOS et al., 2008, KOMORI et al., 2009; WANG et al., 2014).

2.2 PAPEL DAS ENZIMAS NA MATRIZ ORGÂNICA DENTINÁRIA

Diversas enzimas intrínsecas da dentina foram identificadas no complexo dentinopulpar, destacando-se metaloproteinases (MMPs) e cisteíno-catepsinas (CTs) (HANNAS et al., 2007; TERSARIOL et al., 2009; SCAFFA et al., 2012; VIDAL et al., 2013). Estas enzimas participam na formação dentária, contribuindo no processo de modulação nesta fase. Em seguida, permanecem protegidas pelos minerais em estado latente.

Tem-se observado que as MMPs podem ser reativadas pela queda do pH consequente ao tratamento da superfície com condicionamento ácido, seguido da

aplicação de primer, adesivo ou a bioquímica do processo carioso, provocando uma maior degradação das fibrilas de colágeno e um maior risco de nanoinfiltração (PASHLEY et al., 2004). Esta reativação decorre da perda mineral responsável pela sua proteção em estado de latente, como demonstrado por Tjäderhane et al. em 1998.

As MMPs são endopeptidases zinco e cálcio dependentes. Sua nomenclatura corresponde ao tecido ou substrato a que pertencem ou que degradam. As collagenases degradam fibrilas de colágeno intactas (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18), enquanto as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) degradam proteínas colagênicas desnaturadas. São constituídas por 2 cadeias: Prodomain (Pródomínio) composta de aproximadamente 80 aminoácidos e a Domain (Domínio) que apresenta o zinco (VISSE; NAGASE, 2003). As MMPs dependem da presença de íons cálcio para manter sua estrutura terciária e íons zinco para manter a funcionalidade do seu sítio ativo (VISSE; NAGASE, 2003). As MMPs são ativadas em pH ácido, porém sua ação ocorre em pH neutro. Em condições específicas, o colágeno tipo I da dentina é degradado pelas collagenases MMP-1, MMP-8 e MMP-13. Porém, após o colágeno perder a sua estrutura de triple hélice, essa gelatina é degradada pelas MMP-2 e MMP-9. As MMPs se apresentam nos tecidos e sua forma inativa demonstrou que alterações no pH são capazes de ativar as MMPs.

As MMPs compreendem um grupo de enzimas capazes de degradar quase todas as proteínas da matriz extracelular, incluindo o colágeno nativo e desnaturado (HANNAS et al., 2007). Especialmente a collagenase MMP-8 e as gelatinases MMP-2 e -9 estão relacionadas à degradação da matriz de colágeno na dentina. Elas foram identificadas nas lesões de cárie dentária tanto na forma latente, quanto na forma ativa. Suspeita-se que a atividade das MMPs também possam estar envolvidas na degradação do colágeno não protegido pela incompleta infiltração de monômeros resinosos na dentina condicionada por ácido (HEBLING et al., 2005; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; PASHLEY et al., 2004), o que poderia explicar a degradação progressiva da camada híbrida observada em inúmeros estudos *in vitro* (CARRILHO et al., 2007a) e *in vivo* (CARRILHO et al., 2007b; HASHIMOTO et al., 2000).

Em estudo realizado por Tersariol et al. (2010), observou-se uma correlação positiva entre a atividade de MMPs e CTs, ambas extraídas da dentina sadia. Nesse mesmo estudo, notou-se que a atividade de CTs é maior quanto maior a profundidade da lesão de cárie, sendo que para as MMPs foi observada uma ligeira queda na sua atividade em lesões mais profundas.

As CTs são enzimas lisossomais, pertencente ao clã das CA das cisteíno-peptidase, de forma mais específica à família C1 das enzimas semelhantes a papina. Representa uma ampla classe de enzimas proteolíticas distribuídas entre os organismos vivos. Atualmente existem 11 cisteíno-catepsinas humanas conhecidas: B, C, F, H, K, L, O, S, V, X e W. São enzimas ativas em pH levemente ácido. As CTs são enzimas multifuncionais envolvidas na clivagem das proteínas da membrana, bem como na degradação da matriz extracelular e remodelação tecidual (TURK et al., 2000). Elas são sintetizadas na forma de pré-pró-peptídeos, de forma que esse pré-peptídeo é removido quando essas enzimas são enviadas ao retículo endoplasmático e sua ativação acontece quando o pró-peptídeo é removido, expondo assim o sítio ativo da enzima. Isso pode acontecer pela ação de outras proteases ou por um mecanismo de auto ativação em pH ácido (TURK et al., 2000). Os primeiros estudos avaliaram a presença e atividade enzimática de CTs em dentina (TERSARIOL et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2011), a expressão gênica de diferentes CTs no tecido pulpar humano e em odontoblastos foi demonstrada, assim como, foi relatada a presença de CT-B em dentina sadia (TERSARIOL et al., 2010). Nascimento et al. (2011) compararam a presença e atividade de CT-B em dentina sadia e cariada e observaram um aumento tanto na expressão quanto na atividade desta enzima na dentina cariada.

Vale uma atenção especial a CT-K, uma vez que ela é a única enzima que apresenta atividade collagenolítica e que possui a capacidade de clivar a tripla hélice do colágeno em pH ácido (GARNERO et al., 1998), porém todas as outras enzimas collagenolíticas tem sua ação em pH neutro e pertencem à família das MMPs.

Porém, não são todas as MMPs e CTs que possuem a capacidade de degradar colágeno íntegro. Bertassoni (2011) propôs que, estruturalmente, a molécula de colágeno íntegro (tripla hélice) seria maior que o sítio ativo das enzimas. Tjäderhane et al. (2012) propuseram que a degradação do colágeno

poderia acontecer de duas maneiras: 1) pela ação inicial de uma enzima que pudesse desenrolar a molécula do colágeno, permitindo que as colagenases degradassem uma das hélices; 2) por uma alteração estrutural na molécula do colágeno que permitiria a sua degradação.

Os danos causados à matriz orgânica dentinária durante a progressão da cárie seriam capazes de promover essas alterações estruturais, o que facilitaria a ação de MMPs e CTs na degradação da matriz orgânica. Ainda foi sugerido que, uma vez que a MMP-9 assim como as CTs, são capazes de atuar como telopeptidases (removendo os telopeptídeos da estrutura do colágeno), essas enzimas poderiam expor o sítio de clivagem do colágeno, facilitando a sua degradação por outras proteases (TJÄDERHANE et al., 2012). Esses dados mais uma vez reforçam a teoria de que MMPs e CTs possam atuar em conjunto na degradação do colágeno na cárie (Tjäderhane et al., 2012).

Além da MMPs, as cisteíno-catepsinas (CTs) podem estar envolvidas neste processo (TJÄDERHANE et al., 2013). Mais recentemente, também tem sido dada ênfase no papel das CTs presentes na complexo dentinopulpar, sendo encontradas em dentina sadia (VIDAL et al., 2012) e no tecido pulpar (TERSARIOL et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2011).

As CTs podem ativar as MMPs (NAGASE et al., 1997) e este mecanismo pode estar envolvido nas lesões de cárie em dentina em humanos (NASCIMENTO et al., 2011). Acredita-se que as MMPs e CTs tem atividade sinérgica e adicional, (NASCIMENTO et al., 2011, VIDAL et al., 2012), porém com papel distinto na atividade proteolítica (TERSARIOL et al., 2010). A atividade colagenolítica persistente exibida nos substratos dentinários humanos parcialmente desmineralizados e não infiltrados por adesivos, na ausência de bactérias, foi previamente associada com uma degradação morfológica das fibrilas de colágeno (PASHLEY et al., 2004). Com isso, estudos envolvendo lesões cariosas e lesões não cariosas são imprescindíveis, já que ambas provocam uma desmineralização, ou seja, degradação das fibrilas de colágeno e com isso a exposição e ativação das MMPs e das CTs.

Na dentina erodida resulta na exposição de uma camada totalmente desmineralizada mais externa e uma camada mais interna parcialmente

Alguns inibidores de proteases já são conhecidos e utilizados em ambiente clínico. Como a abordagem recente da associação da etapa adesiva ao uso da solução de clorexidina (CHX), variando a concentração até 2% (HEBLING et al., 2005; HANNAS et al., 2007; KOMORI et al. 2009). A base desta solução, a clorexidina, é apresentada na Figura 1.

A clorexidina é um inibidor inespecífico, capaz de inibir as MMPs. Seu mecanismo de ação ocorre pela quelação através da adição de cloreto de sódio, que reverte ou impede a ação das MMPs-2 e -9. Em concentrações elevadas, a CHX leva a desnaturação das MMPs-2 (GENDRON et al., 1999).

O digluconato de clorexidina (solução aquosa), forma empregada da clorexidina na clínica, é utilizado após o condicionamento ácido e antes da aplicação do sistema adesivo. Este apresenta alta substantividade à matriz dentinária (CARRILHO et al., 2010). A substantividade da CHX, ou seja, a sua capacidade de permanecer retida na matriz orgânica da dentina por um período de tempo pode ser

responsável pela prevenção ou minimização da diminuição dos valores de resistência de união.

A atividade do digluconato de clorexidina é pH dependente (5,5 a 7,0) CHX é pH dependente, mas pode ser neutralizada na presença de surfactantes iônicos, ânions inorgânicos (fosfato, nitrato e cloro). Além disso, sua ação é dose-dependente (GENDRON et al., 1999). Soluções aquosas de clorexidina a 2% impedem ou minimizam, em alguns casos por até 2 anos, a diminuição do valores de resistência de união de materiais resinosos à dentina e a nanoinfiltração da interface adesiva, o que foi demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo*, em dentes decíduos e permanentes, hígidos e cariados (CARRILHO et al., 2007a, CARRILHO et al., 2007b, KOMORI et al., 2009), bem como para dentina erodida (FRANSCISCONI-DOS RIOS, et al., 2014)

Até o momento, os estudos têm se limitado a avaliar o papel da clorexidina na qualidade adesiva dos materiais resinosos à dentina normal ou afetada por cárie apenas (CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; KOMORI et al., 2009), o que sugere testá-la em superfícies também erodidas, já que a ativação das MMP e das CTs ocorrem através de um desafio ácido.

Acredita-se que as MMPs e CTs tenham atividade sinérgica e adicional, (NASCIMENTO et al., 2011, VIDAL et al., 2012), porém com papel distinto na atividade proteolítica (TERSARIOL et al., 2010). A idéia de uso de um inibidor específico para as CTs neste caso poderia trazer mais informações de sua participação nos processos da degradação (TURK; GUNCAR, 2013).

2.3.2 E-64

E-64 (trans-epoxisuccinil-l-leucilamido (4-guanidino) butano) é um inibidor específico das cisteíno-catepsinas (KATSUNUMA et al., 1987) e sua estrutura foi determinada por Hanada et al., 1978. Ele é sintético, solúvel em água e sua inibição é irreversível (do tipo covalente), visto que há uma ligação com o sítio ativo entre este inibidor e as CTs. A apresentação molecular é representada na Figura 2.

Figura 2- Apresentação da formulação química do inibidor proteolítico E-64.

O E-64 possui uma forma básica, sendo esta capaz de sofrer modificações. O E-64 é uma molécula orgânica, constituído basicamente por três grupos conectados por uma ligação do tipo amida. No grupamento epóxido é onde ocorre a reação com a enzima. Seu mecanismo de ação consiste na formação de uma ligação covalente entre o grupo epóxido, presente na molécula do E-64, com grupo cisteína presente no sítio ativo da enzima. Além do E-64 promover uma maior afinidade ao sítio que as CTs, requer uma concentração mais baixa, sendo mais eficiente (MATSUMOTO et al., 1999). Esta ligação covalente é um passo crucial para a atividade inibitória. (MATSUMOTO et al., 1999).

O conhecido inibidor das CTs, o E-64, foi utilizado e introduzido na odontologia, na concentração de 5µM no estudo de Tersariol et al. 2010 e no estudo de Nascimento et al. 2011 ao avaliar a atividade proteolítica dessas enzimas.

2.4 SISTEMA ADESIVO UNIVERSAL

A busca por um agente de união, capaz de promover um selamento eficaz e duradouro, tem sido um difícil desafio (HASHIMOTO et al., 2000).

A atual tecnologia dos sistemas adesivos tende a simplificar o procedimento adesivo, reduzindo as etapas de aplicação, bem como o tempo clínico de aplicação e diminuindo a sensibilidade técnica para assim melhorar sua padronização (VAN MEERBEEK et al., 2003). O desenvolvimento dos sistemas adesivos autocondicionantes simplificou o tradicional conceito de adesão (BOILLAGUET et

al., 2001). Os sistemas adesivos autocondicionantes não produzem uma condição padrão no esmalte que seja tão retentiva quanto a produzida pelo condicionamento com ácido fosfórico (PASHLEY et al., 2001). Com isso, condicionamento com ácido fosfórico seletivo em margens de esmalte é a técnica mais aceita para compensar esta limitação (PEUMANS et al., 2010).

Recentemente ainda, um novo tipo de sistema adesivo de frasco único foi introduzido. Esse agente é classificado como universal ou multi-modos, uma vez que pode ser aplicado tanto com a técnica do condicionamento ácido (úmida ou seca) e também com a técnica autocondicionante (HANABUSA et al., 2012). Este novo sistema adesivo vem alcançando resultados ainda não confirmatórios e que sugerem a necessidade de investigações mais amplas (MUÑOZ et al., 2013).

O Adper Single Bond Universal (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) introduziu no mercado o conceito de sistema adesivo universal por permitir ao profissional a escolha da técnica convencional (úmida ou seca) ou autocondicionante. Para possibilitar estas abordagens, apresenta em sua composição a molécula MDP (10-metacriloidecil fosfato dehidrogenado). O MDP é uma molécula orgânica fosfatada e bifuncional capaz de se ligar quimicamente ao substrato dentário (HANABUSA et al., 2012; PERDIGÃO et al., 2012). Ele apresenta em sua molécula: um grupo fotopolimerizável, um grupo hidrofílico e outro grupo hidrofóbico, sendo que uma de suas extremidades une-se aos óxidos, seja do metal ou da cerâmica (alumina ou zircônia), e a outra apresenta grupamentos que se copolimerizam com a matriz resinosa, como é o caso dos *primers* ou do dente, quando o composto está presente na formulação de adesivos. A empresa a desenvolver esse monômero foi a Kuraray Dental no Japão e está presente nas fórmulas dos sistemas adesivos desde 1979. A interação com o conteúdo mineral remanescente se dá pela formação de uma camada nanométrica altamente resistente à degradação química, o que explica os altos valores de longevidade encontrados para estes sistemas adesivos (VAN MEERBEEK et al., 2011)

Além disso, apresenta a possibilidade de escolha para ser utilizado na forma convencional, na qual ocorre o condicionamento prévio com ácido fosfórico ou na forma autocondicionante que dispensa o condicionamento ácido do substrato dentinário, garantindo ao cirurgião-dentista um sistema adesivo mais versátil,

recebendo assim a denominação de universal. Segundo Perdigão et al., 2014 foi constatado, que o comportamento clínico de 18 meses deste sistema adesivo não depende do modo de adesão que foi realizado.

Muñoz et. al. em 2015 compararam sistemas adesivos de uso universal, incluindo o Adper Single Bond Universal nas suas duas versões, convencional e autocondicionante, através da resistência de união para os tempos imediato e após 6 meses. Os respectivos valores foram bastante próximos, variando de 33,3(3,2) a 37,4 (4,6) MPa, demonstrando condições similares independente da técnica e tempo avaliados, o que sugere estabilidade da união obtida. Este desempenho diferiu de outros sistemas universais exatamente por apresentar estabilidade, mesmo que os seus valores não fossem os mais elevados. A justificativa se baseia no fato de que sistemas adesivos universais que contém MDP promovem uma adesão química com a dentina ao longo do tempo (REIS et al., 2009). Esse monômero forma uma nanocamada estável junto com a deposição do sal estável MDP-Ca na interface adesiva, aumentando assim a resistência mecânica (YOSHIDA et al., 2012). Outro forte indício de que este sistema seja interessante em termos de adesão é associado à presença do copolímero do Vitrebond (MUNÓZ et. al., 2015). Este componente já se apresentava no sistema Adper Single Bond e Adper Single Bond 2, entretanto sem a presença do MDP. A associação destes dois componentes tem sido apontado como um fator positivo na obtenção de uma adesão estável.

Entretanto, a presença de MDP na composição de cimentos auto adesivos ou de sistemas adesivo pode levar a uma interação negativa quando associado o uso de CHX, o que pode ser explicado pela formação de aglomerados precipitados na dentina, próxima a interface adesiva. (DI HIPÓLITO et al., 2012; WANG et al., 2013). Os precipitados decorrem, sobretudo quando a concentração de CHX a 2% foi utilizado, potencializando uma condição de pH elevada em contato com a dentina. Esta condição viabiliza a reação do CHX com o fosfato, formando estes precipitados. A estes, alguns autores atribuem o impacto negativo nos valores de resistência de união.

Frente à proposta deste sistema adesivo universal, neste estudo, a adesão de dentina artificialmente desmineralizada será realizada com o modo convencional, uma vez que esta é a condição mais favorável a ação enzimática, o que permitirá melhor avaliação do papel dos inibidores.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi de avaliar o desempenho de um sistema restaurador adesivo universal (modo convencional) associado ao efeito de inibidores proteolíticos na adesão de dentina desmineralizada artificialmente por erosão ou cárie.

As hipóteses nulas testadas foram de que:

1. Não há diferença na resistência de união entre os grupos controle, erodido e cariado;
2. Não há diferença na resistência de união nos grupos associados água ou com os inibidores proteolíticos, clorexidina ou E-64;
3. Não há diferença na resistência de união entre os grupos de 7 dias e 6 meses;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Este estudo in vitro envolveu três fatores de estudo: condição da dentina (normal, erodida ou cariada), tratamento da dentina (água, clorexidina ou E-64) e tempo (7 dias e 6 meses). A variável de resposta principal utilizada é a resistência de união por meio do teste de microtração, com análise das interfaces como método visual complementar.

4.2 Seleção e corte dos corpos-de-prova

O projeto foi inicialmente submetido à apreciação do Comitê de Ética de Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru sendo considerado aprovado (CAAE: 16558913.2.0000.5417) para ser desenvolvido.

Noventa terceiros molares hígidos foram coletados e armazenados em solução supersaturada de timol a 0,1% a temperatura ambiente por um período ideal de no máximo 30 dias.

Os dentes com trincas, rachaduras e/ou outros defeitos foram eliminados e aqueles selecionados foram limpos, retirando qualquer resíduo de tecidos periodontais e gengivais aderidos na superfície dentária com curetas manuais conforme figura 3-A. Após a limpeza dos dentes, estes foram levados na máquina de corte Isomet Low Speed Saw (Buelher Ltd. Lake Bluff, IL, EUA), fixados com cera pegajosa (Asfer, Industria Química Ltda, São Caetano do Sul, SP, Brasil) numa placa de acrílico (figura 3-B). Os cortes foram realizados em sentido mesio-distal no terço oclusal, para remoção de esmalte e exposição de dentina, e também na porção radicular, com disco diamantado dupla face (High concentration diamond, Wafering Blade-102 mm x 0,3mm x 12,7 mm / Excet Corp. Enfield, CT, EUA, Ref. 12205) de 1,3cm), sob irrigação de água deionizada em velocidade de 300 rpm. Na figura 3-C, observa-se o aspecto final do espécime após realização dos cortes, com uma superfície dentinária planificada, com esmalte circundando delimitando a área dentinária.

Figura 3: Preparo da superfície dos espécimes. A- Terceiro molar humano hígido selecionado. B- Fixação do dente. C- Aspecto final do espécime.

4.3 Padronização das superfícies

Para a padronização das superfícies, foram utilizadas lixas de granulação #600 durante 30 segundos em baixa rotação e refrigeração (Poli-triz APL-4 AROTEC, Cotia, SP, Brasil). Esta etapa se refere à criação padronizada artificial de smear layer. Após esta etapa, os espécimes foram levados no ultrassom para eliminar restos de tecido dentinário e lixa da superfície (Ultrasonic Cleaner Mod. USC 750, Unique Ind. E Com. Produtos Eletrônicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil).

4.4 Fase experimental in vitro

Considerando os fatores em análise, os grupos compostos testados estão apresentados no quadro 1.

Quadro 1- Distribuição dos grupos testados

Grupos	Protocolo pré-tratamento	Substrato	Tratamento	Tempo
N-A-I	Conservado em saliva artificial por 7 dias a 37°C	Normal	Água	7 dias
N-CHX-I			Clorexidina	
N-E-64-I			E-64	
N-A-6			Água	6 meses
N-CHX-6			Clorexidina	
N-E-64-6			E-64	
ERO-A-I	A cada 24 horas, 03 ciclos de imersão de 5 minutos em suco de laranja industrializado foram realizados, durante um período de 5 dias. Entre os ciclos diários, os espécimes foram armazenados em saliva artificial	Erodido	Água	7 dias
ERO-CHX-I			Clorexidina	
ERO-E-64-I			E-64	
ERO-A-6			Água	6 meses
ERO-CHX-6			Clorexidina	
ERO-E-64-6			E-64	
CA-A-I	A cada 24 horas, os espécimes foram armazenados por 6 horas em solução desmineralizante + 18 horas em solução remineralizante, durante um período de 05 dias. Nas 48 horas seguintes, foram armazenados em saliva artificial, totalizando 7 dias	Cariado	Água	7 dias
CA-CHX-I			Clorexidina	
CA-E-64-I			E-64	
CA-A-6			Água	6 meses
CA-CHX-6			Clorexidina	
CA-E-64-6			E-64	

N= normal; ERO= erodido; CA= cariado; A= Água, CHX= clorexidina; I= tempo inicial considerado (7 dias) e 6= tempo de 6 meses.

Os dentes com as superfícies padronizadas foram aleatorizadas em 9 grupos, considerando o substrato (normal, erodido e cariado) e os tratamentos água, clorexidina e E-64) a serem empregados.

4.4.1 Indução de lesão erosiva e lesão de cárie artificiais em dentina

Os blocos obtidos foram induzidos para a formação de lesões artificiais de erosão ou de cárie, conforme a descrição do quadro 2.

Quadro 2- Constituição química das soluções

Grupo	Agentes de desafio	Constituição	pH
Normal	Saliva artificial*	1,5mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,9mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 150mM KCl, 0,1 mol/l Tampão tris, 0,03 ppmF. (1,1 mL de solução/ mm^2)	7,0
Erodido	Suco de laranja (Suco Del Valle do Brasil, Coca Cola, Americana, SP, Brasil)	Água, açúcar, suco concentrado de laranja, aroma natural, acidulante ácido cítrico e antioxidante ácido ascórbico	3,2
Cariado	DES-RE* (ciclagem)	<u>Solução desmineralizante:</u> 2,0mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 2,0mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,075mM, tampão de acetato, 0,02 ppmF	4,0
		<u>Saliva artificial:</u> 1,5mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,9mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 150mM KCl, 0,1 mol/l Tampão tris, 0,03 ppmF.	7,0

* Essas soluções foram preparadas em condições padronizadas no laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru- FOB-USP.

Para a indução a formação de lesões erosivas foi utilizado o suco de laranja industrializado Suco Del Valle do Brasil, Coca-Cola, Americana, SP, Brasil. A escolha por suco industrializado está na facilidade do uso e da representatividade de seu consumo pela população (WANG et al., 2011; GIACOMINI et al., 2012).

Para a indução de lesão de cárie artificial, a reprodução foi através da ciclagem de pH por 7 dias, seguindo a descrição de VIEIRA et al. (2005). Durante 5 dias, as amostras foram imersas em solução desmineralizante por 6 horas e solução remineralizante (saliva artificial) por 18 horas. Nos últimos 2 dias, as amostras foram mantidas apenas em solução remineralizante (saliva artificial). A cada 24 horas, as soluções foram renovadas.

4.5 Tratamento restaurador adesivo

Os dentes foram tratados de acordo com o uso ou não dos respectivos inibidores enzimáticos, conforme o quadro 3.

Quadro 3 – Protocolo de aplicação dos inibidores enzimáticos

Grupos	Tratamento da Dentina
Água	Ácido fosfórico 37% por 15s, lavagem com água por 20 segundos, secagem da superfície dentinária com papel absorvente, aplicação do sistema adesivo (Adper Single Bond Universal, com aplicação de duas camadas de adesivo de forma ativa, evaporação do solvente e fotoativação por 10 segundos, segundo o fabricante)
Clorexidina	Ácido fosfórico 37% por 15s, lavagem com água por 20 segundos, secagem da superfície dentinária com papel absorvente, aplicação de digluconato de clorexidina 2% por 60s, secagem com papel absorvente, aplicação do sistema adesivo (Adper Single Bond Universal, com aplicação de duas camadas de adesivo de forma ativa, evaporação do solvente e fotoativação por 10 segundos, segundo o fabricante)
E-64	Ácido fosfórico 37% por 15s, lavagem com água por 20 segundos, secagem da superfície dentinária com papel absorvente, aplicação de E-64 a 5μM por 60s, secagem com papel absorvente, aplicação do sistema adesivo (Adper Single Bond Universal, com aplicação de duas camadas de adesivo de forma ativa, evaporação do solvente e fotoativação por 10 segundos, segundo o fabricante)

Após os desafios propostos, o substrato dentinário de todos os grupos foi condicionado com ácido fosfórico a 37% por 15 segundos e lavados por 20 segundos com água (figura 4-A). Após a lavagem com água, foi realizada a aplicação de água ou de um dos inibidores enzimáticos (CHX e E-64) seguindo o mesmo protocolo: aplicação de 10 μL por 60s e remoção dos excessos com papel absorvente (figura 4-B). Nos grupos nos quais foram utilizada a Clorexidina (N-CHX, CA-CHX E ERO-CHX) foi aplicada a solução aquosa de digluconato de clorexidina a 2% por 60 segundos e secos com papel absorvente, após a aplicação com ácido, seguida pela lavagem com água. Nos grupos tratados com E-64 (N-E-64, CA-E-64 E

ERO-E-64), foi aplicada a solução de E-64 na concentração de 5µM por 60 segundos e secos com papel absorvente, após a aplicação do ácido seguida de lavagem. Informações sobre os produtos utilizados para o preparo das soluções inibidoras estão no quadro 4.

Quadro 4- Informações sobre as fontes primárias para o preparo das soluções inibidoras proteolíticas*

Características	Digluconato de clorexidina	E-64
Fabricante	Sigma	Sigma
Fonte inicial	Preparada a partir da solução de 20%, Sigma	Preparada a partir do pó
Aparência	Líquido, levemente amarelado.	Pó branco, sendo recomendado o preparo da solução de estoque aquosa de 1 mM
Fórmula molecular	C22 H30 Cl2 N10. 2 C6 H12 O7	C15 H27 N5 O5
Peso molecular	897,8	357,4
Solubilidade em água	Sim	Sim

*Informações fornecidas pelo fabricante

O sistema adesivo Adper Single Bond Universal foi aplicado em 2 camadas de forma ativa por 20 segundos (figura 4-C), evaporada gentilmente por 5 segundos e fotoativada por 10 segundos. A composição deste sistema é apresentado no quadro 5.

Quadro 5- Composição do sistema adesivo utilizado

SISTEMA ADESIVO	COMPOSIÇÃO
Adper Single Bond Universal	Metacriloiloxidecil dihidrogênio fosfato, dimetacrilatos, 2-Hidroxi-etilmetacrilato, copolímero de ácido polialcenóico modificado por metacrilato, carga, etanol, água, iniciadores, silano.

* Informações fornecidas pelo fabricante

Para cada espécime, dois incrementos de 2mm de espessura de resina composta (Filtek Z350, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA, cor A2) (figura 4-D) foram inseridos e fotoativados por 20 segundos cada um. Na figura 4-E apresenta o aspecto final do espécime após o procedimento restaurador.

Figura 4: Tratamento restaurador adesivo. A- Condicionamento com ácido fosfórico 37% B- Aplicação de água ou dos inibidores enzimáticos (CHX e E-64). C- Aplicação do sistema adesivo. D- Inserção da resina composta. E- Espécime finalizado.

4.6 Teste de microtração

O conjunto fragmento dente-resina foi levado à máquina de corte, fixado com cera pegajosa, seccionado no sentido vestibulo-lingual para a obtenção de fatias de 0,8 mm de espessura. Após a obtenção dessas fatias, essas são fixadas novamente com cera pegajosa e realiza-se uma secção no sentido méso-distal obtendo-se palitos em torno de 0,8 mm de espessura (figura 5-A). Dessa forma, foram obtidos diversos espécimes constituídos de resina composta e dentina, denominados palitos, unidos pela interface adesiva com área de secção transversal de aproximadamente $0,64 \text{ mm}^2$. Para cada grupo, um terço dos palitos foram aleatorizados para serem testados após 7 dias e o restante armazenado para que fossem testados em 6 meses. Semanalmente, a renovação de saliva artificial é realizada.

Os palitos foram individualmente fixados com adesivo a base de cianocrilato (Loctite Super Bonder gel control, Henkel Ltda, São Paulo, SP, Brasil) pelas extremidades ao dispositivo do tipo Bencor para realização do teste de microtração (figura 5-B) na máquina de ensaios universais Instron (Modelo 3342, Instron Corp., Canton, MA, EUA). Estes foram testados sob força de tração perpendicular à interface adesiva a uma velocidade de 0,5 mm/min até a ruptura do espécime. Após a fratura, os espécimes foram removidos do dispositivo de ensaio utilizando uma lâmina de bisturi nº 12 e armazenados em uma tabela com as suas especificações para posterior análise em microscópio óptico. A área de seção transversal foi medida com um paquímetro digital (Digimess, Panamba Industrial e Técnica S/A, São Paulo, SP, Brasil) até uma aproximação de 0,01mm.

A tensão necessária para causar ruptura dos espécimes foi determinada pela razão entre a carga (Kgf) no momento da fratura e a área da seção transversal do espécime em cm^2 . Os valores obtidos foram convertidos em MPa.

Figura 5: Teste de microtração. A- Palitos com 64mm² B- Palito fixado no dispositivo tipo Bencor

4.7 Análise de modo de fratura da interface

As superfícies fraturadas de ambos os segmentos foram analisados com o auxílio de um microscópio óptico digital (Dino-Lite Digital Microscope®; AnMo Eltronics Corp, New Taipei City, San-Chung District, Taiwan) com 40x de aumento para determinação do padrão de fratura:

1. Tipo adesiva: quando a fratura ocorreu na interface adesiva;
2. Tipo coesiva em dentina: quando a fratura ocorreu no substrato dentário (dentina);
3. Tipo coesiva em resina composta: quando a fratura ocorreu no material restaurador (resina composta);
4. Tipo mista: fratura adesiva e coesiva;

4.8 Análise Estatística

Para empregar o teste estatístico mais adequado aos dados obtidos, um teste de normalidade da distribuição amostral, verificando a aderência à curva normal foi realizado. O teste de Análise de Variância a três critérios e análise de comparações múltiplas Tukey foram aplicados, com nível de significância de 0,05.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os fatores substrato, tratamento e tempo foram estatisticamente significantes ($p < 0,0001$). Na análise das interações, houve significância entre substrato e tratamento ($p = 0,0011$) e entre substrato e tempo ($p = 0,0003$). As demais interações não foram significantes.

As tabelas 1 e 2 apresentam os valores de média e desvio padrão em MPa da resistência de união à dentina das condições testadas, considerando as interações detectadas.

Tabela 1- Valores de média (MPa) e desvio padrão das condições testadas, considerando a interações entre substrato e tratamento.

SUBSTRATO	TRATAMENTO	Média $\pm$ desvio padrão
Normal	ÁGUA	31,39 $\pm$ 6,57 A
	CHX	22,43 $\pm$ 7,79 C
	E-64	24,57 $\pm$ 5,95 BC
Erodido	ÁGUA	27,96 $\pm$ 5,12 AB
	CHX	21,33 $\pm$ 4,73 CD
	E-64	28,97 $\pm$ 5,93 AB
Cariado	ÁGUA	21,85 $\pm$ 4,49 CD
	CHX	17,41 $\pm$ 3,74 D
	E-64	22,66 $\pm$ 4,40 C

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre as condições testadas ($p < 0,05$)

Na análise da tabela 1, observa-se que a condição de substrato normal tratado com água (grupo controle) apresentou os maiores valores de resistência de união. Esta condição foi similar aos valores observados para a condição erodido tratado com água e erodido tratado com E-64. Estas duas últimas condições também foram estatisticamente similar ao substrato normal tratado com E-64. Por sua vez, esta última condição foi estatisticamente similar ao substrato normal tratado com clorexidina, erodido tratado com clorexidina, cariado tratado com água e com E-64. A condição que demonstrou menor valor foi o substrato cariado tratado com

clorexidina, não sendo diferente das condições de substrato erodido tratado com clorexidina e cariado tratado com água.

Tabela 2- Valores de media (MPa) e desvio padrão das condições testadas, considerando a interações entre substrato e tempo.

SUBSTRATO	TEMPO	Média $\pm$ desvio padrão
Normal	Imediato	30,67 $\pm$ 6,31 A
	6 meses	21,58 $\pm$ 6,23 CD
Erodido	Imediato	27,54 $\pm$ 6,35 AB
	6 meses	24,64 $\pm$ 5,83 BC
Cariado	Imediato	22,08 $\pm$ 5,00 CD
	6 meses	19,19 $\pm$ 4,09 D

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre as condições testadas ($p < 0,05$)

A partir da tabela 2 observa-se que o maior valor de resistência de união foi verificado no tempo imediato para a condição de substrato normal, estatisticamente similar à condição do substrato erodido testado no tempo imediato. Esta situação não diferiu estatisticamente do substrato erodido e testado após 6 meses, que por sua vez também foi estatisticamente similar às condições normal após 6 meses e cariado imediato. Estas duas últimas condições também foram estatisticamente similares à condição de cariado testado após 6 meses, que revelou o menor valor de resistência de união.

Tabela 3- Valores em porcentagem dos modos de fratura considerando o substrato normal

	Adesiva	Mista	Coesiva em resina	Coesiva em dentina	Total
N-A-I	50,00%	46,43%	3,57%	0,00%	100,00%
N-CHX-I	60,71%	39,29%	0,00%	0,00%	100,00%
N-E-64-I	46,43%	50,00%	3,57%	0,00%	100,00%
N-A-6	42,86%	50,00%	3,57%	3,57%	100,00%
N-CHX-6	53,85%	46,15%	0,00%	0,00%	100,00%
N-E-64-6	44,00%	52,00%	4,00%	0,00%	100,00%

Tabela 4- Valores em porcentagem dos modos de fratura considerando o substrato erodido

	Adesiva	Mista	Coesiva em resina	Coesiva em dentina	Total
ERO-A-I	46,15%	50,00%	3,85%	0,00%	100,00%
ERO-CHX-I	61,54%	38,46%	0,00%	0,00%	100,00%
ERO-E-64-I	42,85%	57,15%	0,00%	0,00%	100,00%
ERO-A-6	53,57%	46,43%	0,00%	0,00%	100,00%
ERO-CHX-6	61,54%	38,46%	0,00%	0,00%	100,00%
ERO-E-64-6	53,57%	46,43%	0,00%	0,00%	100,00%

Tabela 5- Valores em porcentagem dos modos de fratura considerando o substrato cariado

	Adesiva	Mista	Coesiva em resina	Coesiva em dentina	Total
CA-A-I	46,43%	50,00%	3,57%	0,00%	100,00%
CA-CHX-I	48,15%	51,85%	0,00%	0,00%	100,00%
CA-E-64-I	48,15%	48,15%	3,70%	0,00%	100,00%
CA-A-6	57,70%	42,30%	0,00%	0,00%	100,00%
CA-CHX-6	56,00%	44,00%	0,00%	0,00%	100,00%
CA-E-64-6	40,00%	56,00%	4,00%	0,00%	100,00%

As fraturas do tipo adesivas e mista foram predominantes em todos os grupos Independente da condição do substrato, tratamento e tempo testados, validando o teste de microtração realizado.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Na Odontologia adesiva, a habilidade duradoura de uma adesão efetiva ao longo do tempo é um grande desafio, apesar de importantes conquistas terem sido alcançadas (PASHLEY et al., 2011). Este trabalho envolveu a simulação de substratos dentários comumente afetados clinicamente e o impacto do uso de inibidores enzimáticos na adesão à dentina, comparados por meio da resistência de união. Uma vez que o tempo é um fator relevante nesta perspectiva, também tornou-se um fator de análise.

Os resultados sugerem uma diferença de comportamento em relação ao tipo de substrato, sendo que o substrato controle, sem sofrer nenhuma simulação de desafio, apresentou os maiores valores de resistência de união. A grande parte dos estudos utiliza o substrato dentinário hígido para a compreensão do mecanismo envolvido na degradação hidrolítica da camada híbrida (CARRILHO et al., 2007a, CARRILHO et al., 2007b, BRESCHI et al., 2009, LOGUERCIO et al., 2009). Entretanto, na grande parte da rotina clínica, a dentina sofre alterações decorrentes de lesões de cárie (KOMORI et al., 2009; MOHAMED et al., 2014) e erodida (FRANCISCONI-DOS-RIOS et al., 2014). O entendimento de que a degradação desta camada ocorre por motivos relacionados tanto ao material resinoso quanto ao aspecto biológico da própria matriz dentinária tem permitido estratégias diversificadas, à luz dessas duas frentes simultaneamente.

Considerando o fator substrato, tem-se que a condição hígida representa um parâmetro de comparação, visto que este substrato não sofreu nenhum tipo de desafio. Já nas condições erodida e cariada, há modificações estruturais dentárias que podem interferir no processo adesivo (KOMORI et al., 2009; FRANCISCONI-DOS-RIOS et al., 2014; MOHAMED et al., 2014).

O mecanismo da erosão dentária atua em duas fases, provocando inicialmente a perda mineral em camadas, resultando em um amolecimento seguido de um desgaste. Na simulação desta condição, o substrato demonstrou, em algumas situações, valores similares ao substrato normal. A dentina erodida sofre essencialmente desmineralização (FRANCISCONI-DOS-RIOS et al., 2014; GANSS

et al., 2014), além de haver evidências de que a matriz orgânica também sofra alterações, sem entretanto produzir modificações mais consistentes que a degradem como ocorre no processo cariioso. Ainda nesta condição. Há de se considerar que este cenário é provavelmente decorrente pelo fato de que os minerais compõe em 47% por volume deste tecido. Esta deposição é mais intensa na região peritubular, onde espera-se que o componente ácido tenha maior ação. Ainda faltam evidências que demonstrem a ação do processo erosivo na matriz de colágeno (KINNEY et al., 1995; BRESCHI et al., 2002; GANSS et al., 2014). O impacto na matriz orgânica, que compõe 33% em volume da dentina, ainda não está totalmente elucidada, mas as observações clínicas diferenciadas das dentina cariada e erodida sugerem uma maior degradação para a dentina cariada (GANSS et al., 2014). Neste trabalho, a erosão foi simulada com o suco de laranja, uma vez que esta bebida é considerada uma das mais agressivas no potencial erosivo (DE CARVALHO et al., 2011). O intuito foi de provocar uma situação condizente com o que ocorre clinicamente (WANG et al., 2014).

Frente aos resultados referentes ao substrato cariado, estes apresentaram maior comprometimento de união. Diferente da dentina erodida, na dentina cariada, além da perda mineral, há evidências na degradação do colágeno (KOMORI et al., 2009). A cárie artificial em dentina pode ser laboratorialmente promovida por diferentes protocolos (VIEIRA et al., 2005; MORON et al., 2013). A simulação por meio da ciclagem DES-RE é uma das mais empregadas (VIEIRA et al., 2005) e foi utilizada no presente estudo.

Uma vez que o estabelecimento da camada híbrida entrelaça a trama de colágeno, a sua degradação pode impactar na união. Desta forma, os resultados observados para as três condições de substrato estudadas estão em concordância o suporte que a literatura apresenta (KOMORI et al., 2009, FRANCISCONI-DOS-RIOS et al., 2014; MOHAMED et al., 2014), negando a primeira hipótese nula.

Em relação às características da matriz dentinária, a descoberta da participação das enzimas proteolíticas intrínsecas da dentina levou à busca de agentes inibidores como um dos direcionamentos principais na busca pela durabilidade adesiva (NASCIMENTO et al., 2011; SCAFFA et al., 2012, FRANCISCONI-DOS-RIOS et al., 2014).

Com base nos resultados deste trabalho, observa-se em uma primeira análise, que a clorexidina, considerada o principal agente de inibição coadjuvante dos procedimentos adesivos, demonstrou exercer um papel negativo. Este resultado deve ser interpretado conjuntamente com a composição do sistema adesivo empregado neste estudo. Nos principais trabalhos que verificaram o efeito positivo da clorexidina, o adesivo empregado foi geralmente um convencional com a presença de HEMA e BisGMA como monômeros resinosos principais (BRESCHI et al., 2009; LOGUERCIO et al., 2009; FRANCISCONI-DOS-RIOS et al., 2014). Além disso, sabe-se que o efeito da CHX é dose-dependente. (GENDRON et al., 1999), consequentemente, a concentração de 2% utilizada neste estudo, pode ser uma das possíveis explicações, juntamente, com a composição do sistema adesivo para estes resultados inicialmente inesperados.

Para estabelecer este raciocínio, devemos considerar a ação dos diferentes tratamentos propostos. Na dentina normal, o uso dos inibidores de atividade proteolítica reduziu a resistência de união significativamente, comparativamente ao uso da água. Os dados de uma análise imediata para esta observação é interessante, pois desde o início, sugere-se uma interação destes inibidores com o substrato normal no processo adesivo, reforçando que o adesivo propriamente dito pode apresentar características que influenciem.

Após 6 meses, o mesmo padrão foi observado. Geralmente, existe uma expectativa de que não ocorra uma interferência imediata, para que a ação desejável de se prolongar a qualidade da camada híbrida não seja de alguma forma prejudicada no início. Entretanto, em uma comparação a outros estudos que utilizaram a clorexidina para averiguar a imediata resistência de união à dentina sadia, os dados dos grupos tratados com clorexidina são similares aos encontrados no presente estudo (KOMORI et al., 2009; FRANCISCONI-DOS-RIOS et al., 2014; ZHENG et al., 2014). Ao se considerar a composição do sistema adesivo utilizado neste trabalho, observa-se a presença do metacriloiloxidecil dihidrogênio fosfato (MDP). Trabalhos prévios tem sugerido de forma consistente que sistemas adesivos e cimentos resinosos que apresentam este componente ou monômeros ácidos a base de fosfato sofrem interação negativa (DI HIPÓLITO et al., 2012; WANG et al., 2013). Di Hipólito et al. 2012 demonstraram a formação de acúmulo de precipitados nesta região, podendo ser responsáveis por este desempenho. Estes depósitos se

acumulam próximo da interface, sugerindo que haja uma reação com o grupo fosfato. Outro fator que sugere mais fortemente esta interferência a observação de que a associação com a clorexidina a 2% resultou em maior quantidade de precipitação paralelamente a maior redução de resistência de união, comparativamente ao emprego da clorexidina 0,2%. Em ambas as situações, o uso da água apresentou melhores resultados iniciais. Na literatura, ainda não há dados suficientes com o uso de E-64 com este propósito, limitando esta comparação no momento.

No presente estudo, na dentina erodida, a clorexidina novamente apresentou valores inferiores de resistência de união comparada aos grupos tratados com água, o que não ocorreu com o uso do E-64, que se mostrou similar ao grupo erodido tratado com água. Na comparação dos tratamentos para o substrato cariado, nenhum dos inibidores diferiu do grupo tratado com água. Porém, a clorexidina resultou em resistência de união inferior ao promovido pelo E-64, reforçando mais uma vez a provável interferência da clorexidina com o sistema adesivo, negando a segunda hipótese nula.

Enfatizando um desempenho adequado imediato do E-64 na resistência de união, apenas neste grupo, os valores foram similares independente da condição do substrato. Desta forma, este agente parece não sofrer a incompatibilidade evidenciada na associação da clorexidina.

Nos grupos tratados com água e com clorexidina, o grupo com menor resistência de união foi evidenciada nos grupos cariados. Estas observações sugerem que haja uma interação das enzimas ativadas no substrato cariado, como as MMPs e CTs que tem sido fortemente reportadas na literatura (VIDAL et al., 2014). Há uma quantidade associada de enzimas proteolíticas muito mais expressiva em substrato dentinário cariado (VIDAL et al., 2014). Também ressalta-se que a CT-K age em condição ácida o que pode favorecer a degradação de forma mais intensa.

Considerando, a interação entre substrato e tratamento, o uso de inibidores enzimáticos, tanto a clorexidina quanto o E-64, afetou negativamente a resistência de união para o substrato normal. Para o substrato erodido, este efeito somente se revelou negativo quando a clorexidina foi empregada, não diferindo quando a água

ou o E-64 foram utilizados. No substrato cariado, a clorexidina também afetou negativamente a resistência de união, não diferindo da condição tratada com água.

O acompanhamento ao longo do tempo, por meio de um processo de envelhecimento contribui com maiores elucidações (KOMORI et al., 2009, ZHENG et al., 2014; MONTAGNER et al., 2014) e desta forma, foi realizado um acompanhamento da resistência de união por 6 meses.

Na análise comparativa do tempo para cada substrato testado, apenas na condição normal, os valores reduziram do tempo imediato ao de 6 meses. Para os substratos erodido e cariado, os valores de resistência de união foram similares para os tempos imediato e de 6 meses. Estas observações podem sugerir que em substratos alterados, há a perspectiva de que o uso de inibidores seja interessante para conter a velocidade de redução da resistência de união, embora inicialmente seus valores já sejam reduzidos, negando dessa forma a terceira hipótese nula.

O sistema adesivo universal Adper Single Bond Universal tem apresentado perspectivas interessantes em sua atuação, sendo sugerido uma interação entre o papel do copolímero de Vitrebond presente na sua formulação com o monômero MDP e que potencializa a união ao substrato (MUNÕZ et al., 2015).

Embora seja atualmente considerado uma evolução técnica, os sistemas adesivos universais devem ainda ser empregado com cautela quando associado aos inibidores enzimáticos. Se por um lado a compreensão cada vez mais aprofundada da participação das proteases tem sido obtida, permitindo o aprimoramento de agentes eficazes, biocompatíveis e exequíveis tecnicamente, por outro lado, o desenvolvimento de materiais está sendo conduzido para conciliar desempenho adequado para a união ao substrato à prática no seu emprego. Estas interações tem sido a base para a contínua busca por uma união estável do material restaurador aos substratos dentários, diante dos desafios no meio bucal.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

O sistema restaurador adesivo universal (modo convencional) associado ao efeito de inibidores proteolíticos na adesão de dentina desmineralizada artificialmente por cárie ou erosão apresenta comportamento distinto de acordo com o pré-tratamento. O substrato cariado apresentou impacto negativo na resistência de união à dentina comparativamente aos substratos normal e erodido;

A clorexidina apresentou, para os três substratos avaliados, uma redução na resistência de união quando associado ao sistema adesivo universal, o que não ocorreu com o E-64.

Para todas as condições estudadas, o tempo de 6 meses demonstrou que a degradação ocorre independentemente da condição de substrato e de tratamento.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALMAHDY A. et al. Effects of MMP inhibitors incorporated within dental adhesives. **J Dent Res**, Thousand Oaks, v. 91, n. 6, p. 605-611, Jun. 2012.

ARENDS J.; DIJKMAN T.; CHRISTOFFERSEN J. Average mineral loss in dental enamel during demineralization. **Caries Res**, Basel, v. 21, n.3, p. 249-254, 1987.

BALOOCH M. et al. Mechanical properties of mineralized collagen fibrils as influenced by demineralization. **J Struct Biol**, San Diego, v.162, n.3, p 404-410, Jun. 2008

BARBOUR M. E. et al. Enamel dissolution in citric acid as a function of calcium and phosphate concentrations and degree of saturation with respect to hydroxyapatite. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v. 111, p. 428–433, Oct. 2003.

BARTLETT D.; GANSS C.; LUSSI A. Basic erosive wear examination (BEWE): a new scoring system for scientific and clinical needs. **Clin Oral Investig**, Berlin, v. 12, n. 1, p. S65-S68, Mar. 2008. Supplement 1

BERTASSONI L. E. et al. Mechanical recovery of dentin following remineralization in vitro--an indentation study. **J Biomech**, New York, v. 44, n. 1, p. 176-181, Jan. 2011.

BERTASSONI L. E.; STANKOSKA K; SWAIN M. V. Insights into the structure and composition of the peritubular dentin organic matrix and the lamina limitans. **Micron**, Oxford, v. 43, n. 2-3, p. 229-236, Feb. 2012a.

BERTASSONI L. E. et al. The dentin organic matrix - limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale. **Acta Biomater**, Kidlington, v.8 n. 7, p. 2419-2433, Jul. 2012b.

BOILLAGGUET S. et al. Bond strength of composite to dentin using conventional, one step, and self-etching adhesive systems. **J Dent**, Kidlington, v. 29, n.1, p. 55–61, Jan. 2001.

BRESCHI L. et al. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. **J Adhes Dent**, New Malden, v. 11, n. 3, p. 191-198, Jun. 2009.

BRESCHI L. et al. High resolution SEM evaluation of dentin etched with maleic and citric acid. **Dent Mater**, Copenhagen, v. 18, n. 1, p. 26-35, Jan. 2002.

CARRILHO M. R. et al. Durability of resin-dentin bonds related to water and oil storage. **Am J Dent**, San Antonio, v. 18, n. 6, p.315-319, Dec. 2005.

CARRILHO M. R. et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. **J Dent Res**, Thousand Oaks, v. 86, n. 1, p. 90-94, Jan. 2007a.

CARRILHO M. R. et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. **J Dent Res**, Thousand Oaks, v. 86, n. 6, p. 529-533, Jun. 2007b.

CASAS-APAYCO L. C. et al. Erosive cola-based drinks affect the bonding to enamel surface: an in vitro study. **J Appl Oral Sci**, Bauru, Jun. 2014. In press

CARVALHO FILHO A. C. et al. Energy dispersive X-ray spectrometry study of the protective effects of fluoride varnish and gel on enamel erosion. **Miscrosc Res Tech**, New York, v. 74, n. 9, p. 839-844, Sep. 2011.

DEMEULE M. et al. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1478, n. 1, p. 51-60, Mar. 2000.

DI HIPÓLITO V. et al. Effectiveness of self-adhesive luting cements in bonding to chlorhexidine-treated dentin. **Dent Mater**, Copenhagen, v. 28, n. 5, p. 495-501, May. 2012.

FEATHERSTONE J. D. B. Modeling the caries – inhibitory effects of dental materials. **Dent Mater**, Copenhagen, v. 12, n. 3, p. 194-197, May. 1996.

FEJERSKOV O.; KIDD E. **Cárie Dentária: a doença e seu tratamento clínico**. 1 ed. São Paulo: Editora Santos 2005. 352 p.

FRANCISCONI-DOS-RIOS L. F. et al. Chlorhexidine does not improve but preserves bond strength to eroded dentin. **Am J Dent**; San Antonio, 2014. In press

FRANCISCONI L. F. et al. Effect of erosive pH cycling on different restorative materials and on enamel restored with these materials. **Oper Dent**, Seattle, v. 33, n. 2, p. 203-208, Mar-Apr. 2008.

GANSS C.; LUSSI A.; SCHLUETER N.; The histological features and physical properties of eroded dental hard tissues. **Monogr Oral Sci**, Basel, v. 25, p. 99-107, Jun. 2014.

GARCIA F. C. et al. Influences of surface and solvent on retention of HEMA/mixture components after evaporation. **J Dent**, Kidlington, v. 38, n. 1, p. 44-49, Jan. 2010.

GARNERO P. et al. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 273, n. 48, p. 32347–32352, Nov. 1998.

GARONE FILHO W.; SILVA V. A. **Lesões não cariosas** – o novo desafio da odontologia. 1ª ed. São Paulo: Editora Santos; 2008. 274 p.

GENDRON R. et al. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. **Clin Diagn Lab Immunol**, Washington, v. 6, n. 3, p. 437-439, May. 1999.

GIACOMINI M. C. **Avaliação in situ/ex vivo da resistência adesiva ao esmalte bovino previamente erodido por suco de laranja industrializado utilizando diferentes sistemas adesivos**. 2012. 63 p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2012.

HAIJ-ALI R. et al. Histomorphologic characterization of noncarious and caries-affected dentin/adhesive interfaces. **J Prosthodont**, Philadelphia, v. 15, n. 2, p. 82-88, Mar-Apr. 2006.

HANABUSA M. et al. Bonding effectiveness of a new “multi-mode” adhesive to enamel and dentine. **J Dent**, Kidlington, v. 40, n. 6, p. 475-484, Jun. 2012.

HANNAS A. R. et al. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. **Acta Odontol Scand**, Stockholm, v. 65, n. 1, p. 1-13, Feb. 2007.

Hanada, K. et al. **Agric Biol Chem**, Tokyo, v. 42, p. 529–536, 1978.

HARA A.T. et al. Influence of the organic matrix on root dentine erosion by citric acid. **Caries Res**, Basel, v. 39, n. 2, p. 134-138, Mar-Apr. 2005.

HASHIMOTO M. et al. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. **J Dent Res**, Thousand Oaks, v. 79, n. 6, p. 1385-1391, Jun. 2000.

HEBLING J. et al. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. 2005; **J Dent Res**, Thousand Oaks, v. 84, n. 8, p. 741-746, Aug. 2005.

HUYSMANS, M. C.; CHEW, H.P.; ELLWOOD, R.P. Clinical studies of dental erosion and erosive wear. **Caries Res**, v.45, p. 60-68, 2011. Supplement 1.

HONÓRIO H. M. et al. Effects of erosive, cariogenic or combined erosive/cariogenic challenges on human enamel: an in situ/ex vivo study. **Caries Res**, Basel, v. 42, n. 6, p. 454-459, Oct. 2008a.

HONÓRIO H. M. et al. Effect of prolonged erosive pH cycling on different restorative materials. **J Oral Rehabil**, Oxford, v. 35, n. 12, p. 947-953, Dec. 2008b.

IMFELD T. Prevention of progression of dental erosion by professional and individual prophylactic measures. **Eur J Oral Sci**, Chichester, v. 104 n. 2 (Pt 2), p. 215-220, Apr. 1996.

JENSDOTTIR T. et al. Immediate erosive potential of cola drinks and orange juices. **JDent Res**, Thousand Oaks, v. 85, n. 3, p. 226–230, Mar. 2006.

KATO M. T. et al. Effect of iron on matrix metalloproteinase inhibition and on the prevention of dentine erosion. **Caries Res**, Basel, v. 44, n. 3, p. 309-316, Jun. 2010.

KIDD E. The implications of the new paradigm of dental caries. **J Dent**, Kidlington, v 39, n. 2, p. 3-8, Dec. 2011. Supplement 2

KINNEY, J.H. et al. Mineral distribution and dimensional changes in human dentin during demineralization. *Cysteine cathepsins in human carious dentin*, v. 74, n. 5, p. 1179-1184, May. 1995

KOULOURIDES T: **Experimental changes of mineral density**; in Harris RS(ed): Art and science of Dental Caries Research. Nova York, Academic Press, p.355-378, 1968.

KOMORI P. C. et al. Effect of 2% chlorhexidine digluconate on the bond strength to normal versus caries-affected dentin. **Oper Dent**, Seattle, v. 34, n. 2, p. 157-165, Mar-Apr. 2009.

LINDBLAD R. M. et al. One year effect of chlorhexidine on bonding of fibre-reinforced composite root canal post to dentine. **J Dent**, Kidlington, v. 40, n. 9, p. 7187-7222, Sep. 2012.

LOGUERCIO, A. D. A. et al. Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin bond strength durability. **Eur J Oral Sci**, Chichester, v. 117, n. 5, p. 587-596, Oct. 2009.

LÜHRS A. K. et al. Does inhibition of proteolytic activity improve adhesive luting? **Eur J Oral Sci**, Chichester, v. 121, n. 2, p. 121-131, Apr. 2013.

LUSSI A.; GANSS C. **Erosive tooth wear**: from diagnosis to therapy. Ed. Karger. v. 20. 2014.

LUSSI, A. et al. Impact of different toothpastes on the prevention of erosion. **CariesRes**, Basel, v. 42, n. 1, p. 62-67, 2008.

LUSSI, A. et al. Dental erosion. **Oper Dent**, Seattle, v. 34, n. 3, p. 251-262, 2009

LUSSI, A. et al. Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. **Caries Res**, Basel, v. 45, p. 2-12, 2011 Supplement 1.

LYNCH R. J.; MONY U.; TEN CATE J. M.; Effect of lesion characteristics and mineralizing solution type on enamel remineralization in vitro. **Caries Res**, Basel, v. 41, n 4, p 257-262, 2007.

LYNCH R. J.; TEN CATE J. M.; The effect of lesion characteristics at baseline on subsequent de- and remineralisation behaviour. **Caries Res**, Basel, v. 40, n. 6, p. 530-535, 2006.

MAGALHÃES, A. C. et al. Comparison of cross-sectional hardness and transverse microradiography of artificial carious enamel lesions induced by different demineralising solutions and gels. **Caries Res**, Basel, v. 43, n. 6, p. 474-483, 2009a.

MAGALHÃES, A. C. et al. Insights into preventive measures for dental erosion. **J Appl Oral Sci**, Bauru, v. 17, n. 2, p. 75-86, Mar-April 2009b.

MARCHESI, G. et al. Adhesive performance of a multi-mode adhesive system: 1-year in vitro study. **J Dent**, Kidlington, v. 42, n. 5, p. 603-612, May 2014.

MARQUEZAN M. et al. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 54, n. 12, p. 1111-1117, Dec. 2009.

MARSHALL, G.W. JR. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. **J Dent**, Kidlington, v. 25, n. 6, p. 441-458, Nov. 1997.

MATSUMOTO, K. et al. Structural basis of inhibition of cysteine proteases by E-64 and its derivatives. **Biopolymers**, New York, v. 51, n. 1, p. 99-107, 1999.

MAZZONI, A. et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 27, n. 25, p. 4470-4476, Sep. 2006.

MENA-SERRANO, A. et al. A new universal simplified adhesive: 6-month clinical evaluation. **J Esthet Restor Dent**, London, v. 25, n. 1, p. 55-69, Feb. 2013.

MIRKARIMI, M.; TOOMARIAN, L. Effect of green tea extract on the treatment of dentin erosion: an in vitro study. **J Dent (Tehran)**, Tehran, v.9, n. 4, p. 224-228, Fall 2012.

MOHAMED, M. et al. Bond Durability of Different Resin Cements to Caries-Affected Dentin Under Simulated Intrapulpal Pressure. **Oper Dent**, Seattle, v. 18, Nov. 2014. [in press]

MONTAGNER, A. F. et al. MMP Inhibitors on Dentin Stability: A Systematic Review and Meta-analysis. **JDent Res**, Thousand Oaks, v. 93, n. 8, p. 733-743, Jun. 2014.

MORON, B.M. et al. Different protocols to produce artificial dentine carious lesions in vitro and in situ: hardness and mineral content correlation. **Caries Res**, Basel, v. 47, n. 2, p. 162-170, 2013.

MUÑOZ, M. A. et al. Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine. **JDent**, Kidlington, v. 41, n. 5, p. 404-411, May 2013.

MUÑOZ, M. et al. In Vitro Longevity of Bonding Properties of Universal Adhesives to Dentin. **Oper Dent**, Seattle, v. 18, Nov. 2014. [in press]

NAGASE, H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. **Biol Chem**, Berlin, v. 378, n. 3-4; p. 151-160, Mar-April 1997.

NASCIMENTO, F.D. et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. **JDent Res**, Thousand Oaks, n. 90, p. 506-511, Apr. 2011.

NISHITANI, Y. et al. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. **Eur J Oral Sci**, Chichester, v. 114, n. 2, p. 160-166, Apr. 2006.

PASHLEY, D. H.; TAY, F. R. Aggressiveness of contemporary self-etching adhesives. Part II: etching effects on unground enamel. **Dent Mater**, Kidlington, v. 17, n. 5, p. 430-444, Sep. 2001.

PASHLEY, D. H. et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. **J Dent Res**, Thousand Oaks, v. 83, n. 3, p. 216-221, Mar. 2004

PASHLEY, E. L. et al. Permeability of normal versus carious dentin. **Endod Dent Traumatol**, Copenhagen, v. 7, n. 5, p. 207-211, Oct 1991.

PERDIGÃO, J. et al. A new universal simplified adhesive: 18-month clinical evaluation. **Oper Dent**, Seattle, v. 39, n.2, p. 113-127, Mar-Apr.2014.

PERDIGÃO, J.; LOGUERCIO, A. D. Universal or Multi-mode Adhesives: Why and How? **J Adhes Dent**, New Malden, v. 16, n. 2, p. 193-194, Apr. 2014.

PERDIGÃO, J.; SEZINANDO, A.; MONTEIRO, P. C. Laboratory bonding ability of a multi-purpose dentin adhesive. **Am J Dent**, San Antonio, v. 25, n. 3, p. 153-158, 2012.

PEUMANS, M. et al. Eight-year clinical evaluation of a 2-step self-etch adhesive with and without selective enamel etching. **Dent Mater**, Kidlington, v. 26, n. 12, p. 1176-1184, Dec. 2010.

PUGACH, M.K. et al. Dentin caries zones: mineral, structure, and properties. **J Dent Res**. Thousand Oaks, v. 88, n. 1, p. 71-76, Jan. 2009.

QUEIROZ, C.S. et al. pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v. 19, n. 1, p. 21-27, 2008.

REIS, A. et al. Improving clinical retention of one-step self-etching adhesive systems with an additional hydrophobic adhesive layer. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 140, n. 7, p. 877-885, Jul. 2009.

REIS, A.; HIGASHI, C.; LOGUERCIO, A.D. Re-anatomization of anterior eroded teeth by stratification with direct composite resin. **J Esthet Restor Dent**, London, v. 21, n. 5, p. 304-316, 2009

RIOS D et al., In situ effect of an erosive challenge of different restorative materials and on enamel adjacent to these materials. **J Dent**, Kidlington, v. 36, n. 2, p.152-157, Feb. 2008.

SHELLIS R.P. et al. Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. **Caries Res**, Basel, v.45, p.69-77, 2011 Supplement 1.

SHELLIS, R.P.; FEATHERSTONE J.D.; LUSSI, A. **Understanding the chemistry of dental erosion**. v. 25, p. 163-179, 2014.

SCAFFA, P. M. C. Chlorhexidine Inhibits the Activity of Dental Cysteine Cathepsins. **J Dent Res**, Chicago, v. 91, n. 4, p. 420-25, Apr. 2012.

SCHWENDICKE, F. et al. Comparison of four methods to assess erosive substance loss of dentin. **PLoS One**, San Francisco, v. 17, n. 9, Sep. 2014

TAY F.R.; PASHLEY D.H. Resin bonding to cervical sclerotic dentin: a review. **J Dent**, Bristol, v. 32, n. 3, p.173-196, Mar. 2004.\

TAY F.R.; PASHLEY D.H. Guided tissue remineralisation of partially demineralised human dentine. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 29, n.8, p. 1127-1237, Mar. 2008.

TERSARIOL, I.L. et al. Cysteine Cathepsins in Human Dentin-Pulp. **J Endod**, New York, v. 36, n. 3, p.475-481, Mar. 2010.

TEZVERGIL-MUTLUAY, A. et al. The inhibitory effect of polyvinyl phosphonic acid on functional mmp activities in human demineralized dentin. **Acta Biomater**, Kidlington, v. 6, n. 10, p. 4136–4142, Oct. 2010.

TEZVERGIL-MUTLUAY, A. et al. The requirement of zinc and calcium ions for functional MMP activity in demineralized dentin matrices. **Dent Mater**, Kidlington, v. 26, n. 11, p. 1059-1067, Nov. 2010.

TEZVERGIL-MUTLUAY, A. et al. Effect of phosphoric acid on the degradation of human dentin matrix. **J Dent Res**, Chicago, v. 92, n.1, p. 87-91, Jan. 2013.

TJÄDERHANE, L. et al. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. **J Dent Res**, Chicago, v.77, n.8, p. 1622-1929, Aug. 1998.

TJÄDERHANE, L. et al. Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). **Adv Dent Res**, Washington, v.15, p. 55-58, Aug. 2001.

TJÄDERHANE, L. et al. Dentin basic structure and composition—an overview. **Endod Topics**, v. 20, n. 1, p.3-29, March 2009.

TJÄDERHANE, L. et al. Optimizing dentin bond durability: Control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. **Dent Mater**, Kidlington, v.29, n.1, p.116-35, Jan.2013a.

TJÄDERHANE, L. et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer-A review. **Dent Mater**, Kidlington, v.29, n.19, p. 999-1011, Oct. 2013b.

TJÄDERHANE, L.; BUZALAF, M. A.; SALO, T. The origin of matrix metalloproteinases in attrited dentine. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 59, n.2, p. 233-255, Feb. 2014.

TOLEDANO, M. et al. Differential expression of matrix metalloproteinase-2 in human coronal and radicular sound and carious dentine. **J Dent**, Kidlington, v. 38, n.8, p.635-640, Aug. 2010.

TURK, B.; TURK, D.; TURK, V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v.1477, n.1-2, p.98-111, Mar. 2000.

TURK, D.; GUNČAR, G. Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, Copenhagen, v.59, n.2, p. 203-213, Feb. 2003.

VAN MEERBEEK, B. et al. State of the art of self-etch adhesives. **Dent Mater**, Kidlington, v. 27, n.1, p.17-28, Jan. 2011.

VAN MEERBEEK, B. et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. **Oper Dent**, Seattle, v. 28, n.3, p. 215-235, May-Jun. 2003.

VIDAL C. M. et al. Abundance of MMPs and cysteine cathepsins in caries-affected dentin. **J Dent Res**, Chicago, v. 93, v.3, p.269-274, Mar. 2014.

VIEIRA, A. E. et al. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. **Caries Res**, Basel, v.39, n.6, p.514-520, Nov-Dec. 2005.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. **Circ Res**, Baltimore, v. 92, n.8, p. 827-39, May 2003.

WANG, L. **Efeito do processo erosivo causado por diferentes bebidas na resistência a união de diferentes sistemas adesivos em superfície de esmalte:**

análise in vitro e in situ/ex vivo. 2011. 119 p. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2011.

WANG, L. et al. Effect of simulated intraoral erosion and/or abrasion effects on etch-and-rinse bonding to enamel. **Am J Dent**, San Antonio, v.27, n.1, p.29-34, Feb. 2014.

WANG, L. et al. Effect of 2% chlorhexidine digluconate on bond strength of a glass-fibre post to root dentine. **Int Endod J**, Oxford, v.46, n. 9, p. 847-854, Set. 2013.

WANG, Y.; SPENCER, P.; WALKER, M. P. Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. **J Biomed Mater Res A**, Hoboken, v.81, n.2, p. 279-286, May 2007.

WANG, X. et al. Preventing erosion with novel agents. **J Dent**, Kidlington, v.39, n.2, p.163-170, Feb. 2011.

WEST, N. X.; DAVIES, M.; AMAECHI, B. T. In vitro and in situ erosion models for evaluating tooth substance loss. **Caries Res**, Basel, v.45, p. 43-52, 2011. Supplement 1.

YOSHIDA, Y. et al. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. **J Dent Res**, Chicago, v.83, n.6, p.454-458, Jun. 2004.

YOSHIDA, Y. et al. Selfassembled nano-layering at the adhesive interface. **J Dent Res**, Chicago, v.91, n.4, p. 376-381, April 2012.

YOSHIYAMA, M. et al. Comparison of conventional vs self-etching adhesive bonds to caries-affected dentin. **Oper Dent**, Seattle, v.25, n.3, p.163-169, May-Jun. 2000.

ZHANG, X. et al. Remineralization of partially demineralized dentine substrate based on a biomimetic strategy. **J Mater Sci Mater Med**, London, v.23, n.3, p. 733-742, Mar. 2012.

ZIMMERLI, B. et al. Long-term bonding to eroded dentin requires superficial bur preparation. **Clin Oral Investig**, Berlin v.16, n.5, p.1451-1461, Oct.2012.