UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

LUCIANA FÁVARO FRANCISCONI

**Resistência de união de uma resina
composta à dentina normal e erodida: o
papel da aplicação de soluções de clorexidina
em diferentes concentrações após seis meses
e um ano de envelhecimento**

BAURU
2012

LUCIANA FÁVARO FRANCISCONI

**Resistência de união de uma resina
composta à dentina normal e erodida: o
papel da aplicação de soluções de clorexidina
em diferentes concentrações após seis meses
e um ano de envelhecimento**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de
Bauru da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutora em Ciências
Odontológicas Aplicadas, na área de concentração
Dentística.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Pereira

Versão corrigida

**BAURU
2012**

F847r Francisconi, Luciana Fávaro
Resistência de união de uma resina composta à dentina normal e erodida: o papel da aplicação de soluções de clorexidina em diferentes concentrações após seis meses e um ano de envelhecimento / Luciana Fávaro Francisconi. -- Bauru, 2012.
158 p. : il. ; 31cm.

Tese. (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Pereira

Nota: A versão original desta tese 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 tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 110/2009
Data: 04/06/2012

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, sobretudo, à minha família, sustentáculo que dá fundamento à edificação dos meus sonhos, meu lenitivo e minha força contra as intempéries diárias, fonte permanente de descobertas, de surpresas, de generosidade, de conforto e de amor...

A Deus,

por, ao nos dar o dom da vida, guiar-nos por caminhos retos, atribuir-nos discernimento diante dos desafios, fazer-nos fortes quando sentimo-nos fracos e abençoar-nos com incontáveis graças.

Aos meus pais, Jacinto e Lucelena,

por serem não apenas bons pais, mas pais brilhantes. Pais dos seus filhos, pais dos seus pais, dos irmãos, dos sobrinhos, dos demais familiares, dos amigos... Vocês dão aos que os cercam algo incomparavelmente mais valioso que bens materiais; dão-nos seu ser, sua história, suas experiências, suas orações, suas lágrimas, sua felicidade, seu tempo, seu absoluto amor. Não apenas nos dão oportunidades, mas, acima de tudo, nunca nos deixam desistir. Se algo em mim for passível de despertar admiração, devo isso a vocês. Que, mirando-me no exemplo de vocês, eu possa ser aos meus filhos ao menos metade daquilo que vocês o são para mim. Meu amor por vocês é imenso, é eterno.

Aos meus irmãos, Renato e Fernando,

pela sensibilidade que demonstram ao me ouvir, por alegrarem-se quando me alegro e por preocuparem-se quando desanimo, por serem bons conselheiros e

companheiros, e por, de forma tão cativante e divertida, torcerem por minha realização pessoal e profissional. Amo vocês, incondicionalmente.

Ao meu namorado, Bruno,

por ser o responsável pelas singulares alegrias que se somaram à minha vida desde que dela passou a ser parte imprescindível. Não é possível dimensionar a sorte que tive ao te encontrar. Faltam-me palavras para expressar, e aqui registrar, o quanto é especial. Confiança, admiração e respeito nutrem o amor, despretenso, maduro e sincero, que sinto por você. Obrigada por compreender e apoiar minhas mediatas e nem sempre inteligíveis escolhas e demandas profissionais. Que exista reciprocidade no fato de permitir que eu seja aquela mulher que está, não atrás, mas ao lado do grande homem que é. Amo você, “S2”! Agradeço, extensivamente, ao Sr. Carlos, à D. Maria e a toda “minha” família Rios, pela acolhida pronta e afetuosa, pelos momentos compartilhados, e por depositarem parte da felicidade do Bruno em minhas mãos. Cada um de vocês tem seu lugar particular em meu coração.

À minha segunda família, tio Paulo, Má, Manu e Carol,

por atribuírem à palavra lar, não apenas durante os nove anos em que morei com vocês, seu real significado: lugar onde as pessoas vivem e sentem-se bem. A acolhida, principalmente em seus corações, é meu porto seguro. Tio Paulo, obrigada por ser uma das minhas referências de marido, pai e professor. Má, ainda que eu tenha muito a aprender com sua perseverança e determinação, admiro-a por sua força ao lutar por seus objetivos. Manu e Carol, a vocês agradeço por tudo. Vocês são minhas irmãs, amigas, confidentes, colegas de profissão e parte indissociável do meu coração. Cada uma, a sua maneira, torna minha caminhada mais amena e sensata. Espero retribuir todo o carinho e atenção que dedicam a mim. Impossível dimensionar o quanto os amo!

Aos meus avós, Pedro e Eunísia; Helena e Eugênio,

por serem essenciais ao meu desenvolvimento ao transmitirem uma visão mais ampla e filosófica da vida, sendo símbolos de estabilidade e de fidelidade aos valores morais. “Vô” Pedro e “Vó” Nísia, obrigada pelo incentivo, pelos conselhos e pela eterna vigilância. “Vó” Helena, obrigada pelo carinho, pelas orações e pela preocupação constante. “Vô” Geninho, obrigada por proteger-me e por guiar meus passos aí do céu. Amo vocês com todo o meu coração.

Aos meus tios, Neto, Cristina e Pedro, e aos meus primos, Rafão, Rafinha e Gabi,

pela presença marcante e tão querida em minha vida. Agradeço por, diante da demonstração de afeto por mim, deixarem evidente que vocês são, acima de tudo, grandes amigos com os quais sempre posso contar. Tio Neto e tio Pedro, nutro, por vocês, um carinho mais que especial e sinto, verdadeiramente, que ele é recíproco e reconfortante. Tia Cristina e Rafa, vocês me ensinam a ver a vida através de uma perspectiva diferente e, assim, demonstram que as provações podem ser enfrentadas de forma mais aprazível. Rafinha, a personificação do altruísmo, e Gabi, delicadeza e carinho tão característicos, espero que enxerguem em mim uma irmã, mais velha, que busca incessantemente a felicidade e a plena realização de vocês. Tenho orgulho de tê-los, respectivamente, como tios e primos. A vocês, meu eterno amor.

Às minhas “cunhadinhas”, Deisi e Kenia, e aos meus “cunhadinhos”, Pedro e Ni,

por, ao fazerem meus “maninhos” e minhas “sisters” felizes, também proporcionarem-me a felicidade. Vocês sabem valorizar a boa convivência e conquistam, a cada dia, minha admiração. Obrigada pela companhia despretensiosa e constante. Saber que vocês torcem por minha realização profissional e pessoal é

estímulo para que eu continue lutando por meus objetivos. Cuidem bem, respectivamente, do Rê, do Fer, da Manu e da Carol. Amo vocês.

Às minhas amigas Flávia, Hayana e Luciana,

não fui a responsável por nossos caminhos se cruzarem, mas pude escolhê-las como, mais que minhas amigas, minhas irmãs de coração. Convivendo com vocês pude compreender que, contando com amizades verdadeiras, a vida se torna mais simples, mais rica e mais bela. Como é bom, com vocês, dividir as alegrias e os anseios. Agradeço pelo apoio incondicional, pelo carinho, e pela sinceridade ao expressarmos nossos sentimentos. “*Roomates*” queridas, obrigada por tornarem minha estadia no Solar Cristiane agradável, produtiva, madura e feliz. Que a realização de nossos sonhos seja apenas uma questão de tempo e que, mesmo distantes, permaneçamos unidas por valores comuns e pelo real significado da palavra amizade. Meu sincero amor e minha gratidão a vocês. Estendo esses agradecimentos ao Paulinho e ao Leandro, que, junto à “Magrela” e à Lulu, tornam os momentos compartilhados ainda mais especiais.

À Prof^a. Dr^a. Linda Wang, ao Prof. Dr. José Carlos Pereira, à Marcela e à Leslie,

por colaborarem, prontamente, para com a realização do meu sonho de tornar-me Doutora neste momento. Lindinha, àqueles que a cercam, você oferece oportunidades ímpares de crescimento. Obrigada por permitir que aprimoremos nossos dons, tanto os relacionados à academia, quanto os relacionados aos nossos ideais de vida. É alento saber que posso contar com você como mestre e amiga. “Chefe”, agradeço por ter-me orientado, durante o mestrado e o doutorado, de forma sábia e descontraída, e por acreditar em meu potencial, guiando-me pelo melhor caminho. Acima de tudo, obrigada pelo exemplo de humildade e determinação e por não poupar esforços em me ajudar. Serei eternamente grata ao senhor, a quem admiro e respeito profundamente. “Ser” e Les, poder contar com a amizade e a ajuda de vocês, sempre disponíveis e animadas, apesar dos contratempos, para a

realização da parte laboratorial desse trabalho, foi determinante para que hoje eu pudesse estar aqui. MUITÍSSIMO obrigada, por tudo.

À Marilsa, à Fernanda, à Mari, à Tatinha e à D. Célia,

pela dedicação e pelo carinho constantes na lida com nossas casas, com o que temos e com os que nelas habitam. Nossos anjos da guarda, vocês têm um lugar todo especial em nossos corações.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. José Carlos Pereira, diretor da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP), Professor Titular do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos desta casa e meu querido orientador, agradeço por todas as oportunidades oferecidas durante minha pós-graduação. Com seu espírito determinado, permitiu que eu ampliasse meus horizontes profissionais ao me ensinar a bater as asas para ensaiar meus primeiros voos. Obrigada pela dedicação a minha formação, mesmo dispondo de uma agenda repleta de compromissos importantes. Espero ser motivo de orgulho quando tiver que alçar, daqui para frente, sozinha, voos mais audaciosos.

Ao Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos e aos Profs. Drs. Heitor Marques Honório e Daniela Rios, agradeço por serem, juntamente ao “Tio Paulo”, os responsáveis diretos por minha escolha pela carreira acadêmica. Ao me orientarem, respectivamente, durante minha participação no Programa de Educação Tutorial (PET-FOB/USP) e no desenvolvimento de minhas pesquisas de iniciação científica, fascinaram-me com a forma com que enxergavam e conviviam com o universo científico. Vocês jamais pouparam esforços em transmitir toda a valiosa experiência que possuem como pessoas e profissionais. Obrigada pelo trabalho em equipe e pela disponibilidade incontestável. Com certeza, mais do que meus primeiros orientadores, vocês se tornaram meus conselheiros, amigos e exemplos a serem seguidos.

Aos amigos de longa data e respectivos familiares, e aos pertencentes à minha e às turmas contemporâneas de Pós-Graduação, agradeço por serem os verdadeiros presentes que a vida me deu ao longo dos anos. Obrigada pelo convívio amigo e familiar em todas as nossas atividades, pelas experiências que nunca se repetirão e pelo grande carinho que temos uns pelos outros. Vocês são pessoas eternas em meu coração. Espero que, muito em breve,

possamos nos lembrar de tudo que vivemos com carinho e saudade e assistamos ao sucesso de cada um de nós.

Aos professores, funcionários e amigos do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos, pela dedicação, pelo incentivo, colaboração e ajuda e por serem amigos de todas as horas.

Aos funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos, Sandrinha, Lô e Alcides, por serem, mais que amigos, parte imprescindível da família Francisconi. Obrigada, mais uma vez, pela companhia diária e por não pouparem esforços para que tudo dê sempre certo. Acima de tudo, obrigada por receber todo e qualquer aluno de braços e corações abertos, jamais negando qualquer tipo de contribuição: de um cafezinho a um importante conselho.

Aos funcionários e amigos da Diretoria, da Pós-Graduação e do CIP, pela indiscutível disposição e por torcerem por nosso sucesso.

Aos Profs. Drs. José Roberto Pereira Lauris e Heitor Marques Honório e aos funcionários da Biblioteca, pelo atendimento pronto e decisivo.

A todos os demais professores e funcionários da FOB-USP, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos pacientes, por acreditarem no trabalho dos pós-graduandos e permitirem que nossos dons sejam desenvolvidos e aprimorados, que pesquisas clínicas sejam realizadas, a fim de que questões de interesse não apenas dos pesquisadores, mas também da sociedade como um todo, sejam esclarecidas, e que muito material didático seja obtido a partir de seu tratamento, na maioria das

vezes procurando incentivar-nos com uma palavra ou um gesto de carinho em agradecimento pelos serviços prestados.

Aos alunos da graduação, por confiarem nos alunos de pós-graduação e aceitarem nossos singelos conselhos e discreta experiência já vivenciada. Vocês são muito importantes para nosso crescimento profissional e acabam tornando-se amigos que serão para sempre lembrados.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao **Prof. Dr. João Grandino Rodas**, digníssimo reitor da Universidade de São Paulo;

Ao **Prof. Dr. José Carlos Pereira**, digníssimo Diretor da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo;

Ao **Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris**, digníssimo Prefeito do Campus da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo;

Ao **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**, digníssimo Presidente da Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo;

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, órgão de fomento de meu doutorado (processo DO 142237/2009-4).

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, concessora de Auxílio Regular (processo 2009/14986-0) à Prof^a. Dr^a. Linda Wang, para desenvolvimento de parte do presente trabalho.

E a todos que, de alguma maneira, tornaram este sonho realidade...

...meu muito obrigada!

**"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que parecia impossível."**

Charles Chaplin

Resumo

RESUMO

A aplicação de soluções de digluconato de clorexidina (CHX), em diferentes concentrações, tem demonstrado potencial em prevenir a progressão da erosão dentinária *in situ* e a diminuição, com o passar do tempo, dos valores de resistência de união (RU) de resinas compostas (RC) à dentina normal ou afetada por cárie. Entretanto, seu papel na adesão à dentina já erodida é desconhecido. Este estudo se propôs, portanto, a avaliar o efeito da aplicação de soluções de CHX em diferentes concentrações na RU de uma RC à dentina normal (parâmetro para comparações) e à dentina erodida, ao longo do tempo. Terceiros molares humanos hígidos extraídos (n=48) tiveram seu terço oclusal seccionado e as superfícies dentinárias expostas foram somente submetidas à ação de uma lixa de carbetto de silício de granulação 600/1 min (dentina normal-N, n=24), ou subsequentemente erodidas por um refrigerante a base de cola (imersões de 5 min, 3x/dia, 5 dias; dentina erodida-E, n=24). Foram, então, condicionadas (H_3PO_4 a 37%; 15 s), lavadas, secas e reidratadas com 1,5 μ L, respectivamente, de água deionizada (controle-NC, n=8 / EC, n=8), de CHX a 0,004% (N0,004%, n=8 / E0,004%, n=8) ou de CHX a 2% (N2%, n=8 / E2%, n=8). O sistema adesivo Adper^{TM}Single Bond 2® foi aplicado em todos os espécimes e a porção coronária foi incrementalmente reconstruída com a RC Filtek^{TM}Z350®. Depois de armazenados em água deionizada (24 h, 37°C), os espécimes foram seccionados em palitos (secção transversal $\approx 0,81$ mm²), que foram testados, sob força de tração (EMIC; célula de carga de 50 kgf; 0,5 mm/minuto), imediatamente ou depois de 6 meses ou 1 ano de envelhecimento. As falhas foram analisadas e classificadas em adesivas, mistas, coesivas em dentina ou em resina. Paralelamente, avaliou-se a qualidade da hibridização para cada grupo experimental, por meio da obtenção de imagens em microscopia confocal de varredura a laser de um espécime por grupo, hibridizado pelo mesmo adesivo, mas marcado pela adição de rodamina B, e seccionado apenas no sentido méso-distal. Os dados obtidos da microtração foram analisados por meio dos testes de ANOVA a três critérios e de Tukey ($p < 0,05$). Os valores médios de RU (MPa $\pm$ dp; imediatamente / 6 meses / 1 ano) foram: NC (34,74 $\pm$ 9,79 / 20,77 $\pm$ 14,35 / 7,58 $\pm$ 4,94); N0,004% (35,69 $\pm$ 9,85 / 23,10 $\pm$ 8,13 / 13,82 $\pm$ 10,12); N2% (41,22 $\pm$ 5,38 / 34,64 $\pm$ 6,62 / 13,25 $\pm$ 4,83); EC (20,94 $\pm$ 5,37 / 7,87 $\pm$ 8,81 / 5,43 $\pm$ 4,99); E0,004% (22,12 $\pm$ 7,44 / 3,47 $\pm$ 6,25 / 4,97 $\pm$ 3,11); E2% (15,97 $\pm$ 5,17 / 22,23 $\pm$ 9,12 / 5,41 $\pm$ 5,47). Falhas adesivas

e/ou mistas consistiram-se nas preponderantemente observadas. Os valores de RU da RC à dentina erodida foram sempre inferiores àqueles da RC à dentina normal. Tais valores, para ambas as condições de dentina, experimentaram redução significativa com o passar do tempo, mas a aplicação da solução de CHX a 2% foi capaz de mantê-los estáveis até os 6 meses de envelhecimento dos espécimes. Portanto, a aplicação de soluções de CHX, a 2%, apresenta-se como uma estratégia promissora para conservar a RU de resinas compostas tanto à dentina normal quanto à dentina erodida. Com o tempo, no entanto, seu efeito pode tornar-se reduzido ou irrelevante.

Palavras-chave: Erosão Dentária. Clorexidina. Metaloproteinases da Matriz. Camada Híbrida.

Abstract

ABSTRACT

Bond strength of a composite resin to normal and eroded dentin: the role of the application of chlorhexidine solutions in different concentrations after six-months and one-year of aging

The application of chlorhexidine digluconate (CHX) solutions, in different concentrations, has shown potential in preventing the progression of dentin erosion in situ and the decline, in the course of time, of the bond strength (BS) values of composite resins (CR) to normal or caries-affected dentin. However, its role on adhesion to already eroded dentin is unknown. This study aimed, therefore, to evaluate the effect of the application of CHX solutions in different concentrations on BS of a CR to normal (parameter for comparisons) and to eroded dentin over time. Extracted sound human third molars (n=48) had their occlusal thirds sectioned and exposed flat dentin was only submitted to a 600-grit SiC paper/1min (normal dentin-N, n=24), or subsequently eroded by a regular-cola soft-drink (5-min immersions, 3x/day, 5 days; eroded dentin-E, n=24). They were, then, acid-etched (37% H₃PO₄; 15 s), washed, vigorously dried, and rehydrated with 1.5 µL, respectively, of deionized water (control-NC, n=8 / EC, n=8); of 0.004% CHX (N0.004%, n=8 / E0.004%, n=8); or of 2% CHX (N2%, n=8 / E2%, n=8). Adper^{TM}Single Bond 2® was applied in all specimens and composite core buildups were incrementally constructed with Filtek^{TM}Z350®. After storage in deionized water (24 h, 37°C), specimens were sectioned in beams (cross-section ≈0.81 mm²), which were tested, under tensile (EMIC; 50 kg_f load cell; 0.5 mm/minute), immediately or after 6 months or 1 year of aging. Failures were analyzed and classified in adhesive, mixed, cohesive in dentin or in resin. In parallel, the quality of the hybridization for each experimental group was evaluated, by means of the obtainment of laser scanning confocal microscopy images from one specimen per group, hybridized with the same adhesive, but marked by the addition of rhodamine B and sectioned only mesiodistally. Microtensile data were analyzed by three-way ANOVA and Tukey tests (α<0.05). Mean µTBS values (MPa±sd; immediately / 6 months / 1 year) were: NC (34,74±9,79 / 20,77±14,35 / 7,58±4,94); N0,004% (35,69±9,85 / 23,10±8,13 / 13,82±10,12); N2% (41,22±5,38 / 34,64±6,62 / 13,25±4,83); EC (20,94±5,37 / 7,87±8,81 / 5,43±4,99); E0,004% (22,12±7,44 / 3,47±6,25 / 4,97±3,11); E2% (15,97±5,17 / 22,23±9,12 /

5,41±5,47). Adhesive and/or mixed failures consisted in the mainly observed ones. BS values of the CR to the eroded dentin were always lower than that of the CR to the normal dentin. These values, to both dentin conditions, experienced a significant reduction in the course of time, but application of the 2% CHX solution was able to keep them stable until 6-months aging of the specimens. Therefore, the application of CHX solutions, at 2%, is presented as a promising strategy to conserve BS both to normal and to eroded dentin. Over time, however, its effect may become reduced or irrelevant.

Keywords: Tooth Erosion. Chlorhexidine. Matrix Metalloproteinases. Hybrid Layer.

Listas

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental: **A** - Obtenção dos terceiros molares humanos hígidos extraídos; **B** - seccionamento dos terços oclusal e apical dos terceiros molares; **C** - criação de *smear layer* sobre a dentina exposta, por meio da ação de uma lixa de carbeto de silício de granulação 600 por 1 min; **D** - erosão da dentina de metade dos espécimes por um refrigerante a base de cola (imersões de 5 min; 3x/dia; 5 dias - dentina erodida = E) e submissão dos demais espécimes (dentina normal = N) diretamente à próxima etapa; **E** - condicionamento da dentina por 15 s com ácido fosfórico a 37%, lavagem e secagem; **F** - reidratação de cada terço dos espécimes N com 1,5 µL, respectivamente, de água deionizada (controle - NC), de CHX a 0,004% (N0,004%), ou de CHX a 2% (N2%) e realização dos mesmos procedimentos para os espécimes E (EC; E0,004%; E2%); **G** - aplicação do sistema adesivo Adper^{TM}Single Bond 2® e reconstrução incremental da porção coronária com a resina composta Filtek^{TM}Z350®; **H** - seccionamento dos espécimes em palitos (dentina+resina; área de secção transversal de $\approx 0,81\text{mm}^2$), após armazenagem em água deionizada por 24 h a 37°C; **I** - submissão dos palitos aos testes de microtração (EMIC; 0,5 mm/min), imediatamente ou depois de 6 meses ou 1 ano de envelhecimento, e avaliação dos tipos de falhas (adesiva, mista, coesiva em resina, coesiva em dentina), com um microscópio digital.....65/66

Figura 2 - Seccionamento do terço oclusal dos terceiros molares, para exposição da dentina coronária, subjacente ao esmalte, com auxílio de um disco diamantado dupla face, refrigerado com água deionizada, a uma velocidade de 300 rpm.....67

Figura 3 - Criação de uma *smear layer* sobre a dentina exposta, por meio da ação de uma lixa de carbeto de silício de granulação 600, sob refrigeração com água deionizada, em uma politriz metalográfica APL-4.....67

Figuras 4 e 5 - Desafio erosivo em laboratório, para determinação do que se chamou de dentina erodida (E). Contato das superfícies dentinárias com um refrigerante a base de cola (Coca-Cola®) por um total de 5 dias, por três vezes ao dia (8 h, 13 h e 18 h), durante 5 minutos.....	70
Figura 6 - Condicionamento com ácido fosfórico a 37%, por 15 segundos, seguido de lavagem pelo dobro do tempo e secagem com jatos de ar.....	72
Figura 7 - Reidratação com 1,5 µL de água deionizada (NC/EC); ou de solução de digluconato de clorexidina a 0,004% (N0,004%/E0,004%) ou a 2% (N2%/E2%).....	72
Figura 8 - Remoção, depois de 60 segundos, dos excessos das respectivas soluções com papel absorvente.....	72
Figura 9 - Aplicação do sistema adesivo Adper™Single Bond 2® em duas camadas finas, previamente à facilitação da evaporação do solvente com leve jato de ar.....	72
Figura 10 - Fotopolimerização do sistema adesivo por 10 segundos.....	72
Figura 11 - Aspecto superficial brilhante após a polimerização do sistema adesivo.....	72
Figura 12 - Aposição do primeiro incremento (2 mm) de resina composta sobre um espécime.....	73
Figura 13 - Acomodação do segundo incremento (2 mm) de resina composta sobre o primeiro, já polimerizado.....	73
Figura 14 - Fotoativação de cada um dos incrementos de resina composta por 20 segundos.....	73
Figuras 15 e 16 - Conjunto espécime dentário-resina composta, fixado com cera pegajosa, pela porção radicular, ao dispositivo metálico, que era acoplado à	

máquina de corte, para seccionamento, perpendicular à interface adesiva, em fatias, a partir da superfície do último incremento de resina.....74

Figura 17 - Seccionamento do conjunto espécime dentário-resina composta já fatiado, depois de se girar a base em que estava fixado em 90°.....75

Figura 18 - Extração de cada palito do conjunto, com auxílio de uma pinça clínica. Os palitos situados à periferia, onde podia existir esmalte, foram desconsiderados.....75

Figura 19 - Fixação de um palito, pelas extremidades, com um adesivo à base de cianocrilato, a um dispositivo tipo Bencor.....76

Figura 20 - Dispositivo Bencor, com um palito nele fixado, adaptado à máquina de testes universal EMIC DL 500 BF®.....76

Figura 21 - Teste, sob força de tração (célula de carga de 50 kgf) perpendicular à interface adesiva, a uma velocidade de 0,5 mm/min, até sua falha.....76

Figuras 22 e 23 - Análise das superfícies fraturadas de ambos os segmentos de cada palito, com o auxílio de um microscópio digital (Dino-Lite Digital Microscope®), com 50x de aumento, para determinação do padrão de fratura (adesiva, mista, coesiva em dentina, coesiva em resina).....77

Figura 24 - Imagens, em microscopia confocal de varredura a laser, representativas da análise das interfaces adesivas das superfícies seccionadas das metades vestibular e lingual do espécime, de cada grupo, hibridizado pelo sistema adesivo marcado com rodamina B. Não se notam diferenças evidentes entre os grupos experimentais, ainda que seja possível sugerir que a qualidade da hibridização para a dentina erodida é inferior à qualidade da hibridização para a dentina normal, independentemente da concentração da solução de CHX com que foram reidratadas ou do tempo de envelhecimento dos respectivos espécimes.....84/85

- GRÁFICOS

Gráfico 1 - Comportamento (RU em MPa) dos diferentes grupos (NC, N0,004%, N2%, EC, E0,004%, E2%) de acordo com o tempo de envelhecimento dos espécimes. Cores, traçados e extremidades diferentes para as linhas situadas imediatamente abaixo da base das barras indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as condições experimentais a que correspondem. (n=7 para cada barra).....82

Gráfico 2 - Porcentagem (%) de falhas do tipo adesiva (A), mista (M), coesiva em dentina (CD) ou coesiva em resina (CR) para os diferentes grupos experimentais (NC, N0,004%, N2%, EC, E0,004% e E2%), em função do tempo de envelhecimento dos espécimes (imediato-I, 6 meses-6m, 1 ano-1a)*. *Diferentes letras indicam diferença estatisticamente significativa entre cada tipo de falha.....83

- QUADROS

Quadro 1 - Grupos experimentais.....68

Quadro 2 - Principais materiais utilizados no presente estudo.....68/69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios $\pm$ desvio padrão de resistência de união (MPa) de uma resina composta à dentina normal (N) e à dentina erodida (E), em função da aplicação de soluções de CHX em diferentes concentrações (0-C, 0,004% e 2%), após o condicionamento ácido, e do tempo de envelhecimento dos espécimes (imediato-I, 6 meses-6m, 1 ano-1a).....81

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

-	a
%	por cento / <i>percent</i>
*	asterisco
/	por / <i>per</i>
<	menor / <i>less than</i>
±	mais ou menos / <i>more or less</i>
≈	aproximadamente / <i>approximately</i>
≤	menor ou igual
®	marca registrada / <i>registered trademark</i>
μL	microlitro(s) / <i>microliter(s)</i>
μm	micrômetro(s)
μTBS	<i>microtensile bond strength</i>
1a	1 ano
6m	6 meses
A	adesiva / <i>adhesive</i>
ANOVA	análise de variância / <i>analysis of variance</i>
Bis-EMA	bis-fenol a-glicidil metacrilato etoxilado
Bis-GMA	bis-fenol a-glicidil metacrilato
Bras.	brasileira
BS	<i>bond strength</i>
C	controle
CA	<i>California</i>
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CD	coesiva em dentina / <i>cohesive in dentin</i>
CEP	Código de Endereçamento Postal
CHX	digluconato de clorexidina / <i>chlorhexidine digluconate</i>
cm	centímetro(s)
cm ²	centímetro(s) quadrado(s)
Corp.	<i>Corporation</i>
CPF	Cadastro de Pessoas Físicas

CR	coesiva em resina / <i>cohesive in resin</i>
CR	<i>composite resin</i>
CRO	Conselho Regional de Odontologia
CT	<i>Connecticut</i>
DF	Distrito Federal
dp	desvio-padrão
E	dentina erodida; substrato dentinário erodido / <i>eroded dentin</i>
E0,004%	dentina erodida reidratada com uma solução de CHX a 0,004%
E0.004%	<i>eroded dentin rehydrated with a 0.004% CHX solution</i>
E2%	dentina erodida reidratada com uma solução de CHX a 2% / <i>eroded dentin rehydrated with a 2% CHX solution</i>
EC	dentina erodida reidratada com água deionizada (controle) / <i>eroded dentin rehydrated with deionized water (control)</i>
EGCG	epigallocatequina-3-galato
et al.	<i>et alia</i> ; e outros
EUA	Estados Unidos da América
EVA	Espuma Vinílica Acetinada
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
h	hora(s) / <i>hour(s)</i>
H ₂ O	água
H ₃ PO ₄	ácido fosfórico / <i>phosphoric acid</i>
HEMA	hidroxi-etil metacrilato
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
I	imediato; imediatamente
IL	<i>Illinois</i>
Inc.	<i>Incorporation</i>
Ind.	Indústria
KCl	cloreto de potássio
kg _f /cm ²	quilograma(s)-força por centímetro quadrado
kg _f	quilograma(s)-força / <i>kilogram(s)-force</i>
KH ₂ PO ₄	monopotássio fosfato
LED	diodo emissor de luz / <i>light emitting diode</i>
Ltda.	limitada
M	mista / <i>mixed</i>

mg/ml	miligrama(s) por mililitro
MgCl ₂	cloreto de magnésio
min	minuto(s) / <i>minute(s)</i>
ml	mililitro(s)
mm	milímetro(s)
mM/L	milimolar(es) por litro
mm/min	milímetro(s) por minuto / <i>millimeter(s) per minute</i>
mm ²	milímetro(s) quadrado(s) / <i>square millimeter(s)</i>
MMP(s)	metaloproteinase(s) da matriz
MPa	megapascal(s) / <i>megapascal(s)</i>
mW/cm ²	miliwatt(s) por centímetro quadrado
N	dentina normal; substrato dentinário normal / <i>normal dentin</i>
n	número(s) / <i>number(s)</i>
N0,004%	dentina normal reidratada com uma solução de CHX a 0,004%
N0.004%	<i>normal dentin rehydrated with a 0.004% CHX solution</i>
N2%	dentina normal reidratada com uma solução de CHX a 2% / <i>normal dentin rehydrated with a 2% CHX solution</i>
NaCl	cloreto de sódio
NaN ₃	azida de sódio
NC	dentina normal reidratada com água deionizada (controle) / <i>normal dentin rehydrated with deionized water (control)</i>
New Rd	<i>New Road</i>
nm	nanômetro(s)
nº	número
°	grau(s) / <i>degree(s)</i>
°C	grau(s) Celsius / <i>degree(s) Celsius</i>
p	nível de significância
pH	potencial hidrogeniônico
RC	resina(s) composta(s)
RG	Registro Geral - Carteira de Identidade
RJ	Rio de Janeiro
rpm	rotação(ões) por minuto
RU	resistência de união
s	segundo(s) / <i>second(s)</i>

S.A.	Sociedade Anônima
sd	<i>standard deviation</i>
SiC	carbeto de silício / <i>silicon carbide</i>
SP	São Paulo
TEGDMA	trietileno glicol dimetacrilato
™	marca não registrada / <i>unregistered trademark</i>
UDMA	uretano dimetacrilato
UF	Unidade da Federação
USP	Universidade de São Paulo
Vic.	Victoria
x	por
x	vez(es) / <i>times</i>
α	significance level

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
2	REVISÃO DE LITERATURA	37
2.1	DESGASTE DENTÁRIO	39
2.2	EROSÃO DENTÁRIA	42
2.3	ATIVIDADE PROTEOLÍTICA NA EROSÃO DENTÁRIA E NA DENTINA DE MANEIRA GERAL	50
2.4	INIBIÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA NA DENTINA	54
3	PROPOSIÇÃO	59
4	MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	65
4.2	PREPARO DOS ESPÉCIMES DENTÁRIOS	66
4.2.1	Obtenção dos dentes humanos	66
4.2.2	Exposição da dentina e criação de <i>smear layer</i>	67
4.2.3	Determinação dos grupos experimentais	68
4.2.4	Tratamento do substrato dentinário	70
4.2.5	Procedimentos adesivos/restauradores	71
4.2.6	Obtenção dos palitos	73
4.3	TESTES DE MICROTRAÇÃO E AVALIAÇÃO EM MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER	75
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	77
5	RESULTADOS	79
6	DISCUSSÃO	87
7	CONCLUSÕES	107
	REFERÊNCIAS	111
	APÊNDICES	143
	ANEXOS	153

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A transformação da odontologia de essencialmente curativa para preventiva refletiu-se no intenso controle da cárie dentária, que experimentou um decréscimo significativo de sua prevalência (PETERSON; BRATTHALL, 1996). Uma outra alteração bucal, então, o desgaste dentário, vem se tornando cada vez mais frequente na rotina odontológica (AL-DLAIGAN; SHAW; SMITH, 2001; DEERY et al., 2000; GANSS; KLIMEK; GIESE, 2001; HOLBROOK; ARNADOTTIR; KAY, 2003).

Dentre as principais formas de desgaste, que incluem a abrasão, a atrição, e a abfração, destaca-se a erosão, uma alteração provocada pelo amolecimento e subsequente perda superficial de estrutura dentária devido, sobretudo, à ação química de substâncias ácidas, sem envolvimento de microrganismos, e que pode envolver inúmeros processos na cavidade bucal (BARTLETT; GANSS; LUSSI, 2008; ECCLES, 1979; FEDERLIN et al., 1998; HONÓRIO et al., 2008b; IMFELD, 1996; JENSDOTTIR et al., 2004; KATO et al., 2009b; LUSSI, 1996; LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004; MEURMAN; TEN CATE, 1996; PIANGPRACH et al., 2009; RIOS et al., 2007; RIOS et al., 2009; SERRA; MESSIAS, TURSSI, 2009; SPREAFICO, 2010; YIP; SMALES; KAIDONIS, 2003; ZERO, 1996).

No esmalte, a erosão dentária é predominantemente um fenômeno de superfície que envolve um processo de dissolução mineral centrípeto até que a dentina subjacente seja exposta (BARBOUR et al., 2005; LARSEN 1991; VORONETS; WANG, 2010). Na dentina, sobre uma porção parcialmente desmineralizada, que recobre outra ainda totalmente mineralizada, o processo erosivo resulta no surgimento de uma camada superficial completamente orgânica, desprovida de minerais (MEURMAN; DRYSDALE; FRANK, 1991).

A presença dessa camada superficial desmineralizada, orgânica, pode proteger a dentina remanescente, dificultando a progressão da erosão até certo ponto (KLETER et al., 1994; KLONT; TEN CATE, 1991). Porém, tal camada pode ser degradada mecânica e, por ser composta principalmente por colágeno (90%), quimicamente, por enzimas do próprio hospedeiro, como as metaloproteinases da matriz (MMPs), que estão presentes tanto na saliva quanto nos tecidos duros dentários (GANSS; KLIMEK; STARCK, 2004; GANSS et al., 2007; HANNAS et al.,

2007; HARA et al., 2005; KATO et al., 2009; KATO et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2009b; VISSE; NAGASE, 2003).

As MMPs compreendem um grupo de enzimas capazes de degradar quase todas as proteínas da matriz extracelular, incluindo o colágeno nativo e desnaturado (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006; HANNAS et al., 2007). Especialmente a collagenase MMP-8 e as gelatinases MMPs -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. As formas latentes destas enzimas tornam-se ativas com a queda do pH na presença de ácidos, como os provenientes de desafios cariogênicos, e passam a agir diante da neutralização posterior do meio (TJÄDERHANE et al., 1998).

Sugere-se, consistentemente, que a atividade das MMPs também esteja envolvida na degradação do colágeno não protegido pela incompleta infiltração de monômeros resinosos na dentina condicionada por ácido, o que poderia explicar a degradação progressiva da camada híbrida observada em inúmeros estudos *in vitro* e *in vivo* (BRESCHI et al., 2010b; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; HASHIMOTO et al., 2000; HEBLING et al., 2005; LOGUERCIO et al., 2009; MAZZONI et al., 2006; DE MUNCK et al., 2003; NISHITANI et al., 2006; PASHLEY et al., 2004; TAY; PASHLEY, 2004a). A atividade proteolítica persistente exibida nos substratos dentinários humanos desmineralizados e não completamente infiltrados por adesivos, na ausência de bactérias, foi previamente associada com uma degradação morfológica das fibrilas de colágeno (PASHLEY et al., 2004).

No entanto, também foi demonstrado que a atividade proteolítica na dentina pode ser fortemente reduzida pelo uso da clorexidina (GENDRON et al., 1999), um potente inibidor de MMPs. A clorexidina (CHX) previne ou minimiza a autodegradação das fibrilas de colágeno expostas em camadas híbridas não completamente formadas (CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; HEBLING et al., 2005), contribuindo, portanto, para a estabilidade, em longo prazo, da resistência de união de materiais resinosos à dentina.

Nesse contexto, é importante considerar que não apenas dentes comprometidos pela cárie, mas também aqueles comprometidos pela erosão, principalmente nos estágios mais avançados, em que há exposição dentinária, são frequentemente restaurados para impedir a progressão do desgaste, proteger e

aumentar a resistência do remanescente dentário e reduzir a hiperestesia dentinária (BADER et al., 1993).

Todavia, apesar do exposto, até o momento os estudos têm se limitado a avaliar o papel da clorexidina na qualidade da união dos materiais resinosos à dentina normal ou afetada por cárie apenas (BRESCHI et al., 2010b; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; HEBLING et al., 2005; KOMORI et al., 2009; LOGUERCIO et al., 2009). Com os resultados obtidos, perspectivas positivas podem decorrer deste tratamento para o substrato dentinário erodido, sabidamente desfavorável aos procedimentos restauradores adesivos (ZIMMERLI et al., 2012).

Ainda, concentrações relativamente elevadas de CHX têm sido consideradas na maioria dos estudos relacionados à avaliação da preservação da interface adesiva ao longo do tempo (BRESCHI et al., 2010b; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; HEBLING et al., 2005; KOMORI et al., 2009). Apesar do êxito avaliado, há de se considerar os possíveis efeitos tóxicos sobre o complexo dentinopulpar. Souza et al. (2007) mostraram que uma solução de CHX a 0,02%, quando aplicada diretamente sobre células odontoblastóides em cultura, apresentou alta toxicidade, mas que concentrações menores, tais como 0,0024% e 0,004% causaram apenas leves e aceitáveis efeitos citotóxicos às mesmas. Soluções de CHX a 1%, a 0,2% e a 0,12%, através da dentina, apresentaram, por sua vez, toxicidade média. Somente a solução de CHX a 2%, através de apenas 0,2 mm de dentina, provocou diminuição relevante do metabolismo celular (LESSA et al., 2010b).

Pode-se depreender que, se concentrações mínimas de CHX forem suficientes para prevenir a degradação da camada híbrida, seu uso, previamente à aplicação de um sistema adesivo, poderá ser realizado com maior segurança.

Apesar dos poucos trabalhos avaliando, indiretamente, o papel das MMPs na erosão dentinária (KATO et al., 2009; KATO et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2009b), acredita-se que ele possa estar relacionado a implicações relevantes na evolução e tratamento de tal comprometimento e, portanto, o presente estudo se propõe a avaliar o efeito da aplicação de soluções de clorexidina, em diferentes concentrações, na preservação da qualidade da união de uma resina composta ao substrato dentinário erodido e, para estabelecimento de comparações, ao substrato dentinário normal.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DESGASTE DENTÁRIO

A erosão é um processo que, ao progredir, resulta em desgaste da estrutura dentária e deve ser diferenciada dos outros tipos de perda não cariosa de esmalte e/ou dentina. Vale ressaltar, então, que “desgaste dentário” é um nome genérico atribuído à combinação dos processos de abrasão, atrição, abfração e erosão; ou quando o diagnóstico específico não pode ser determinado (ABRAHAMSEN, 2005; BARLETT; PHILLIPS; SMITH, 1999; FEDERLIN et al., 1998; JENSDOTTIR et al., 2004; MEURMAN; FRANK, 1991a; PIOTROWSKI; GILLETTE; HANCOCK, 2001; SMITH; KNIGHT, 1984).

A abrasão pode ocorrer por processo friccional mecânico que não resulte da mastigação como, teoricamente, pela escovação inadequada e pelo uso de dentifrícios abrasivos. É o desgaste patológico do dente, provocado por um processo mecânico anormal (ECCLES, 1982; IMFELD, 1996; LITONJUA et al., 2003; OGinni; OLUSILE, 2002; PIOTROWSKI; GILLETTE; HANCOCK, 2001; SMITH, 1989). A atrição é o resultado da oclusão dentária e envolve, portanto, o contato entre dentes antagonistas, seja em situações funcionais, seja em situações parafuncionais (BARLETT; PHILLIPS; SMITH, 1999; ECCLES, 1982; IMFELD, 1996; KHAN et al., 1999; LITONJUA et al., 2003; PIOTROWSKI; GILLETTE; HANCOCK, 2001; SMITH, 1989). A abfração é, em teoria, resultante de forças oclusais da mastigação e da parafunção mastigatória, que levam à degradação das estruturas mineralizadas do dente à distância dos pontos de contato oclusal (BARRON et al., 2003; BORCIC et al., 2005; GRIPPO, 1991; GRIPPO, 1992; GRIPPO, 1996; IMFELD, 1996; LEE; EAKLE, 1984; MASEKI; TANAKA, 2006; REES, 2006; REES; JAGGER, 2003; SPRANGER, 1995; TANAKA et al., 2003; TELLES; PEGORARO; PEREIRA, 2000; TELLES; PEGORARO; PEREIRA, 2006). Já a erosão é definida como uma perda progressiva dos tecidos dentários, após seu amolecimento superficial, causada, sobretudo, por um processo químico, decorrente da ação de ácidos intrínsecos ou extrínsecos, que não envolve a ação bacteriana (BARTLETT; GANSS; LUSSI, 2008; ECCLES, 1979; FEDERLIN et al., 1998; HONÓRIO et al., 2008b; IMFELD, 1996;

JENSDOTTIR et al., 2004; KATO et al., 2009b; LUSSI, 1996; LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004; MEURMAN; TEN CATE, 1996; PIANGPRACH et al., 2009; RIOS et al., 2007; RIOS et al., 2009; SERRA; MESSIAS, TURSSI, 2009; SPREAFICO, 2010; YIP; SMALES; KAIDONIS, 2003; ZERO, 1996).

Geralmente, não é possível identificar a exata etiologia do desgaste dentário, já que os fenômenos descritos acima não raras as vezes ocorrem em combinação, mesmo que com efeitos proporcionalmente diferentes (ABRAHAMSEN, 2005; LUSSI, 1996; LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004; MAHONEY; KILPATRICK, 2003; NUNN; SHAW; SMITH, 1996).

A expressão “desgaste dentário” pode ser, deste modo, usada como uma descrição genérica até que um diagnóstico mais preciso possa ser estabelecido. Já o termo “desgaste dentário patológico” tem sido usado para descrever o estado em que a destruição dentária afeta a estética ou a função dos dentes, ou causa desconforto e/ou dor, tornando as intervenções terapêuticas necessárias. Independentemente do fator etiológico, o desgaste dentário patológico, que acomete inicialmente o esmalte, pode avançar até a dentina e prejudicar mecânica e biologicamente o elemento dentário envolvido (BARLETT; PHILLIPS; SMITH, 1999; ECCLES, 1982; KAIDONIS, 2008).

O desgaste dentário tem sido considerado, assim, um problema comum, cuja prevalência, estudada por Smith e Robb (1996), gira em torno dos 97% de acometimento da população, independentemente da faixa etária considerada. No sudeste da Inglaterra, foram avaliados 1007 voluntários e, neste estudo, constatou-se que apenas 9 deles tinham todos os dentes livres de qualquer tipo de desgaste, sendo que mais de 93500 faces dentárias foram observadas e, destas, 5,1% apresentaram desgaste que ultrapassava os níveis de normalidade.

A importância da perda superficial de estrutura dentária pelo desgaste tem crescido, com o passar do tempo, já que a odontologia tem obtido grande sucesso na prevenção da cárie e também os dentes têm sido conservados por mais tempo durante a vida das pessoas (ECCLES, 1982). O desgaste dentário é um processo cumulativo que pode resultar em uma perda substancial da superfície dentária (OGINNI; OLUSILE, 2002; SMITH; KNIGHT, 1984; WOOD et al., 2008). Enquanto alguns autores acreditam que a abrasão e a atrição tendem a predominar como causa de comprometimento nos pacientes idosos e que a erosão acomete, principalmente, os pacientes jovens, outros acreditam que a erosão dentária

predispõe à perda de estrutura dentária tanto os pacientes jovens quanto os mais velhos. Os dentes de uma criança de doze anos de idade devem ter uma aparência diferente da dos dentes de um indivíduo de sessenta anos e uma lesão que envolva dentina pode ser considerada patológica em um adolescente, mas interpretada como uma reação natural de desgaste em idades mais avançadas (GANSS; KLIMEK; GIESE, 2001). De qualquer forma, o desgaste dentário patológico pode ser identificado não apenas em pacientes de meia-idade ou idosos, mas também dentre os jovens (BARLETT; PHILLIPS; SMITH, 1999; IMFELD, 1996; LAMBRECHTS et al., 1996; MILLWARD et al., 1994).

Estudos epidemiológicos demonstram, ainda, que a prevalência do desgaste dentário está aumentando, à medida que os dentes permanecem por mais tempo na boca (HUGOSON et al., 1988; SALONEN; HELLDÉN; CARLSSON, 1990; RAFEEK et al., 2006; VAN'T SPIJKER et al., 2009). O aumento desta prevalência é proporcional ao avanço da idade dos pacientes, uma vez que a evolução de um processo degenerativo dessa natureza sofre influência do tempo em que os estímulos atuam sobre os dentes. A porcentagem de adultos com desgaste dentário severo aumenta de 3% aos 20 anos para 17% aos 70 anos (VAN'T SPIJKER et al., 2009). Tem sido reportado, entretanto, um número expressivo de lesões, erosivas em particular, em pacientes jovens (JAEGGI; LUSSI, 2006; VAN'T SPIJKER et al., 2009). Dados referentes à prevalência do desgaste dentário em crianças e adolescentes são abundantes (VAN'T SPIJKER et al., 2009). Negoro e colaboradores (1998), por exemplo, relataram que a perda de estrutura dentária é maior em pacientes com menos de 26 anos de idade, do que naqueles na faixa etária entre 30 e 55 anos.

De qualquer forma, de acordo com o conhecimento vigente, o desgaste dentário em qualquer indivíduo, idoso ou jovem, tende a ser multifatorial, sendo dificilmente ocasionado por um único fator etiológico (BARLETT; PHILLIPS; SMITH, 1999; BARTLETT; SHAH, 2006; IMFELD, 1996; LAMBRECHTS et al., 1996; MILLWARD et al., 1994). Uma causa, entretanto, deve ser predominante (OGINNI; OLUSILE, 2002).

Grande ênfase tem sido, então, atualmente, atribuída à perda tecidual resultante do contato frequente com ácidos que promovem a erosão da superfície dentária. Um alto consumo de bebidas e alimentos ácidos e um aparente aumento da prevalência dos distúrbios gastrointestinais, especialmente das desordens

alimentares que resultam no contato frequente dos dentes com o conteúdo gástrico, parecem ser destacáveis fatores de risco à destruição não cariada dos dentes (TEN CATE; IMFELD, 1996). Nesse sentido, a literatura tem atribuído especial atenção ao estudo da relação entre os possíveis fatores etiológicos da erosão e os diferentes substratos dentários e/ou restauradores sobre os quais os mesmos podem atuar (BADRA et al., 2005; FRANCISCONI et al., 2008; GRANDO et al., 1996; HONÓRIO et al., 2008; GANSS et al., 2007; LUSSI; JAEGG, 2008; MEURMAN; DRYSDALE; FRANK, 1991; MEURMAN; TEN CATE, 1996; MEURMAN; VESTERINEN, 2000; WILDER-SMITH et al., 2009).

Para um cirurgião-dentista é, portanto, importante detectar o principal motivo do desgaste dentário para a implementação de medidas preventivas e terapêuticas adequadas (BARTLETT; GANSS; LUSSI, 2008; CERUTI et al., 2006; HOOPER et al., 2004; LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004; PIOTROWSKI; GILLETTE; HANCOCK, 2001).

2.2 EROSÃO DENTÁRIA

O termo erosão é derivado do verbo latino *erodere*, *erosi*, *erosum* e se refere à destruição gradual de uma superfície, usualmente por um processo químico ou eletrolítico (LITONJUA et al., 2003). Em geologia, os resultados de tais processos são denominados “corrosão”, e esse, de fato, pode ser um termo mais adequado para descrever os efeitos dinâmicos da ação de substâncias ácidas, por exemplo, sobre as estruturas dentárias (GRIPPO, 2007; GRIPPO; SIMRING; SCHREINER, 2004; WEST; DAVIES; AMAECHI, 2011). Todavia, convencionou-se chamar o processo químico de amolecimento superficial seguido, usualmente, de remoção patológica, crônica, localizada, dolorosa e irreversível de tecido duro dentário, na ausência da ação direta do biofilme, de erosão dentária (WEST; DAVIES; AMAECHI, 2011). A perda tecidual promovida pela erosão pode ser decorrente de um processo de quelação, em pH aproximadamente neutro, mas, de maneira geral, o agente etiológico é um ácido (BRUNTON; HUSSAIN, 2001; ECCLES, 1982; KHAN et al., 1999; LUSSI; JAEGGI; SCHARER, 1993; PIOTROWSKI; GILLETTE; HANCOCK, 2001; SMITH, 1989). Não apenas tal acidez é relevante; deve-se considerar, ainda,

o que representa a ação mecânica do fluxo do agente erosivo ao seu respectivo potencial de desgaste (GRIPPO, 2007; GRIPPO; SIMRING; SCHREINER, 2004).

A erosão dentária pode ser denominada extrínseca, intrínseca ou idiopática, de acordo com a procedência dos ácidos que a provocam, que pode ser de fonte exógena, endógena ou desconhecida, respectivamente (ABRAHAMSEN, 2005; BARTLETT; GANSS; LUSSI, 2008; IMFELD, 1996; LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004; MEURMAN; TEN CATE, 1996; MOSS, 1998; SPREAFICO, 2010; WILDER-SMITH et al., 2009; ZERO, 1996).

A erosão extrínseca é o resultado da ação de ácidos de origem exógena, que podem estar presentes na atmosfera ambiental, como os ácidos industriais, ou em piscinas, por exemplo, em função do uso do gás de cloro, que reage com a água formando o ácido hidrocloreídrico. Empregados de fábricas de baterias, aqueles que se encontram expostos a processos eletrolíticos e também outros trabalhadores que permanecem por longos períodos em contato com uma atmosfera contaminada por vapor ácido tendem a apresentar lesões de erosão dentária (BARLETT; PHILLIPS; SMITH, 1999). Casos severos de erosão extrínseca também têm sido relacionados à administração oral de medicamentos ácidos, como os tônicos de ferro, o ácido acetil salicílico e aqueles contendo ácido hidrocloreídrico, utilizados para o tratamento de distúrbios estomacais (HELLWIG; LUSSI, 2006). Os ácidos da dieta são, entretanto, o principal fator etiológico da erosão extrínseca (TEN CATE; IMFELD, 1996). Diversos estudos confirmam que a dieta pode ser realmente importante no desenvolvimento e progressão da erosão dentária (ECCLES, 1979; ECCLES, 1982a; ECCLES, 1982b; ECCLES; JENKINS, 1974; LUSSI; JAEGGI, 2008; MILLWARD et al., 1994; NUNN, 1996). Indivíduos com erosão avançada relataram ingerir quatro ou mais porções de alimentos ácidos por dia, além de usar escova de dente rígida e exibir uma capacidade tampão reduzida da saliva estimulada (LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004; LUSSI; JAEGGI; SCHARER, 1993).

As fontes de ácido relacionadas à dieta são muitas e variadas. Disseminou-se, provavelmente pelo aumento do número de pessoas praticando exercícios físicos prolongados, regulares e intensos, o consumo das bebidas esportivas. Tais bebidas apresentam, geralmente, um baixo pH e uma acidez variável, propriedades relevantes frente ao desenvolvimento da erosão dentária (HOOPER et al., 2004). O ácido cítrico, encontrado nas frutas e bebidas cítricas, em compostos de vitamina C e como aditivo em bebidas carbonatadas, é, ainda, um dos

mais potentes agentes erosivos encontrados nos alimentos, já que quela o cálcio da hidroxiapatita, aumentando sua suscetibilidade à dissolução. A perda tecidual decorrente da erosão dentária também está relacionada ao consumo regular de chás, como o preto e o de ervas, e sua severidade parece ser inversamente proporcional ao pH do respectivo chá (BRUTON; HUSSAIN, 2001).

Não apenas essas, mas outras fontes de ácidos advindos da dieta podem estar relacionadas ao surgimento e à progressão da erosão dentária. De maneira geral, o que determina o potencial erosivo de cada uma delas são os valores de pH e a constante de dissociação do ácido envolvido, bem como sua capacidade tampão e composição química, e a quantidade de cálcio, fosfato e flúor que contém (EDWARDS et al., 1999; GROBLER; VAN DER HORST, 1982; LARSEN; NYVAD, 1999; LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004; MEURMAN; FRANK, 1991a; VON FRAUNHOFER; ROGERS, 2004). Refrigerantes, por exemplo, podem conter vários tipos de ácidos, que contribuem, dentre outras coisas, ao estabelecimento de um baixo pH (TAHMASSEBI et al., 2006).

De acordo com a literatura científica, o crescente consumo das bebidas carbonatadas é um dos principais fatores responsáveis pelo aumento da prevalência da erosão dentária nos últimos 35 anos (AL-DLAIGAN; SHAW; SMITH, 2001; AMAECHI; HIGHAM, 2001; TAHMASSEBI et al., 2006). Essas bebidas contêm ácido carbônico, advindo do dióxido de carbono em solução. Mesmo quando esse último composto é eliminado e a bebida torna-se “insípida”, seu pH permanece baixo (GROBLER; VAN DER HORST, 1982; TAHMASSEBI et al., 2006). Isso mostra que os refrigerantes têm uma acidez inerente, em função da presença de ácidos que são adicionados para incitar o sabor. Esses ácidos incluem o fosfórico, especialmente, e o cítrico, presentes nas bebidas à base de cola, e o carbônico, sob pressão, nas bebidas gaseificadas de maneira geral (BIRKHED, 1984; TAHMASSEBI et al., 2006). Inúmeros trabalhos comprovam que bebidas à base de cola, como a Coca-Cola®, por exemplo, são claramente erosivas (LARSEN; NYVAD, 1999; LUSSI et al., 2000; LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004; LUSSI; JÄGGI; SCHÄRER, 1993; MEURMAN; FRANK, 1991b; WEST; HUGHES; ADDY, 2001). Esse tipo de refrigerante, apesar de apresentar capacidade tampão inferior à apresentada por sucos de frutas e conter, principalmente, ácido fosfórico, potencialmente menos erosivo que o ácido cítrico, apresenta, além da baixa concentração de cálcio, fosfato e flúor, um dos

menores valores de pH dentre as bebidas ácidas (LARSEN; RICHARDS, 2002; WEST; HUGHES; ADDY, 2001).

Quanto à erosão intrínseca, é o resultado da ação de ácidos endógenos, advindos do interior do próprio organismo, como os contidos no suco gástrico (ácido clorídrico, principalmente), que atingem a cavidade bucal durante o vômito, a regurgitação ou o refluxo. Desordens alimentares de ordem psicossomática, como a anorexia ou a bulimia nervosas, são frequentemente as causas de regurgitação ou vômito induzidos. As causas de origem somática incluem a gravidez, o alcoolismo, a terapia para o abuso de álcool, disfunções gástricas, obstipação crônica, hérnia de hiato, úlcera péptica e de duodeno e o refluxo gastresofágico (AMAECHI, HIGHAM, 2005; IMFELD, 1996; JENSDOTTIR et al., 2004; MEURMAN; TEN CATE, 1996; STEGE, VISCO-DANGLER; RYE, 1982; TAHMASSEBI et al., 2006; ZERO, 1996; ZERO; LUSSI, 2005).

Já a erosão idiopática é o resultado da ação de ácidos de origem desconhecida, uma patologia para a qual nem mesmo anamnese, exame clínico e/ou exames complementares são capazes de esclarecer a origem do fator etiológico (IMFELD, 1996; LITONJUA et al., 2003).

Além de ser baseado fundamentalmente na ação químico-mecânica de ácidos, de origem exógena, endógena ou desconhecida, sobre a estrutura dentária, o mecanismo de desenvolvimento da erosão ainda está diretamente relacionado a fatores biológicos e comportamentais (LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004; MOSS, 1998; OGinni; OLUSILE, 2002). A anatomia e composição dos dentes, sua posição nos arcos dentários, a fisiologia dos tecidos moles e o papel da saliva modulam o estabelecimento e progressão das lesões erosivas (OGinni; OLUSILE, 2002). A saliva em pH neutro, por exemplo, encontra-se supersaturada em íons cálcio e fosfato, o que preserva a integridade da apatita do esmalte. Com a queda do pH, que é crítico ao esmalte e à dentina se equivalente a 5,5-5,7 e a 6,2-6,5, respectivamente, a quantidade de cálcio e fosfato presente na saliva torna-se exatamente saturada em relação à formação da apatita. Abaixo desses valores, a saliva torna-se, então, subsaturada em relação à apatita e o processo de dissolução do esmalte e/ou da dentina pode ocorrer. Assim, considerando-se também as demais propriedades salivares, bem como a capacidade tamponante do ácido e a frequência e duração do desafio erosivo, pode-se dizer que soluções em pH inferior a 5,5 podem iniciar a erosão por meio da desmineralização do esmalte (LITONJUA

et al., 2003; MEURMAN; TEN CATE, 1996). A saliva exerce, ainda, função protetora, diluindo e lavando, bem como neutralizando e tamponando, agentes potencialmente erosivos e possibilitando a formação da película adquirida (MOSS, 1998). Hábitos, muitas vezes determinados pelo nível socioeconômico e estilo de vida de um indivíduo (MILLWARD; SHAW; SMITH, 1994), tais como a ingestão de bebidas ácidas durante a noite e as práticas de higiene, particularmente o momento, a duração e a frequência de escovação e o uso de dentífrico abrasivo, também podem influenciar no desenvolvimento da erosão dentária (AL-DLAIGAN; SHAW; SMITH, 2002). Ainda, os agentes branqueadores podem aumentar a suscetibilidade à erosão, que pode ser relacionada, da mesma maneira, ao uso de cocaína intraoral, como apontam alguns estudos (AL-DLAIGAN; SHAW; SMITH, 2002; BASSIOUNY; ZARRINNIA, 2004; DRISCOLL; 2003; KRUTCHKOFF et al., 1990; NIXON; YOUNGSON; BEESE, 2002).

Clinicamente, a erosão dentária manifesta-se, de modo geral, como lesões côncavas e arredondadas, sem as rugosidades características das lesões de cárie. Seus primeiros sinais são o amolecimento da superfície dentária, que se torna lisa, polida e brilhante, ou, ainda que sem brilho, com as periquimáceas ausentes (LUSSI; JAEGGI, 2008; WANG; LUSSI, 2010). Nos estágios mais avançados pode ocorrer mudança da morfologia dentária pelo alisamento da superfície ou desenvolvimento de concavidades, cuja extensão excede a profundidade, sendo estas denominadas “*cuppings*”. Tipicamente, uma borda de esmalte intacto pode ser observada ao longo da margem cervical dos dentes erodidos, provavelmente por causa da presença do biofilme dentário remanescente, que impede a difusão dos ácidos, ou do efeito neutralizante do fluido tissular proveniente do sulco gengival (LUSSI; JAEGGI, 2008). O ataque ácido contínuo pode resultar, ainda, na formação de margens pseudochanfradas na superfície erodida. Na superfície oclusal, um arredondamento das cúspides, ou a formação de concavidades nas mesmas, e ilhas de material restaurador acima da superfície dentária adjacente podem ser observados. Nos casos severos, toda a morfologia oclusal pode desaparecer (DAVIS; WINTER, 1997; LITONJUA et al., 2003; LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004).

Diante dessa realidade, na tentativa de reduzir danos maiores, ações estratégicas de prevenção, controle e tratamento devem ser implementadas (AMAECHI; HIGHAM, 2005; BASSIOUNY; ZARRINNIA, 2004; LAMBRECHTS et al.,

1996; MAGALHÃES et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2009c; REIS; HIGASHI; LOGUERCIO, 2009; RIOS et al., 2006b).

O aspecto mais importante no manejo da erosão dentária é o diagnóstico precoce (LUSSI et al., 2011). Se o agente etiológico for eliminado e/ou se a perda tecidual, moderada e não envolvendo dentina, for controlada por medidas preventivas, a necessidade do tratamento restaurador/reabilitador, que pode ser pouco efetivo se os fatores etiológicos persistirem (KILPATRICK; MAHONEY, 2004), torna-se menos frequente (GANSS; KLIMEK; GIESE, 2001; SMITH; KNIGHT, 1984).

Para minimizar a progressão da erosão dentária e seus possíveis efeitos deletérios (LAMBRECHTS et al., 1996; LITONJUA et al., 2003), dentre outras alternativas, cabe instruir o paciente a modificar seus padrões comportamentais e de dieta (AMAECHI; HIGHAM, 2005; JOHANSSON et al., 2004), tentar aumentar a resistência dos tecidos dentários aos agentes ácidos (BASSIOUNY; ZARRINNIA, 2004) e estimular o aumento do fluxo salivar (RIOS et al., 2006a; RIOS et al., 2006b), bem como controlar o potencial erosivo dos produtos ácidos, por meio da adição de íons cálcio e fosfato, de ferro e mesmo de flúor aos mesmos, por exemplo (HARA; ZERO, 2008; MAGALHÃES et al., 2009a; TAHMASSEBI et al., 2006). Reduzir o contato dos dentes com alimentos, bebidas e demais substâncias ácidas é, obviamente, um dos cuidados mais efetivos (LITONJUA et al., 2003).

Quando a implementação de todas as possíveis medidas preventivas não for suficiente para controlar a progressão da erosão, quando a estética tornar-se insatisfatória, quando a hiperestesia dentinária estiver presente ou quando o desgaste atingir níveis extremos, relacionados à exposição e ao comprometimento da dentina, o tratamento restaurador/reabilitador estará, então, indicado (KILPATRICK; MAHONEY, 2004; LAMBRECHTS et al., 1996).

Restaurações de resina composta representam, nesse contexto, uma ótima escolha para tratamento dos comprometimentos moderados a intermediários e, prevenindo a progressão do desgaste, chegam a impedir que uma reabilitação protética extensa seja necessária (DIETSCHI; ARGENTE, 2011; IBSEN; OUELLET, 1992; LAMBRECHTS et al., 1996; MARAIS, 1998). Apesar das conhecidas limitações das restaurações adesivas, as de resina composta representam uma solução relativamente permanente e de longa duração. As vantagens de sua utilização estão relacionadas a uma abordagem altamente conservadora, à possibilidade de reparo e substituição sem grandes dificuldades, e ao relativo baixo

custo (BARTLETT; SUNDARAM, 2006; DIETSCHI; ARGENTE, 2011; HEMMINGS; DARBAR; VAUGHAN, 2000). Estudos clínicos têm mostrado que seu desempenho, nesses casos, é adequado e que a complicação mais provável são pequenas fraturas, que podem ser, antes que a restauração seja substituída, facilmente reparadas (DIETSCHI; ARGENTE, 2011; HEMMINGS; DARBAR; VAUGHAN, 2000; POYSER et al., 2007; REDMAN; HEMMINGS; GOOD, 2003). Além disso, não sofrem alterações inaceitáveis (desgaste e perda de dureza superficial) quando submetidas a desafios erosivos, ainda que prolongados, *in vitro* ou *in situ* (FRANCISCONI et al., 2008; HONÓRIO et al., 2008; RIOS et al., 2008). Por esses e outros motivos é que a restauração direta com resinas compostas é tão bem indicada para tratamento dos diversos comprometimentos causados pela erosão dentária (DIETSCHI; ARGENTE, 2011; LAMBRECHTS et al., 1996).

Independentemente da origem do ácido que a provoca, dos fatores que podem modular sua instalação e evolução, da forma como se manifesta clinicamente e da estratégia de prevenção, controle e/ou tratamento que exige, vale ressaltar que a erosão dentária acontece por meio de um processo de desmineralização, relacionado à ligação de íons hidrogênio, liberados por produtos ácidos na presença de água, aos íons carbonatos ou fosfatos da estrutura dentária, ou à ligação de ânions ao cálcio, formando outros complexos (BARBOUR et al., 2005; LARSEN 1991). Por conseguinte, no esmalte, a hidroxiapatita é perdida para o ambiente bucal, resultando em um desarranjo molecular e na desestruturação da organização prismática. O amolecimento superficial do mesmo, num primeiro estágio, pode ser revertido pela ação remineralizadora da saliva. Se o estímulo erosivo persiste, em um segundo estágio, a superfície torna-se muito frágil e pode ser irreversivelmente perdida. Daí em diante, a evolução do processo erosivo em esmalte torna-se cíclica, repetindo-se sucessivamente os estágios descritos, até que a dentina subjacente seja exposta (VORONETS; WANG, 2010).

Então, os minerais da região de união entre as dentinas peri e intertubular são inicialmente liberados; em sequência, a dentina peritubular é perdida e os túbulos dentinários são ampliados. Finalmente, por meio do ataque à dentina intertubular, que se torna rugosa e porosa, o processo erosivo deixa, de modo variável de região para região, uma camada superficial orgânica completamente desmineralizada, recobrendo uma zona parcialmente desmineralizada, sobre a dentina ainda totalmente mineralizada (MEURMAN; DRYSDALE; FRANK, 1991).

Analogamente, quando uma lesão de cárie se estabelece em dentina, o conteúdo mineral da região peritubular é completamente perdido (JONES; BOYDE, 1987), ainda que o intratubular possa ser relativamente resistente à desmineralização. Também, os microrganismos cariogênicos atuam do interior dos túbulos, onde ficam alojados, através da dentina peritubular, sobre a dentina intertubular, causando, por fim, sua desmineralização (FRANK, 1990). Assim, Meurman, Drysdale e Frank (1991) sugerem que a sequência de desmineralização da dentina na erosão é similar à que acontece na cárie dentária. Ambos os fenômenos podem ser classificados como difusão-dependentes (SCHLUETER et al., 2007), em contraste com o que se processa no estabelecimento e progressão da erosão em esmalte, predominantemente um fenômeno de superfície (VORONETS; WANG, 2010).

Vale destacar, porém, que a erosão em dentina distingue-se da cárie já que o ataque ácido não é causado por microrganismos e é, em si, muito mais intenso. Em uma lesão de cárie, ainda, as reações do complexo dentinopulpar modulam sua evolução por meio de respostas características, como a esclerose dentinária, que pode acelerar o processo de formação normal da dentina peritubular e promover a completa obliteração dos túbulos dentinários (FRANK; VOEGEL, 1980).

Independentemente das particularidades relacionadas à evolução de ambos os comprometimentos, as estruturas dentárias desmineralizadas por agentes erosivos tornam-se suscetíveis, ainda, à ação de forças físicas, que exerceriam pouco ou nenhum efeito sobre tecidos intactos, mesmo que para a dentina a duração da força mecânica necessária à remoção de tecido deva ser maior, provavelmente em função da presença da matriz colágena, orgânica, que pode, até certo ponto, proteger a dentina remanescente, dificultando a progressão da erosão (ATTIN et al., 2004; GANSS et al., 2007; KATO et al., 2009; KATO et al., 2010; MAZZONI et al., 2007). A taxa de desmineralização da dentina diminui com o aumento da quantidade de colágeno exposto; logo, a presença dessa matriz orgânica dificulta a difusão iônica até a dentina subjacente (KATO et al., 2009; KATO et al., 2010; KLETER et al., 1994; KLONT; TEN CATE, 1991). No entanto, suspeita-se que ela possa ser degradada não apenas mecanicamente, mas também por meio de processos químicos, o que contribuiria para com a progressão do desgaste

dentário (GANSS et al., 2007; GANSS; KLIMEK; STARCK, 2004, HARA et al., 2005; KATO et al., 2009; KATO et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2009b).

2.3 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA NA EROSÃO DENTÁRIA E NA DENTINA DE MANEIRA GERAL

Apesar de serem poucos os estudos que investigam o papel da degradação química da camada superficial desmineralizada na progressão da erosão em dentina (GANSS; KLIMEK; STARCK, 2004, HARA et al., 2005; KATO et al., 2009; KATO et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2009b), alguns autores mostraram que a remoção dessa matriz orgânica pela ação de enzimas proteolíticas resulta na potencialização dos efeitos da desmineralização (GANSS; KLIMEK; STARCK, 2001; KLETER et al., 1994).

A pepsina, por exemplo, enzima proteolítica que atinge a cavidade bucal durante o refluxo ou vômito, pode representar uma ameaça à matriz orgânica exposta (KLETER et al., 1997; TONAMI; ERICSON, 2005), já que é capaz de degradar o colágeno de vários tecidos. Presume-se, a partir desta constatação e da avaliação de pacientes bulímicos, que ela contribui à progressão da erosão dentinária promovida por fatores etiológicos intrínsecos (SCHLUETER et al., 2007). Outras enzimas presentes no vômito, tais como a tripsina, ou na saliva exercem influência nessa degradação, conferindo maior complexidade ao processo (SCHLUETER et al., 2007).

Sugere-se, ainda, que a degradação da matriz orgânica exposta na erosão dentinária também seja decorrente da ação de enzimas do próprio hospedeiro, como as metaloproteinases, similarmente ao que ocorre na cárie dentária (DUNG et al., 1995; GANSS; KLIMEK; STARCK, 2004, HARA et al., 2005; KATO et al., 2009; KATO et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2009b; TJÄDERHANE et al., 1998).

As metaloproteinases da matriz (MMPs), coletivamente conhecidas como matrixinas, são um grupo de enzimas multigênicas da classe metaloproteinácea das endopeptidases que mediam a degradação de quase todas as proteínas da matriz extracelular, incluindo o colágeno nativo e desnaturado (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006; HANNAS et al., 2007; VISSE; NAGASE, 2003).

Até o momento, 24 MMPs diferentes foram identificadas, das quais 23 são encontradas em seres humanos (NUTTALL et al., 2004; VISSE; NAGASE, 2003). Coletivamente, essas endopeptidases cálcio-dependentes e zinco-ativadas (VISSE; NAGASE, 2003), por meio da degradação de quase todos os componentes proteicos da matriz extracelular, facilitam a remodelação tecidual e a migração celular (STERNLICHT; WERB, 2001; VU; WERB, 2000). Dentre elas, a MMP-8 é a principal collagenase da dentina humana (SULKALA et al., 2007). As gelatinases MMP-2 e MMP-9, bem como a enamelisina MMP-20 e a estromelisina MMP-3, também são aprisionadas à dentina mineralizada durante o desenvolvimento dentário (BOUKPESSI et al., 2008; BOUSHELL et al., 2008; MARTIN-DE LAS HERAS; VALENZUELA; OVERALL, 2000; MAZZONI et al., 2006; MAZZONI et al., 2007; MAZZONI et al., 2009; SULKALA et al., 2002; SULKALA et al., 2006; SULKALA et al., 2007; TJÄDERHANE et al., 1998; VAN STRIJP et al., 2003).

São algumas dessas as enzimas que desempenham papel fundamental na degradação do colágeno em lesões de cárie (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006; HANNAS et al., 2007; MARTIN-DE LAS HERAS; VALENZUELA; OVERALL, 2000; MAZZONI et al., 2009; TJÄDERHANE et al., 1998), já que tal atividade não é atribuída às bactérias, que podem causar a desmineralização da superfície da dentina, mas não a degradação da matriz orgânica, necessária à formação da cavidade (KATZ; PARK; PALENIK, 1987; TJÄDERHANE et al., 1998; VAN STRIJP; VAN STEENBERGEN; TEN CATE, 1997). A adição de enzimas proteolíticas externas é indispensável à sua degradação em lesões cariosas estabelecidas *in vitro* (KATZ; PARK; PALENIK, 1987; KAWASAKI; FEATHERSTONE, 1997), o que ratifica seu papel no desenvolvimento dessa patologia.

As MMPs são identificadas nas lesões de cárie dentária tanto na forma latente, quanto na forma ativa. As formas latentes destas enzimas tornam-se ativas com a queda do pH na presença de ácidos, como os provenientes dos desafios cariogênicos (TJÄDERHANE et al., 1998) e, talvez, dos erosivos (GANSS; KLIMEK; STARCK, 2004; HARA et al., 2005; KATO et al., 2009; KATO et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2009b). A neutralização posterior, pela capacidade tampão da saliva, permite, então, que as MMPs ajam, degradando a matriz orgânica (TJÄDERHANE et al., 1998). Além disso, proteínas fosforiladas liberadas durante a desmineralização da matriz orgânica podem interagir com MMPs inibidas e reativá-las, aumentando a degradação. Dessa forma, a ativação das MMPs parece ser

crucial para a progressão da cárie em dentina. Indivíduos com uma alta concentração de MMPs na saliva, por exemplo, apresentam maior suscetibilidade à cárie dentária (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006).

Além de desempenhar importante papel no estabelecimento de lesões cariosas e, provavelmente, no de erosivas (GANSS; KLIMEK; STARCK, 2004; HARA et al., 2005; KATO et al., 2009; KATO et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2009b), as MMPs são fundamentais ao desenvolvimento e remodelação fisiológica e/ou patológica dos diferentes tecidos orais. Participam do processo de formação do esmalte e na fluorose (BARTLETT et al., 2004; CATERINA et al., 2002), têm sido identificadas na inflamação pulpar e periapical (GUSMAN; SANTANA; ZEHNDER, 2002; WAHLGREN ET AL., 2002), correlacionam-se fortemente com doenças periodontais (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993; EJEIL et al., 2003; MÄKELÄ et al., 1994), são componentes essenciais para o crescimento e invasão de tumores orais (SORSA; TJÄDERHANE; SALO, 2004), e, ainda, estão provavelmente envolvidas na degradação do colágeno não protegido pelo sistema adesivo na dentina condicionada por ácido, o que poderia explicar a diminuição, com o tempo, dos valores de resistência de união de resinas compostas à dentina, observada em inúmeros estudos *in vitro* e *in vivo* (BRESCHI et al., 2010b; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; HASHIMOTO et al., 2000; HEBLING et al., 2005; LOGUERCIO et al., 2009; MAZZONI et al., 2006; DE MUNCK et al., 2003; NISHITANI et al., 2006; PASHLEY et al., 2004; TAY; PASHLEY, 2004a).

Apesar de a adesão imediata à dentina ser satisfatória, a longevidade da interface adesiva torna-se questionável diante da ação de agentes físicos (forças oclusais e estresses decorrentes da expansão e contração relacionadas às mudanças de temperatura) e químicos sobre a mesma (ARMSTRONG et al., 2004; BRACKETT et al., 2005b; BRESCHI et al., 2008; GARCÍA-GODOY et al., 2007; DE MUNCK et al., 2003; DE MUNCK et al., 2005; NISHITANI et al., 2006; TAY et al., 2006). Sugere-se que a concentração decrescente de monômeros difundidos no interior da dentina condicionada por ácido e a subsequente eluição do adesivo a partir dos hidrogéis poliméricos hidroliticamente instáveis das camadas híbridas (CARRILHO et al., 2005; HASHIMOTO et al., 2002a; HASHIMOTO et al., 2003b; MALACARNE et al., 2006; DE MUNCK et al., 2003; TAY et al., 2002; WANG; SPENCER, 2003; YIU et al., 2005) deixariam as fibrilas de colágeno expostas e vulneráveis à degradação pelas MMPs (BRESCHI et al., 2010b; CARRILHO et al.,

2007a; HASHIMOTO et al., 2000; HASHIMOTO et al., 2003c; HEBLING et al., 2005; KOSHIRO et al., 2005; LOGUERCIO et al., 2009; MAZZONI et al., 2006; NISHITANI et al., 2006; PASHLEY, 2004).

Pashley et al. (2004) investigaram o efeito de enzimas proteolíticas na matriz dentinária desmineralizada armazenada em água, saliva artificial ou óleo e observaram que a degradação hidrolítica das fibrilas de colágeno ocorreu na ausência de colonização bacteriana. Sugeriram, então, que as MMPs presentes na matriz dentinária mineralizada tornaram-se ativas durante o condicionamento ácido e foram responsáveis pela degradação do colágeno da matriz em ambiente aquoso. Ao demonstrarem que a nanoinfiltração pode ocorrer, *in vivo*, na ausência de fendas na interface dente-resina, Ferrari e Tay (2003), mais uma vez, correlacionaram a degradação das fibrilas de colágeno incompletamente infiltradas por adesivos dentinários à ação de enzimas proteolíticas do próprio hospedeiro, e não à ação de enzimas bacterianas (NISHITANI et al., 2006; TAY et al., 2006). Avaliando, ainda, o papel da aplicação de inibidores de MMPs na dentina condicionada, Pashley e colaboradores (2004) consideraram que a prevenção da degradação das fibrilas de colágeno incompletamente infiltradas por monômeros resinosos durante a criação da camada híbrida seria uma estratégia valiosa na manutenção da qualidade de união de materiais restauradores resinosos à dentina.

A ausência de efeito dos inibidores de proteases incorporados à solução de armazenamento na prevenção da redução da resistência de união de uma resina composta à dentina indica que a mesma é, então, decorrente da inibição das MMPs intrínsecas à dentina (PASHLEY et al., 2004). O fato de o óleo mineral, usado como meio de armazenamento, inibir tanto a atividade das MMPs da dentina (PASHLEY et al., 2004), quanto a hidrólise da matriz polimerizada (CARRILHO et al., 2005b), e preservar tanto a resistência de união de uma resina à dentina, quanto a integridade da camada híbrida (CARRILHO et al., 2005a; GARCÍA-GODOY et al., 2007), comprova a natureza hidrolítica do fenômeno.

Assim, a literatura voltou seus esforços ao estudo da inibição da atividade proteolítica na dentina, não apenas diante da erosão dentária (KATO et al., 2009; KATO et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2009b), mas também em outras circunstâncias, como, destacadamente, as relacionadas à odontologia adesiva (BRESCHI et al., 2009; BRESCHI et al., 2010a; BRESCHI et al., 2010b; CARRILHO

et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; HEBLING et al., 2005; KOMORI et al., 2009; LOGUERCIO et al., 2009).

2.4 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA NA DENTINA

Uma considerável gama de produtos inibidores de MMPs tem sido investigada como potenciais agentes terapêuticos na prevenção e/ou tratamento de doenças bucais (SORSA; TJÄDERHANE; SALO, 2004). Dentre eles, soluções de clorexidina (CHX) são capazes de inibir diretamente a atividade das MMPs -2, -8 e -9, mesmo que em concentrações extremamente baixas, tais como $\leq 0,0001\%$, $0,01\%-0,02\%$ e $0,002\%$, respectivamente (GENDRON et al., 1999). Oportunamente, são estas algumas das MMPs que têm sido identificadas na dentina humana (MARTIN-DE LAS HERAS; VALENZUELA; OVERALL, 2000; SULKALA et al., 2007).

O efeito inibitório da clorexidina sobre as MMPs pode ser atribuído a um mecanismo de quelação, já que a adição de cloreto de cálcio em soluções experimentais de CHX reverte ou impede a inibição das MMPs -2 e -9, respectivamente (GENDRON et al., 1999). Em concentrações elevadas, a CHX pode inibir a atividade das MMPs, destacavelmente da MMP-2, por meio da sua desnaturação (HJELJORD; ROLLA; BONESVOLL, 1973). Também pode afetar grupos sulfidríla essenciais e/ou a cisteína presente nos sítios ativos das MMPs, como acontece com a MMP-8 (GENDRON et al., 1999; UITTO et al., 1980; UITTO; SUOMALAINEN; SORSA, 1990; VAN WART; BIRKEDAL-HANSEN, 1990). Assim, a CHX, agente antimicrobiano que possui um amplo espectro de atividade contra bactérias (GENDRON et al., 1999; STANLEY; WILSON; NEWMAN, 1989), já frequentemente utilizado no tratamento da cárie e de outros comprometimentos orais, parece ser, ainda, detentora de propriedades antiproteolíticas bastante interessantes (GENDRON et al., 1999; HANNAS et al., 2007; HEBLING et al., 2005).

Nesse contexto, um estudo *in vivo* com molares de ratos demonstrou uma redução significativa na progressão de lesões cariosas em dentina, associada, ainda, à redução da atividade das MMPs presentes na saliva, quando da utilização de inibidores dessas enzimas (SULKALA et al., 2001). Surge, portanto, uma possível estratégia na prevenção da progressão da cárie dentária, já que o retardamento ou o

impedimento da destruição irreversível da matriz orgânica e, então, a remineralização da mesma, permitiriam a cura natural da lesão (SULKALA et al., 2001).

Como processos semelhantes aos que determinam a progressão da cárie podem ser fundamentais também à evolução da erosão dentária (GANSS; KLIMEK; STARCK, 2004, HARA et al., 2005; KATO et al., 2009; KATO et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2009b), a não degradação da matriz orgânica na dentina erodida provavelmente adiará sua progressão. Inibidores de MMPs, tais como os polifenóis do chá verde, especialmente a epigallocatequina-3-galato (EGCG) (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006; DEMEULE et al., 2000; GARBISA et al., 2001; SARTOR et al., 2002), e a CHX, têm sido, assim, empregados com sucesso no controle da evolução da erosão em dentina *in situ* (KATO et al., 2009; KATO et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2009b). Tanto a CHX, quanto os respectivos polifenóis ainda são capazes de interagir com íons metálicos (GENDRON et al., 1999; GARBISA et al., 2001), o que pode resultar na deposição de partículas no interior dos túbulos dentinários, por meio da ligação ao cálcio da apatita. Isso pode exercer influência sobre os processos de des/remineralização da dentina e, conseqüentemente, contribuir para com a redução da progressão da erosão (KATO et al., 2010).

Além disso, Pashley e colaboradores (2004) sugerem que a aplicação de soluções de clorexidina na dentina condicionada por ácido pode ser favorável, uma vez que as mesmas são consideradas seguras e têm sido amplamente utilizadas na odontologia para fins diversos. Outros autores, com base em experimentos, partilham dessa mesma opinião, já que têm observado que a degradação da matriz de colágeno na dentina infiltrada por adesivo ocorre rapidamente, mas é postergada pelo uso da CHX (CARRILHO et al., 2007a; HEBLING et al., 2005), ou mesmo do galardin (BRESCHI et al., 2010a), inibidores inespecífico (GENDRON et al., 1999) e específico (GALARDY et al., 1994a; GALARDY et al., 1994b; GROBELNY; PONCZ; GALARDY, 1992; HAO et al., 1999), respectivamente, de MMPs. Breschi et al. (2010) fornecem, ainda, evidências diretas, advindas de zimografias, tanto da ativação de MMPs endógenas da dentina (especialmente da MMP-2) pelo tratamento adesivo do respectivo substrato, quanto da inibição das mesmas pela aplicação de soluções de CHX.

Acredita-se que a matriz dentinária desmineralizada saturada em CHX fique isolada dos fluidos intersticiais pelos *tags* de resina que ocluem os túbulos dentinários, pelo adesivo que penetra entre as fibrilas de colágeno e pela camada de adesivo propriamente dita, o que pode resultar em sua retenção prolongada e, conseqüentemente, na inibição das MMPs (CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b).

A capacidade da CHX em interferir na degradação promovida pelas MMPs tem sido considerada, por sua vez, dose-dependente (GENDRON et al., 1999). Soluções aquosas de CHX a 2% impedem ou minimizam, em alguns casos por até dois anos, a diminuição dos valores de resistência de união de materiais resinosos à dentina e a nanoinfiltração da interface adesiva, *in vitro* e *in vivo*, em dentes decíduos e permanentes, hígidos ou cariados (BRESCHI et al., 2010b; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; HEBLING et al., 2005; KOMORI et al., 2009). *In vitro*, soluções a 0,2% mostraram-se tão eficazes, quando aplicadas sobre a dentina normal, quanto aquelas a 2% (BRESCHI et al., 2009; BRESCHI et al., 2010b; LOGUERCIO et al., 2009). De forma semelhante, mesmo que diante de significância menos consistente, soluções a 0,02% e a 0,002% também contribuíram à conservação, por seis meses, dos valores de resistência de união de uma resina composta à dentina normal (LOGUERCIO et al., 2009), sugerindo que menores concentrações de CHX ainda podem ser, nesse sentido, efetivas.

Tal possibilidade, mesmo que aludida por um único estudo (LOGUERCIO et al., 2009), é bastante interessante, já que soluções de CHX em concentrações elevadas podem ser potencialmente tóxicas (LESSA et al., 2010a; LESSA et al., 2010b; DE SOUZA et al., 2007). Quando aplicadas diretamente sobre células odontoblastóides em cultura, por exemplo, soluções de CHX a 0,06%, 0,12%, 0,2%, 1% e 2% causaram intensos efeitos tóxicos sobre as mesmas, diminuindo seu metabolismo em 61%, 63%, 65%, 67% e 70%, respectivamente (LESSA et al., 2010a). Os efeitos promovidos pelas soluções a 0,06% e a 0,12% foram significativamente mais leves quando comparados aos promovidos pelas demais soluções, mas quanto maior a concentração de CHX aplicada sobre as respectivas células, maior a toxicidade observada, o que a caracteriza como sendo dose-dependente (LESSA et al., 2010a), em semelhança ao que se observa quanto à capacidade da respectiva substância em inibir MMPs (GENDRON et al., 1999). Além disso, independentemente da concentração, quanto maior o tempo de contato das

células com a CHX, mais intenso o efeito citotóxico deste agente, que ainda pode ser potencializado diante da recuperação celular, por um período de 24 h, na ausência de contato com a CHX. Mesmo depois de ter sido removida do contato direto com as células, a CHX mantém, portanto, sua ação tóxica ao longo do tempo (LESSA et al., 2010a).

Por meio da redução da síntese de proteínas e da interferência na respiração mitocondrial, inibindo a proliferação celular, a CHX pode causar, portanto, implicações consideravelmente tóxicas (HIDALGO; DOMINGUEZ, 2001; LESSA et al., 2010a; DE SOUZA et al., 2007). Mesmo quando aplicada sobre a dentina, a CHX ainda pode se difundir através dos túbulos dentinários e causar danos às células pulpares (LESSA et al., 2010b). Ainda que a dentina atue como uma barreira biológica contra a difusão da respectiva substância, e que seu efeito protetor esteja diretamente relacionado à sua espessura (GALLER et al., 2005; HANKS et al., 1988; SCHMALZ; GARHAMMER; SCHWEIKI, 1996), o metabolismo de células odontoblastóides, *in vitro*, diminui em 12,8%, 14,6%, 18,3% e 26%, e em 23%, 26,3%, 28,1% e 34,5%, quando, sobre discos de dentina com 0,5 ou 0,2 mm de espessura, respectivamente, são aplicados géis (natrosol) contendo CHX nas referentes concentrações: 0,12%, 0,2%, 1% e 2% (LESSA et al., 2010b). Embora a toxicidade dos géis contendo CHX a 0,12%, 0,2% e 1% possa ser considerada bastante suave, o gel contendo CHX a 2%, quando aplicado sobre a dentina com 0,2 mm de espessura, promoveu redução relevante do metabolismo celular (LESSA et al., 2010b).

Por outro lado, apesar de uma solução de CHX a apenas 0,02%, aplicada diretamente sobre células odontoblastóides em cultura, reduzir o metabolismo das mesmas em 70,8% e ser considerada altamente citotóxica, soluções de CHX em concentrações menores, tais como 0,0024% e 0,004%, não causam efeitos tóxicos significantes às células pulpares e poderiam ser utilizadas com segurança (DE SOUZA et al., 2007) na preservação ou minimização da diminuição dos valores de resistência de união de materiais resinosos à dentina, normal, ou, talvez, erodida.

Têm-se observado que o envelhecimento, por meio do armazenamento de espécimes por períodos prolongados (até um ano), reduz significativamente os valores de resistência de união de resinas compostas não apenas à dentina normal, mas também, e de forma mais acentuada, à dentina erodida, já inicialmente desfavorável ao estabelecimento de procedimentos adesivos. Comprova-se a

destacável propensão à degradação da interface adesiva estabelecida em dentina erodida pela maior quantidade de falhas adesivas observadas em testes de microtração e pela infiltração de prata detectada em imagens de microscopia eletrônica de transmissão (ZIMMERLI et al., 2012).

Existem, no entanto, poucos estudos que avaliam a efetividade da adesão à dentina erodida (ZIMMERLI et al., 2012). Um estudo clínico mostrou que restaurações cervicais adesivas permaneceram retidas, por um ano, à dentina não preparada (FEDERLIN et al., 1998), mas, em uma outra investigação, uma elevada taxa (44-50%) de restaurações perdidas foi observada (BRACKETT et al., 2005a). Embora o preparo da superfície, ou mínima asperização da mesma com uma ponta diamantada, seja recomendável ao estabelecimento de uma adesão mais satisfatória, em longo prazo, à dentina erodida, uma abordagem menos invasiva e tão efetiva quanto seria preferível (ZIMMERLI et al., 2012).

Visto que a aplicação de soluções de CHX em diferentes concentrações é favorável à minimização da redução, com o tempo, dos valores de resistência de união de resinas compostas à dentina normal e/ou afetada por cárie (BRESCHI et al., 2009; BRESCHI et al., 2010a; BRESCHI et al., 2010b; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; HEBLING et al., 2005; KOMORI et al., 2009; LOGUERCIO et al., 2009), seu papel na adesão à dentina erodida, ainda desconhecido, talvez fosse igualmente interessante.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo *in vitro* é avaliar o efeito da aplicação de soluções de digluconato de clorexidina (CHX) em diferentes concentrações na resistência de união (RU) de uma resina composta à dentina normal e à dentina erodida, ao longo do tempo.

As seguintes hipóteses nulas são consideradas:

- 1) Não há diferença entre os valores de RU da resina composta à dentina, em função da condição do respectivo substrato (normal ou erodido);
- 2) Não há diferença entre os valores de RU da resina composta à dentina, em função da aplicação das soluções de CHX em diferentes concentrações (0-C, 0,004% ou 2%);
- 3) Não há diferença entre os valores de RU da resina composta à dentina, em função do tempo de envelhecimento dos espécimes (Imediato, 6 meses ou 1 ano).

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL (Figura 1)

Este estudo *in vitro* avaliou a resistência de união de uma resina composta ao substrato dentinário em dois níveis (normal-N e erodido-E), tratado com soluções de digluconato de clorexidina em concentrações em três níveis (0=água deionizada/controle-C, a 0,004% e a 2%), ao longo do tempo em três níveis (imediatamente e depois de 6 meses e 1 ano de envelhecimento dos espécimes).

Figura 1 - Delineamento experimental: **A** - Obtenção dos terceiros molares humanos hígidos extraídos; **B** - seccionamento dos terços oclusal e apical dos terceiros molares; **C** - criação de *smear layer* sobre a dentina exposta, por meio da ação de uma lixa de carbeto de silício de granulação 600 por 1 min; **D** - erosão da dentina de metade dos espécimes por um refrigerante a

base de cola (imersões de 5 min; 3x/dia; 5 dias - dentina erodida = E) e submissão dos demais espécimes (dentina normal = N) diretamente à próxima etapa; **E** - condicionamento da dentina por 15 s com ácido fosfórico a 37%, lavagem e secagem; **F** - reidratação de cada terço dos espécimes N com 1,5 µL, respectivamente, de água deionizada (controle - NC), de CHX a 0,004% (N0,004%), ou de CHX a 2% (N2%) e realização dos mesmos procedimentos para os espécimes E (EC; E0,004%; E2%); **G** - aplicação do sistema adesivo Adper^{TM} Single Bond 2® e reconstrução incremental da porção coronária com a resina composta Filtek^{TM} Z350®; **H** - seccionamento dos espécimes em palitos (dentina+resina; área de secção transversal de $\approx 0,81 \text{ mm}^2$), após armazenagem em água deionizada por 24 h a 37°C; **I** - submissão dos palitos aos testes de microtração (EMIC; 0,5 mm/min), imediatamente ou depois de 6 meses ou 1 ano de envelhecimento, e avaliação dos tipos de falhas (adesiva, mista, coesiva em resina, coesiva em dentina), com um microscópio digital.

4.2 PREPARO DOS ESPÉCIMES

4.2.1 Obtenção dos dentes humanos

Foram arrecadados, para este estudo, 80 terceiros molares humanos hígidos, extraídos por razões terapêuticas, dos quais 48, com dimensões semelhantes, foram utilizados, após estabelecimento dos diferentes grupos por meio de aleatorização blocada, para a realização do estudo propriamente dito, e os demais, para a realização dos testes-piloto. Os dentes foram coletados junto ao Centro de Urgência e às clínicas de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, bem como por meio de doações de cirurgiões-dentistas que atendem em consultórios particulares, mediante assinatura do Termo de Doação de Dentes pelos respectivos doadores (Apêndices A e B), segundo a resolução nº 196 do Conselho Nacional de Saúde (Ministério da Saúde, DF). A realização do estudo seguiu as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, pelo qual foi aprovado (processo nº 110/2009 - Apêndice C e Anexos A e B). Os terceiros molares foram limpos com curetas periodontais (Duflex 55G, SS White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro/RJ - Brasil) em associação ao jato de bicarbonato (Dabi Atlante Indústrias Médico Odontológicas Ltda., Ribeirão Preto/SP - Brasil), para remoção de todo e qualquer resíduo de tecido gengival aderido à superfície dentária, e, posteriormente, armazenados em solução de NaCl 0,9% e NaN_3 0,02%, onde ficaram imersos até o início do preparo dos espécimes. A solução era trocada periodicamente e o período máximo de armazenagem dos dentes foi de 6 meses.

4.2.2 Exposição da dentina e simulação de *smear layer*

Cada um dos 48 dentes selecionados foi fixado com cera pegajosa no centro de um dispositivo metálico que era acoplado a uma máquina de corte de precisão Isomet Low Speed Saw (Buehler Ltda., Lake Bluff/IL - EUA). Com o auxílio de um disco diamantado dupla face (High Concentration Diamond - Wafering Blade 102 mm x 0,3 mm x 12,7 mm - Ref 12205; Extec Corp., Enfield/CT - EUA), refrigerado com água deionizada, a uma velocidade de 300 rpm, o terço oclusal ($\approx 2,5$ mm a partir da ponta de cúspide mais baixa) dos terceiros molares foi removido, para exposição da dentina coronária, subjacente ao esmalte (Figura 2). O terço apical radicular também foi removido, para facilitar o corte dos espécimes posteriormente, durante a obtenção dos palitos para microtração.

Com o intuito de se criar uma *smear layer* sobre a dentina exposta, os dentes foram submetidos à ação de uma lixa de carbetto de silício de granulação 600 (Carbimet Paper Discs; Buehler Ltda., Lake Bluff/IL - EUA), por 1 minuto, sob refrigeração constante com água deionizada, em uma politriz metalográfica APL-4 (Arotec, Cotia/SP - Brasil - Figura 3).

Figura 2 - Seccionamento do terço oclusal dos terceiros molares, para exposição da dentina coronária, subjacente ao esmalte, com auxílio de um disco diamantado dupla face, refrigerado com água deionizada, a uma velocidade de 300 rpm.

Figura 3 - Criação de uma *smear layer* sobre a dentina exposta, por meio da ação de uma lixa de carbetto de silício de granulação 600, sob refrigeração com água deionizada, em uma politriz metalográfica APL-4.

4.2.3 Determinação dos grupos experimentais

Os dentes foram, então, aleatoriamente distribuídos nos seguintes grupos:

Grupo	Substrato dentinário	Tratamento após condicionamento ácido	Tempo de envelhecimento dos espécimes
NC (n=8)	Normal (N)	Reidratação com água deionizada (controle)	Imediato (I)
			6 meses (6m)
			1 ano (1a)
N0,004% (n=8)		Reidratação com solução de CHX a 0,004%	Imediato (I)
			6 meses (6m)
			1 ano (1a)
N2% (n=8)		Reidratação com solução de CHX a 2%	Imediato (I)
			6 meses (6m)
			1 ano (1a)
EC (n=8)	Erodido (E)	Reidratação com água deionizada (controle)	Imediato (I)
			6 meses (6m)
			1 ano (1a)
E0,004% (n=8)		Reidratação com solução de CHX a 0,004%	Imediato (I)
			6 meses (6m)
			1 ano (1a)
E2% (n=8)		Reidratação com solução de CHX a 2%	Imediato (I)
			6 meses (6m)
			1 ano (1a)

Quadro 1 - Grupos experimentais.

Para preparo dos espécimes, os seguintes materiais foram utilizados, de acordo com cada condição experimental:

Material	Fabricante	Categoria	Composição
Coca-Cola®	Coca-Cola Brasil, Spaipa S.A. Ind. Bras. de Bebidas, Marília/ SP - Brasil	Refrigerante à base de cola	-água carbonada -extrato de noz de cola -caféina -aroma natural -corante caramelo IV -acidulante ácido fosfórico -edulcorantes artificiais -conservador benzoato de sódio -regulador de acidez citrato de sódio

Saliva artificial	Manipulada em laboratório	Solução artificial para armazenagem dos espécimes	-CaCl ₂ 0,70 mM/L -MgCl ₂ .6H ₂ O 0,20 mM/L -KH ₂ PO ₄ 4,00 mM/L -KCl 30,0 mM/L -NaN ₃ 0,30 mM/L -Tampão HEPES (ácido) 20,0 mM/L
Condicionador Dental Gel®	Dentsply Indústria e Comércio Ltda., Rio de Janeiro/RJ - Brasil	Ácido fosfórico a 37%	Solução de ácido fosfórico na concentração de 37%, em gel
Clorexidina a 0,004%	Manipulada em laboratório	Solução experimental	Solução de digluconato de clorexidina na concentração de 0,004%, em água deionizada
Clorexidina a 2%	Manipulada em laboratório	Solução de limpeza não desmineralizante/ Solução Bactericida	Solução de digluconato de clorexidina na concentração de 2%, em água deionizada
Adper™ Single Bond 2®	3M ESPE Division, St. Paul/MN - EUA	Sistema adesivo convencional de dois passos	-Bis-GMA -HEMA -Diuretano dimetacrilato -copolímero do ácido polialcenóico -canforoquinona -água -etanol -glicerol 1.3 dimetacrilato -sílica (5 nm; 10% em peso)
Filtek™ Z350 Restaurador Universal® - Cor A2	3M ESPE Division, St. Paul/MN - EUA	Resina composta nanoparticulada	Matriz orgânica: -Bis-GMA -Bis-EMA -UDMA -Pequenas quantidades de TEGDMA -Canforoquinona Parte inorgânica (78,5%, em peso): -Nanopartículas de sílica não-aglomerada (20 nm) -Nanoaglomerados de zircônia/sílica (0,6 -1,4 µm)

Quadro 2 - Principais materiais utilizados no presente estudo.

4.2.4 Tratamento do substrato dentinário

As superfícies de dentina de metade dos espécimes (24 dentes), depois de expostas, foram apenas submetidas à ação da lixa de carbeto de silício, conforme descrito anteriormente, determinando-se o que se chamou de dentina normal (N).

As superfícies de dentina da outra metade dos espécimes (24 dentes), além de submetidas à ação da lixa de carbeto de silício, foram, ainda, submetidas a um desafio erosivo em laboratório, semelhante àqueles adotados pela literatura conexa (KATO et al., 2009b; KATO et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2009b), determinando-se o que se chamou de dentina erodida (E). Para tal, por um total de 5 dias, por três vezes ao dia (8 h, 13 h e 18 h), foram colocadas em contato com um refrigerante a base de cola (Coca-Cola®, Spaipa S.A. Ind. Bras. de Bebidas, Marília/SP - Brasil; 60 ml/dente; substituídos a cada nova exposição), durante 5 minutos (Figuras 4 e 5) e, nos intervalos, ficaram armazenadas em saliva artificial, substituída diariamente.

Figuras 4 e 5 - Desafio erosivo em laboratório, para determinação do que se chamou de dentina erodida (E). Contato das superfícies dentinárias com um refrigerante a base de cola (Coca-Cola®) por um total de 5 dias, por três vezes ao dia (8 h, 13 h e 18 h), durante 5 minutos.

Cada dente foi posicionado em um orifício, com diâmetro compatível ao da secção de dentina exposta, em uma placa de Espuma Vinílica Acetinada (EVA) que, flutuando sobre as respectivas soluções, permitia o contato exclusivo de tal superfície com as mesmas. Previamente ao primeiro contato com o refrigerante, as superfícies dentinárias foram colocadas em contato com a saliva artificial por 12 h. Quando mobilizadas da saliva para o refrigerante, por três vezes diárias, não receberam tratamento nenhum; e quando do refrigerante para a saliva, nos intervalos entre os desafios, foram lavadas abundantemente com água deionizada.

Finalizado todo o processo de desafio erosivo, realizado em ambiente com temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ (soluções utilizadas nessa mesma condição), as superfícies de dentina erodida foram, por fim, lavadas com água deionizada e secas com suaves jatos de ar da seringa tríplice, para receberem, como as superfícies de dentina normal, os procedimentos adesivos/restauradores posteriores.

4.2.5 Procedimentos adesivos/restauradores

Tanto os espécimes de dentina normal (N), quanto aqueles submetidos ao desafio erosivo *in vitro* (dentina erodida - E), foram condicionados com ácido fosfórico a 37% (Condicionador Dental Gel®, Dentsply Indústria e Comércio Ltda., Rio de Janeiro/RJ - Brasil), por 15 segundos, lavados pelo dobro do tempo e vigorosamente secos com jatos de ar, isento de água/óleo, da seringa tríplice (CARRILHO et al., 2007a; KOMORI et al., 2009; LOGUERCIO et al., 2009 - Figura 6).

Dos 24 espécimes de dentina normal, 8 foram reidratados com 1,5 μL de água deionizada (controle - NC); 8, com 1,5 μL de uma solução de digluconato de clorexidina a 0,004% (N0,004%); e 8, com 1,5 μL de uma solução de digluconato de clorexidina a 2% (N2%). Também dos 24 espécimes de dentina erodida, 8 foram reidratados com 1,5 μL de água destilada (controle - EC); 8, com 1,5 μL de uma solução de digluconato de clorexidina a 0,004% (E0,004%); e 8, com 1,5 μL de uma solução de digluconato de clorexidina a 2% (E2%). Depois de 60 segundos, os excessos das respectivas soluções foram suavemente removidos com papel absorvente (Figuras 7 e 8).

Figura 6 - Condicionamento com ácido fosfórico a 37%, por 15 segundos, seguido de lavagem pelo dobro do tempo e secagem com jatos de ar.

Figura 7 - Reidratação com 1,5µL de água deionizada (NC/EC); ou de solução de digluconato de clorexidina a 0,004% (N0,004%/E0,004%) ou a 2% (N2%/E2%).

Figura 8 - Remoção, depois de 60 segundos, dos excessos das respectivas soluções com papel absorvente.

Em seguida, em todos os espécimes foi aplicado o sistema adesivo convencional de dois passos Adper^{TM}Single Bond 2®, de forma ativa (15 s), em duas camadas finas (Figura 9), com um leve jato de ar para facilitação da evaporação do solvente, e fotoativação por 10 segundos (Radii-cal® - 1000 mW/cm², SDI Limited, Bayswater /Vic. - Austrália - Figuras 10 e 11).

Figura 9 - Aplicação do sistema adesivo Adper^{TM}Single Bond 2® em duas camadas finas, previamente à facilitação da evaporação do solvente com leve jato de ar.

Figura 10 - Fotopolimerização do sistema adesivo por 10 segundos.

Figura 11 - Aspecto superficial brilhante após a polimerização do sistema adesivo.

Vale ressaltar que, para ilustração da qualidade da hibridização, em função das diferentes condições experimentais, por meio da obtenção de imagens em microscopia confocal de varredura a laser (MCVL; Microscópio Leica TCS SPE®, Leica Microsystems, Mannheim/Bade-Vurtemberg - Alemanha), em 1 espécime por grupo foi aplicado o mesmo sistema adesivo (Adper™ Single Bond 2®), mas previamente marcado por um corante fluorescente, a rodamina B (Rhodamine B®; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Gillingham/New Rd - Reino Unido), adicionada na concentração de 0,16 mg/ml do produto.

Dois incrementos (2 mm de espessura cada) de resina composta nanoparticulada (Filtek™ Z350®-cor A2; 3M ESPE Division, St. Paul/MN - EUA) foram aposicionados sobre os espécimes (Figuras 12 e 13) e cada um deles foi fotoativado por 20 segundos (Figura 14), utilizando-se, para tal, um aparelho fotopolimerizador LED sem fio de alta potência (Radii-cal®, SDI Limited, Bayswater/Vic. - Austrália).

Figura 12 - Aposição do primeiro incremento (2 mm) de resina composta sobre um espécime.

Figura 13 - Acomodação do segundo incremento (2 mm) de resina composta sobre o primeiro, já polimerizado.

Figura 14 - Fotoativação de cada um dos incrementos de resina composta por 20 segundos.

4.2.6 Obtenção dos palitos

O conjunto espécime dentário-resina composta foi levado à máquina de corte (Isomet Low Speed Saw; Buehler Ltda., Lake Bluff/IL - EUA) para seccionamento e obtenção de palitos constituídos de dentina e resina composta,

unidos pela interface adesiva, com área de seção transversal de aproximadamente 0,81 mm². Foram, então, fixados com cera pegajosa, pela porção radicular seccionada, ao dispositivo metálico que era acoplado à máquina de corte e, perpendicularmente à interface adesiva, a partir da superfície do último incremento de resina, fatiados pelo disco diamantado dupla face (Extec Corp., Enfield/CT - EUA), refrigerado com água deionizada, a uma velocidade de 150 rpm (Figuras 15 e 16). Posteriormente, girando-se a base em que estavam fixados em 90°, foram, da mesma maneira, novamente seccionados (Figura 17). Cada palito foi individualmente extraído do conjunto (Figura 18), com auxílio de uma pinça clínica (Duflex Pinça Univer, SS White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro/RJ - Brasil), e aqueles situados à periferia, onde podia existir esmalte, foram desconsiderados. Em média, 15 a 20 palitos foram obtidos de cada dente.

Figuras 15 e 16 - Conjunto espécime dentário-resina composta, fixado com cera pegajosa, pela porção radicular, ao dispositivo metálico, que era acoplado à máquina de corte, para seccionamento, perpendicular à interface adesiva, em fatias, a partir da superfície do último incremento de resina.

Figura 17 - Seccionamento do conjunto espécime dentário-resina composta já fatiado, depois de se girar a base em que estava fixado em 90°.

Figura 18 - Extração de cada palito do conjunto, com auxílio de uma pinça clínica. Os palitos situados à periferia, onde podia existir esmalte, foram desconsiderados.

O espécime, de cada grupo, hibridizado pelo sistema adesivo marcado com rodamina B, não foi seccionado em palitos, mas, sim, apenas no sentido méso-distal, a fim de que as metades vestibular e lingual fossem qualitativamente analisadas em MCVL, imediatamente ou depois de 6 meses e 1 ano de envelhecimento.

4.3 TESTES DE MICROTRAÇÃO E AVALIAÇÃO EM MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER

Um terço dos palitos obtidos de cada dente, para cada grupo, foi testado imediatamente (I); um terço foi armazenado em saliva artificial (substituída a cada 14 dias), a 37°C, por 6 meses (6m), e um terço, por 1 ano (1a), para só então serem testados, a fim de que a qualidade inicial e em longo prazo da união resina composta-dentina normal *versus* dentina erodida pudesse ser avaliada.

Cada palito foi individualmente fixado com um adesivo à base de cianocrilato (Super Bonder Flex Gel Loctite®; Henkel Ltda., São Paulo/SP - Brasil),

pelas extremidades, a um dispositivo tipo Bencor Multi-T (Dnavig Engineering, Danville/CA - EUA - Figura 19) e levado a uma máquina de testes universal EMIC DL 500 BF® (EMIC Equipamentos e Sistemas de Ensaio Ltda., São José dos Pinhais/PR - Brasil - Figura 20). Foram, então, testados sob força de tração (célula de carga de 50 kg_f) perpendicular à interface adesiva, a uma velocidade de 0,5 mm/min, até sua falha (Figura 21).

Figura 19 - Fixação de um palito, pelas extremidades, com um adesivo à base de cianocrilato, a um dispositivo tipo Bencor.

Figura 20 - Dispositivo Bencor, com um palito nele fixado, adaptado à máquina de testes universal EMIC DL 500 BF®.

Figura 21 - Teste, sob força de tração (célula de carga de 50 kg_f) perpendicular à interface adesiva, a uma velocidade de 0,5 mm/min, até sua falha.

A tensão necessária para causar a falha da interface adesiva de cada palito foi determinada pela razão entre a carga (kg_f) máxima no momento de tal falha e a área da seção transversa do palito, aferida com um paquímetro digital (Série/Código 500-144, Mitutoyo Digimatic Caliper, Mitutoyo Sul Americana, Rio de Janeiro/RJ - Brasil), com precisão de 0,01 mm, em cm². Os valores obtidos, em kg/cm², foram convertidos em MPa, multiplicando-se os mesmos por 0,0980665. Aos palitos que fraturaram prematuramente, no interior do próprio recipiente em que

estavam armazenados, foi atribuído 0 como valor de RU. Aqueles que fraturaram prematuramente, por quaisquer outros motivos, foram excluídos do estudo.

As superfícies fraturadas de ambos os segmentos de cada palito foram analisadas com o auxílio de um microscópio digital (Dino-Lite Digital Microscope®; AnMo Electronics Corp., New Taipei City/San-Chung District - Taiwan), com 50x de aumento, para determinação do padrão de fratura (adesiva-A, mista-M, coesiva em dentina-CD, coesiva em resina-CR - Figuras 22 e 23).

Figuras 22 e 23 - Análise das superfícies fraturadas de ambos os segmentos de cada palito, com o auxílio de um microscópio digital (Dino-Lite Digital Microscope®), com 50x de aumento, para determinação do padrão de fratura (adesiva, mista, coesiva em dentina, coesiva em resina).

As interfaces adesivas das superfícies seccionadas das metades vestibular e lingual do espécime, de cada grupo, hibridizado pelo sistema adesivo marcado com rodamina B, foram qualitativamente analisadas em MCVL (40x de aumento; imagens com 1,0 x 1,0 mm e 1024 *pixels* / 0,976 μm de resolução; Microscópio Leica TCS SPE®, Leica Microsystems, Mannheim/Bade-Vurtemberg - Alemanha), imediatamente ou depois de 6 meses e 1 ano de envelhecimento, para ilustração da qualidade da hibridização.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para se analisar adequadamente os dados obtidos (RU em MPa), considerando-se cada dente, e não cada palito, como unidade experimental, foi

realizado um teste para verificação da normalidade da distribuição amostral (Kolmogorov-Smirnov; Systat Software Inc., Chigaco/IL - EUA). Constatando-se aderência dos mesmos à curva normal, os testes de Análise de Variância a três critérios (substrato dentinário; tratamento após condicionamento ácido; tempo de envelhecimento) e de comparações múltiplas de Tukey foram aplicados, com nível de significância de 5% (Apêndice D). O programa estatístico utilizado foi o SigmaPlot for Windows Version 12.0® (Systat Software Inc., Chigaco/IL - EUA).

Os testes de Kruskal-Wallis (variável quantitativa que não obedeceu a uma distribuição normal), e de Tukey ($p < 0,05$; SigmaPlot for Windows Version 12.0®; Systat Software Inc., Chigaco/IL - EUA) foram aplicados para determinação dos tipos de falhas predominantemente observados (% de falhas do tipo A, M, CD ou CR; Apêndice E).

5 Resultados

5 RESULTADOS

Analisando-se os dados obtidos pôde-se observar que as variáveis substrato dentinário, tratamento com as soluções de CHX em diferentes concentrações e tempo de envelhecimento dos espécimes exerceram influência significativa sobre os resultados ($p<0,001$, $p=0,001$ e $p<0,001$, respectivamente). Houve, ainda, interação entre as variáveis substrato dentinário e tempo de envelhecimento dos espécimes ($p=0,003$) e entre as variáveis tratamento com as soluções de CHX em diferentes concentrações e tempo de envelhecimento dos espécimes ($p<0,001$).

Os valores médios de RU (MPa $\pm$ dp) da resina composta à dentina normal e à dentina erodida, em função da aplicação das soluções de CHX em diferentes concentrações, após o condicionamento ácido, e do tempo de envelhecimento dos espécimes, são descritos na Tabela 1. O gráfico 1 ilustra os resultados.

Tabela 1 - Valores médios $\pm$ desvio padrão de resistência de união (MPa) de uma resina composta à dentina normal (N) e à dentina erodida (E), em função da aplicação de soluções de CHX em diferentes concentrações (0-C, 0,004% e 2%), após o condicionamento ácido, e do tempo de envelhecimento dos espécimes (imediate-I, 6 meses-6m, 1 ano-1a).*

	C			0,004%			2%		
	I	6m	1a	I	6m	1a	I	6m	1a
N	34,74 $\pm 9,79^{Aa\dagger}$	20,77 $\pm 14,35^{Ab\dagger}$	7,58 $\pm 4,94^{Ac\dagger}$	35,69 $\pm 9,85^{Aa\dagger}$	23,10 $\pm 8,13^{Ab\dagger}$	13,82 $\pm 10,12^{Ab\dagger}$	41,22 $\pm 5,38^{Aa\dagger}$	34,64 $\pm 6,62^{Aa\dagger}$	13,25 $\pm 4,83^{Ab\dagger}$
E	20,94 $\pm 5,37^{Ba\dagger}$	7,87 $\pm 8,81^{Bb\dagger}$	5,43 $\pm 4,99^{Bc\dagger}$	21,12 $\pm 7,44^{Ba\dagger}$	3,47 $\pm 6,25^{Bb\dagger}$	4,97 $\pm 3,11^{Bb\dagger}$	15,97 $\pm 5,17^{Ba\dagger}$	22,23 $\pm 9,12^{Ba\dagger}$	5,41 $\pm 5,47^{Bb\dagger}$

*Diferentes letras maiúsculas indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) em cada coluna para a variável substrato dentinário (N, E). Diferentes letras minúsculas indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) em cada linha para a variável tempo de envelhecimento (I, 6m, 1a), em cada respectiva solução aplicada após o condicionamento ácido. Diferentes símbolos indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) em cada linha para a variável tratamento após condicionamento ácido (C, CHX 0,004%, CHX 2%), em cada respectivo tempo de envelhecimento dos espécimes. (n=7 para cada célula).

Gráfico 1 - Comportamento (RU em MPa) dos diferentes grupos (NC, N0,004%, N2%, EC, E0,004%, E2%) de acordo com o tempo de envelhecimento dos espécimes. Cores, traçados e extremidades diferentes para as linhas situadas imediatamente abaixo da base das barras indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) entre as condições experimentais a que correspondem. ($n=7$ para cada barra).

Considerando-se a variável substrato dentinário, em todas as situações os valores de RU da resina composta à dentina erodida foram inferiores aos valores de RU da resina composta à dentina normal.

Em se tratando da variável tratamento com as soluções de CHX em diferentes concentrações, nota-se que esta exerceu influência significativa em função do tempo de armazenamento dos espécimes, tanto para a dentina normal, quanto para a dentina erodida. Quando da aplicação da solução controle (água deionizada), os valores de RU da resina composta à dentina experimentaram redução significativa e progressiva ao longo do tempo. Quando da aplicação da solução de CHX a 0,004%, os valores obtidos depois de 6 meses e 1 ano, estatisticamente equivalentes entre si, foram significativamente inferiores aos obtidos na avaliação imediata dos espécimes. Já quando da aplicação da solução de CHX a 2%, tais valores mantiveram-se estáveis até os 6 meses, mas reduziram significativamente depois de 1 ano.

Contemplando-se a variável tempo de envelhecimento dos espécimes, nota-se que, imediatamente, a aplicação das soluções controle ou de CHX a

0,004%, ou a 2%, não exerceu efeito significativo sobre os valores de RU, nem para a dentina normal, nem para a dentina erodida. Depois de 6 meses, apenas a solução de CHX a 2% foi capaz de evitar a diminuição dos valores de RU da resina composta a ambos os substratos dentinários. Depois de 1 ano, a aplicação da solução controle resultou em diminuição dos valores de RU à dentina ainda maior que a diminuição observada quando da aplicação das soluções de CHX a 0,004% ou a 2%.

Quanto à determinação do padrão de fratura dos palitos testados, pôde-se observar que as falhas adesivas e mistas, percentualmente equivalentes entre si, foram predominantes em relação às coesivas, independentemente se em dentina ou em resina ($p < 0,001$; Gráfico 2).

Gráfico 2 - Porcentagem (%) de falhas do tipo adesiva (A), mista (M), coesiva em dentina (CD) ou coesiva em resina (CR) para os diferentes grupos experimentais (NC, N0,004%, N2%, EC, E0,004% e E2%), em função do tempo de envelhecimento dos espécimes (imediato-I, 6 meses-6m, 1 ano-1a)*.

*Diferentes letras indicam diferença estatisticamente significante entre cada tipo de falha.

Qualitativamente, observando-se as interfaces adesivas das superfícies seccionadas das metades vestibular e lingual do espécime, de cada grupo, hibridizado pelo sistema adesivo marcado com rodamina B, não se pôde notar diferenças evidentes entre os grupos experimentais, ainda que seja possível sugerir que a qualidade da hibridização para a dentina erodida é inferior à qualidade da

hibridização para a dentina normal, independentemente da solução com que foram reidratadas ou do tempo de envelhecimento dos respectivos espécimes, no que tange o comprimento, a quantidade e a regularidade dos *tags* formados.

Figura 24 - Imagens, em microscopia confocal de varredura a laser, representativas da análise das interfaces adesivas das superfícies seccionadas das metades vestibular e lingual do espécime, de cada grupo, hibridizado pelo sistema adesivo marcado com rodamina B. Não se notam diferenças evidentes entre os grupos experimentais, ainda que seja possível sugerir que a qualidade da hibridização para a dentina erodida é inferior à qualidade da hibridização para a dentina normal, independentemente da concentração da solução de CHX com que foram reidratadas ou do tempo de envelhecimento dos respectivos espécimes.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

O consumo exponencial de alimentos e bebidas ácidas, tais como os refrigerantes (principalmente os à base de cola), os isotônicos, os sucos e os chás de frutas, que podem provocar a desmineralização dos dentes, tem incentivado a literatura científica a buscar respostas relacionadas à compreensão do fenômeno denominado erosão dentária (AL-DLAIGAN; SHAW; SMITH, 2001; AMAECHI; HIGHAM, 2001; BRUTON; HUSSAIN, 2001; DYNESEN et al., 2008; ECCLES, 1979; ECCLES, 1982a; ECCLES, 1982b; ECCLES; HOOPER et al., 2004; JENKINS, 1974; JENSDOTTIR et al., 2004; LARSEN; NYVAD, 1999; LARSEN; RICHARDS, 2002; LUSSI et al., 2000; LUSSI et al., 2000; LUSSI et al., 2011; LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004; LUSSI; JÄGGI; SCHÄRER, 1993; LUSSI; JAEGGI, 2008; MEURMAN; FRANK, 1991b; MILLWARD et al., 1994; NUNN, 1996; OWENS; KITCHENS, 2007; PACKER, 2009; RIOS et al., 2006; TAHMASSEBI et al., 2006; TEN CATE; IMFELD, 1996; WEST; HUGHES; ADDY, 2001).

Essa desmineralização superficial, seguida, muitas vezes, de perda tecidual progressiva, decorrente de processos químicos que não envolvem a atividade bacteriana (ARANHA; EDUARDO; CORDÁS, 2008; BARTLETT; GANSS; LUSSI, 2008; DYNESEN et al., 2008; ECCLES, 1979; FEDERLIN et al., 1998; HONÓRIO et al., 2008b; IMFELD, 1996; JENSDOTTIR et al., 2004; KATO et al., 2009b; LUSSI, 1996; LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004; MEURMAN; TEN CATE, 1996; OWENS; KITCHENS, 2007; PIANGPRACH et al., 2009; RIOS et al., 2006; RIOS et al., 2007; RIOS et al., 2009; SERRA; MESSIAS, TURSSI, 2009; SPREAFICO, 2010; YIP; SMALES; KAIDONIS, 2003; ZERO, 1996), pode causar alterações estéticas e funcionais e, nos estágios mais avançados, exposição dentinária e até mesmo dor (DAVIS; WINTER, 1997; LITONJUA et al., 2003; LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004; REIS; HIGASHI; LOGUERCIO, 2009).

Diante desse cenário, o tratamento restaurador/reabilitador torna-se, então, imprescindível (KILPATRICK; MAHONEY, 2004; LAMBRECHTS et al., 1996). Uma das principais opções terapêuticas consiste em recobrir as lesões erosivas que apresentam dentina exposta (muitas vezes sensíveis) com um material resinoso, a fim de que não apenas uma maior perda de substância dentária possa ser prevenida

(AZZOPARDI et al., 2001; AZZOPARDI et al., 2004; BRUNTON et al., 2000; SUNDARAM et al., 2007; ZIMMERLI et al., 2011), mas também que função e estética sejam devolvidas ao elemento comprometido (BARTLETT; SUNDARAM, 2006; DIETSCHI; ARGENTE, 2011; HEMMINGS; DARBAR; VAUGHAN, 2000).

Vale considerar que, nesse contexto, restaurações de resina composta apresentam desempenho, geralmente, satisfatório: são conservadoras, passíveis de reparo e substituição sem grandes dificuldades e relativamente baratas (DIETSCHI; ARGENTE, 2011; HEMMINGS; DARBAR; VAUGHAN, 2000; POYSER et al., 2007; REDMAN; HEMMINGS; GOOD, 2003).

Todavia, a adesão de materiais restauradores resinosos ao substrato dentinário, mesmo que normal, mas principalmente se afetado por cárie, esclerótico, profundo e/ou erodido, é, em comparação àquela estabelecida em esmalte, menos favorável (NAKAJIMA et al., 1995; YOSHIYAMA et al., 1995; YOSHIYAMA et al., 1996; ZIMMERLI et al., 2012). A interação dos sistemas adesivos com a dentina, diretamente relacionada à umidade, é especialmente complexa, já que a estrutura desse tecido, permeável, é composta por grande número de túbulos que se conectam com a polpa e por considerável parcela de material orgânico (colágeno, principalmente) (VAIDYANATHAN; VAIDYANATHAN, 2009). Zonas desmineralizadas desse substrato, não impregnadas por monômeros resinosos, podem se incorporar à camada híbrida e comprometer a durabilidade, em longo prazo, da interface adesiva, facilitando, por exemplo, a nanoinfiltração. A interação da água com os materiais resinosos hidrofílicos parece contribuir para com sua deterioração (BRESCHI et al., 2008; HASHIMOTO et al., 2000; HASHIMOTO et al., 2002b; HASHIMOTO et al., 2003b; HASHIMOTO et al., 2003c; SANO et al., 1995a; SANO et al., 1995b; TAY; PASHLEY; YOSHIYAMA, 2002; VAIDYANATHAN; VAIDYANATHAN, 2009).

Embora excelente resistência à degradação seja conferida à matriz de colágeno da dentina, em função do elevado grau de ligações cruzadas intermoleculares e do vigoroso entrelaçamento mecânico deste tecido conjuntivo especializado (SCHLUETER; VEIS, 1964; ARMSTRONG et al., 2006; ARMSTRONG et al., 2006), grande atenção passou a ser atribuída, ainda, à potencial atividade proteolítica ali existente desde que formas complexas e ativas das metaloproteinases da matriz (MMPs) foram identificadas na dentina humana, mineralizada ou desmineralizada (BOUKPESSI et al., 2008; BRESCHI et al., 2010a;

MARTIN-DE LAS HERAS; VALENZUELA; OVERALL, 2000; MAZZONI et al., 2007; PALOSAARI et al., 2003; PASHLEY et al., 2004; SULKALA et al., 2007; TJÄDERHANE et al., 2001).

Tais enzimas também podem desempenhar papel relevante na progressão da erosão dentinária (KATO et al., 2009; KATO et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2009b) e, talvez, na qualidade da união de materiais resinosos à tal substrato.

Pouquíssimos são, no entanto, os estudos que reportam aspectos relacionados à adesão ao substrato dentinário exclusivamente erodido (FEDERLIN et al., 1998; ZIMMERLI et al., 2012). A grande maioria daqueles disponíveis na literatura considera apenas o desempenho dos materiais resinosos quando utilizados para restauração de lesões não cariosas de etiologia multifatorial e não claramente determinada (BRACKETT et al., 2005a; EL-DIN; MILLER; GRIGGS, 2004; TAY; PASHLEY, 2004b; WILDER et al., 2009).

Considerando-se que a aplicação de soluções de CHX em diferentes concentrações é favorável à desaceleração da degradação da camada híbrida estabelecida em dentina normal e/ou afetada por cárie ao longo do tempo (BRESCHI et al., 2009; BRESCHI et al., 2010a; BRESCHI et al., 2010b; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; HEBLING et al., 2005; KOMORI et al., 2009; LOGUERCIO et al., 2009) e à minimização da progressão da erosão dentinária *in situ* (KATO et al., 2009; KATO et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2009b), torna-se interessante avaliar se sua aplicação desempenharia, igualmente, papel relevante na adesão à dentina já erodida.

As condições para determinação, em laboratório, de tal substrato variam imensamente, sendo que cada grupo de pesquisa adota um regime próprio (WEST; DAVIES; AMAECHI, 2011). Questiona-se, ainda, se, *in vivo*, a dentina erodida apresentará a camada superficial completamente orgânica, observada *in vitro*, e qual sua espessura se presente. Clinicamente, as lesões erosivas em dentina são relativamente resistentes ao contato de exploradores e podem ser lisas e polidas/brilhantes, dependendo do estado de sua atividade. A perda do esmalte pode resultar, também, na formação de dentina reacional pelos odontoblastos e na obliteração dos túbulos dentinários. Em contraste, espécimes laboratoriais exibem uma superfície resiliente e amolecida. Assim, as complexas características histológicas da dentina erodida exigem uma análise exaustiva e cautelosa dos

possíveis delineamentos experimentais e, particularmente, dos resultados de determinado estudo (LUSSI et al., 2011).

Nesse sentido, não há consenso quanto ao protocolo melhor indicado para se determinar, *in vitro*, o substrato dentinário erodido, mas os modelos baseados na ciclagem de pH são preferíveis em relação àqueles que consideram um único ataque desmineralizante, já que simulam importantes parâmetros clínicos (SHELLIS et al., 2011). Reconhece-se que, *in vivo*, a exposição dos dentes a ácidos de origem extrínseca, ou mesmo intrínseca, é, de maneira geral, recorrente, mas com duração não superior a alguns minutos (SHELLIS et al., 2011).

Ademais, considera-se desejável expor os espécimes à ação da saliva antes do desafio erosivo e nos intervalos entre os mesmos, a fim de que o efeito da película adquirida e o papel de tal solução na erosão dentária não sejam ignorados (SHELLIS et al., 2011). Ainda que proteínas salivares não estejam presentes na maioria das formulações de saliva artificial, a composição iônica da saliva humana é por elas reproduzida e, destarte, o papel da remineralização é acrescentado ao modelo de erosão *in vitro* (DEVLIN; BASSIOUNY; BOSTON, 2006; SHELLIS et al., 2011; WEST; DAVIES; AMAECHI, 2011; WETTON et al., 2006).

Na verdade, o essencial é que, apesar das variações, os pormenores do protocolo experimental adotado sejam descritos com riqueza de detalhes quando os resultados de determinado ensaio são discutidos (SHELLIS et al., 2011).

Assim, a ciclagem de pH (imersões de 5 min, 3x/dia, por 5 dias, e armazenagem em saliva artificial nos intervalos) com um refrigerante regular do tipo cola (Coca-Cola®), amplamente consumido em todo o mundo e potencialmente responsável por consideráveis alterações aos elementos dentários (BIRKHED, 1984; FEDERLIN et al., 1998; GROBLER; VAN DER HORST, 1982; LARSEN; NYVAD, 1999; LARSEN; RICHARDS, 2002; RIOS et al., 2006b; LUSI et al., 2000; LUSI; JAEGGI; ZERO, 2004; LUSI; JÄGGI; SCHÄRER, 1993; MEURMAN; FRANK, 1991b; RIOS et al., 2009; RIOS et al., 2011; TAHMASSEBI et al., 2006; WEST; HUGHES; ADDY, 2001), foi utilizada para se determinar, *in vitro*, no presente estudo, o substrato dentinário erodido.

A resistência de união (RU) de uma resina composta à dentina erodida e à dentina normal (parâmetro para estabelecimento de comparações), ao longo do tempo, em função da aplicação de soluções de digluconato de clorexidina (CHX) em diferentes concentrações, foi, então, avaliada por meio de testes de microtração,

categoricamente utilizados para estudos laboratoriais relacionados à adesão de materiais resinosos à dentina (ARMSTRONG et al., 2010; SANO et al., 1994; SCHERRER; CESAR; SWAIN, 2010).

Pashley et al. (1999) ratificam a aplicabilidade específica deste teste para averiguação da qualidade da união de resinas compostas a diferentes tecidos dentários. Ao se avaliar espécimes com área de secção transversal reduzida ($0,5 \text{ mm}^2$ a $1,0 \text{ mm}^2$, aproximadamente), a distribuição de forças ocorre, teoricamente, de forma mais homogênea, sofrendo menos interferências, o que possibilita uma reprodução mais fiel da realidade (NAKAJIMA et al., 1995; SANO et al., 1994). Além disso, apesar das limitações intrínsecas à microtração, medidas da maior resistência interfacial podem ser obtidas, bem como médias e desvios-padrão podem ser calculados para cada dente; superfícies irregulares e bastante pequenas podem ser testadas, e exames microscópicos das regiões fraturadas são possíveis e, na maior parte das vezes, elucidativos (PASHLEY et al., 1995).

Observou-se, pois, por meio de testes de microtração, que, no presente estudo, os valores de RU da resina composta à dentina erodida foram sempre inferiores aos da resina composta à dentina normal, em concordância com os dados apresentados por Zimmerli et al. (2012), independentemente da aplicação das diferentes soluções para reidratação ou do tempo de armazenagem dos espécimes.

A erosão favorece a exposição da trama colágena da dentina em maior profundidade, o que está claramente relacionado à infiltração inadequada dos monômeros resinosos e, conseqüentemente, ao prejuízo da adesão (ZIMMERLI et al., 2012). Isto se deve, provavelmente, ao colapso das fibrilas de colágeno ou ao elevado conteúdo de água, que prejudica, ainda, a polimerização do respectivo adesivo (SANO et al., 1995a; HASHIMOTO et al., 2003a; HASHIMOTO et al., 2003b; HASHIMOTO et al., 2003c; ZIMMERLI et al., 2012). O condicionamento ácido, que deve ser realizado quando sistemas adesivos convencionais são utilizados, parece, também, não apenas não ser capaz de remover a dentina erodida superficial, orgânica, mas contribuir para com a exposição das fibrilas de colágeno ainda em maior profundidade, tornando a adesão ao respectivo substrato mais uma vez desfavorável (FUSAYAMA, 1991; KOMORI et al., 2009; NAKAJIMA et al., 2000; YOSHIYAMA et al., 2002). A pobre infiltração do sistema adesivo na dentina desmineralizada é confirmada pela característica deposição de prata em imagens de microscopia eletrônica de transmissão (nanoinfiltração), sempre maior para a

dentina erodida do que para a normal (ZIMMERLI et al., 2012). Tais constatações podem ser consideradas evidências sólidas, já que, por hora, apenas o preparo/asperização da dentina erodida com uma ponta diamantada, que promove a remoção efetiva da camada desmineralizada, permite que a resistência de união de materiais resinosos à dentina erodida seja equivalente à resistência de união desses materiais à dentina normal (ZIMMERLI et al., 2012).

Da mesma maneira, estabelecendo-se considerações paralelas, estudos morfológicos mostram que uma camada híbrida satisfatória é raramente formada na dentina afetada por cárie (HAJ-ALI et al., 2006; KOMORI et al., 2009; WANG; SPENCER; WALKER, 2007). A profunda zona de desmineralização dificulta a infiltração dos monômeros resinosos na matriz colágena (HAJ-ALI et al., 2006; WANG; SPENCER; WALKER, 2007) e, assim como para a dentina erodida, a prevalência de fibrilas colágenas expostas, desprotegidas, em camadas híbridas formadas em dentina afetada por cárie, é maior, quando comparada àquela observada em camadas híbridas estabelecidas em dentina normal (HAJ-ALI et al., 2006; KOMORI et al., 2009).

A ineficiência relacionada à hibridização, tanto para a dentina erodida, como enfatizado anteriormente, quanto para a afetada por cárie, pode, pois, favorecer a nanoinfiltração e, por conseguinte, acelerar a degradação das interfaces adesivas estabelecidas nos respectivos substratos (HASHIMOTO et al., 2003a; SANO et al., 1995a; ZIMMERLI et al., 2012).

Não deve ser utópico sugerir, outrossim, que o baixo pH (2.6) da bebida adotada para promover a erosão dentinária possa, além de ter causado a desmineralização, a abertura dos túbulos dentinários e a exposição das fibrilas de colágeno (ZIMMERLI et al., 2012), ter também ativado as MMPs presentes na dentina (KATO et al., 2009b; TJÄDERHANE et al., 1998), previamente à ativação promovida pelos procedimentos adesivos, antecipando ou potencializando, diante da neutralização posterior do meio, o efeito proteolítico no respectivo tecido. Talvez, por mais esse motivo, o desafio erosivo tenha afetado negativamente a adesão à dentina. Tal suposição é correspondente ao que se sugere sobre a adesão à dentina afetada por cárie: a atividade proteolítica nessa condição é mais pronunciada que a observada na dentina normal (DAYAN; BINDERMAN; MECHANIC, 1983; KOMORI et al., 2009) e, além disso, a degradação da interface adesiva estabelecida nesse substrato, pelas enzimas proteolíticas, pode evoluir mais rapidamente que a da

estabelecida em dentina normal (HEBLING et al., 2005; KOMORI et al., 2009). Resultados anteriormente publicados (CEBALLOS et al., 2003; KOMORI et al., 2009; NAKAJIMA et al., 2000; YOSHIYAMA et al., 2003) mostram que os valores de RU de materiais resinosos à dentina afetada por cárie são inferiores aos valores de RU desses materiais à dentina normal, independentemente da solução aplicada para reidratação da dentina após condicionamento ácido (controle ou contendo CHX) ou do sistema adesivo que foi utilizado, corroborando os achados do presente trabalho.

A armazenagem dos espécimes em saliva artificial nos intervalos entre cada desafio erosivo, por sua vez, é que deve ter possibilitado a neutralização do pH do meio e, conseqüentemente, a degradação da matriz orgânica pelas MMPs (KATO et al., 2009b), já que tais enzimas, mesmo que ativadas, não são capazes de atuar em pH ácido (KATO et al., 2009b; TJÄDERHANE et al., 1998).

Em concordância, ainda, com a literatura relacionada, que comprova que a maioria das restaurações adesivas comporta-se, de imediato, de maneira satisfatória, quando se avalia sua resistência de união aos diferentes substratos dentários (TALIC, 2003), observou-se que a efetividade imediata da adesão à dentina erodida, bem como à dentina normal, não foi influenciada pela aplicação das diferentes soluções avaliadas neste estudo, independentemente se controle (água deionizada) ou se contendo CHX a 0,004% ou a 2%.

Estudos prévios já sugeriam que a CHX pode minimizar a depreciação, com o tempo, da qualidade da adesão à dentina, mas que não exerce papel relevante prontamente após o tratamento (BRESCHI et al., 2009; BRESCHI et al., 2010a; BRESCHI et al., 2010b; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; DE CASTRO et al., 2003; KOMORI et al., 2009; LOGUERCIO et al., 2009; PILO et al., 2001; SAY et al., 2004; STANISLAWCZUK et al., 2009). Interessante, nesse momento, é o fato de que, apesar de ser uma molécula relativamente grande, com elevado peso molecular, quando comparada com alguns componentes monoméricos dos sistemas adesivos, tais como o HEMA ou o Bis-GMA, a CHX não afeta negativamente a infiltração dos monômeros na dentina desmineralizada (RICCI et al., 2010). Pode ser aplicada, portanto, sem prejudicar o estabelecimento da pronta adesão aos diferentes substratos dentinários.

Embora a efetividade imediata da adesão à dentina continue a ser a variável de resposta considerada por grande parte dos estudos, o comportamento de interfaces adesivas em longo prazo, depois que os espécimes foram expostos a um

envelhecimento artificial, fornece informações mais relevantes sobre o possível comportamento clínico das restaurações (DE MUNCK et al., 2005; LOGUERCIO et al., 2009; VAN MEERBEEK et al., 2010; ZIMMERLI et al., 2012). Na verdade, estudos recentes destacam que os valores imediatos de RU à dentina nem sempre se correlacionam com a estabilidade dessa união em longo prazo (BRESCHI et al., 2008; DE MUNCK et al., 2005), já que a degradação das interfaces adesivas ocorre rapidamente (em seis meses, por exemplo) (BRESCHI et al., 2008; HASHIMOTO et al., 2002a; LOGUERCIO et al., 2009; REIS et al., 2005; TAY et al., 2005; WANG; SPENCER, 2003).

Quando os espécimes concernentes ao presente estudo foram, então, armazenados por seis meses, pôde-se observar que apenas a solução de CHX a 2% foi capaz de evitar a diminuição dos valores de RU da resina composta a ambas as condições de dentina, normal ou erodida.

Enquanto a eficácia antimicrobiana da CHX, quando utilizada previamente ou após o condicionamento ácido, continua sendo objeto de estudo, seus benefícios à preservação da RU à dentina, como inibidora de MMPs, quando aplicada em determinadas concentrações, antes do sistema adesivo, têm sido confirmados por vários autores (BRESCHI et al., 2009; BRESCHI et al., 2010a; BRESCHI et al., 2010b; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; HEBLING et al., 2005; KOMORI et al., 2009; LOGUERCIO et al., 2009; STANISLAWCZUK et al., 2009). As fibrilas de colágeno da dentina desmineralizada são, nessas circunstâncias, expostas à CHX, que se torna apreendida ao tecido, por meio de suas propriedades catiônicas, após selamento com o sistema adesivo (CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b), e passa a manifestar seus efeitos.

A efetividade da CHX, como agente antiproteolítico, ou mesmo antimicrobiano, tem sido, assim, relacionada à sua substantividade (BASRANI et al., 2002; CARRILHO et al., 2009; CARRILHO et al., 2010; FRANCO et al., 2003), interação prolongada entre uma substância (CHX, por exemplo) e um substrato (mucosa oral, proteínas, placa dentária, superfície dentinária, etc.), que pode ser melhor e mais duradoura do que a observada diante do simples mecanismo de deposição. A substantividade da CHX, ou sua capacidade de permanecer retida na matriz orgânica da dentina, pode ser responsável, portanto, pela prevenção ou minimização da diminuição dos valores de resistência de união de resinas compostas aos diferentes substratos dentinários com o passar do tempo (BRESCHI

et al., 2009; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; CARRILHO et al., 2010; HEBLING et al., 2005; LIU et al., 2011; PASHLEY et al., 2004; STANISLAWCZUK et al., 2009), justificando a efetividade da solução de CHX a 2%, no presente estudo, quando os espécimes foram envelhecidos por seis meses.

Tal solução (CHX a 2%), selecionada para o presente estudo em função de sua disponibilidade comercial como material de limpeza cavitária e de sua utilização pela quase totalidade dos trabalhos correlacionados (BRESCHI et al., 2010a), apresenta, por sua vez, concentração de CHX superior às mínimas capazes de inibir as MMPs -2, -8 e -9, equivalentes a, respectivamente, $\leq 0,0001\%$, 0,01-0,02% e 0,002% (GENDRON et al., 1999). Também por isso pode ter exercido papel significativo na conservação da adesão à dentina, quando os espécimes foram envelhecidos por seis meses, em consonância com resultados previamente apresentados (BRESCHI et al., 2009; BRESCHI et al., 2010a; BRESCHI et al., 2010b; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; HEBLING et al., 2005; KOMORI et al., 2009; LOGUERCIO et al., 2009; STANISLAWCZUK et al., 2009).

Já a solução de CHX a 0,004%, avaliada no presente estudo por apresentar a máxima concentração de tal substância que não causa efeitos tóxicos relevantes quando aplicada diretamente sobre células odontoblastóides em cultura (SOUZA et al., 2007), não seria capaz, em última instância, de inibir a atividade da MMP -8 (GENDRON et al., 1999), o que se torna justificativa plausível para sua não efetividade em minimizar a diminuição dos valores de resistência de união da resina composta a ambas as dentinas, normal ou erodida, ainda que estudo de Loguercio et al. (2009) indicasse a possibilidade do contrário.

Entende-se que a aplicação de um agente antiproteolítico sobre seu sítio de ação, de forma biologicamente ativa, e, notadamente, em doses efetivas, mantém os efeitos desse agente por prolongados períodos de tempo (CARRILHO et al., 2010; GREENSTEIN; POLSON, 1998). A substantividade da CHX a diferentes substratos dentinários varia, deste modo, de acordo com a concentração de tal substância na solução aplicada (CARRILHO et al., 2010). Baixas concentrações de CHX (0,2 a 0,45%) não são capazes de interagir, por exemplo, com hidroxipatitas sintéticas, enquanto que concentrações maiores (1 a 4,5%) são progressivamente retidas em tal substrato com o passar do tempo (CARRILHO et al., 2010; MISRA, 1994). Talvez por mais esta razão, justificar-se-ia a inefetividade da solução de CHX

a 0,004% em prevenir ou minimizar a diminuição dos valores de RU à dentina, normal ou erodida, quando do envelhecimento dos espécimes por seis meses.

Esses achados dão suporte à observação de que a capacidade da clorexidina em interferir na degradação do colágeno promovida pelas MMPs é dose-dependente (GENDRON et al., 1999). Da mesma maneira, espera-se que a concentração de clorexidina necessária para inibir as MMPs em situações clínicas deva ser maior que as avaliadas por Gendron et al. (1999), que as incubou, em laboratório, em contato direto com as MMPs, durante 30 min, em temperatura ambiente.

Dessa forma, pode-se inferir que os resultados aqui discutidos corroboram grande parte daqueles disponíveis na literatura científica, ainda que os materiais e métodos utilizados no presente estudo não deem suporte direto à conclusão de que a diminuição dos valores de resistência de união, com o passar do tempo, seja decorrente da atividade das MMPs, nem de que é sua inibição pelo uso da CHX responsável por minimizar seu efeito deletério na adesão à dentina normal ou erodida (BRESCHI et al., 2010b; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; GENDRON et al., 1999; HEBLING et al., 2005), já que esses fenômenos foram avaliados indiretamente.

Tal inferência, porém, não é ilógica, já que as MMPs -2, -8 e -9 são as principais enzimas responsáveis por degradar a matriz de colágeno da dentina (BRESCHI et al., 2010b; MARTIN-DE LAS HERAS; VALENZUELA; OVERALL, 2000; MAZZONI et al., 2005; SULKALA et al., 2007). Suporte científico a ela é conferido observando-se camadas híbridas bem preservadas não apenas em espécimes tratados com soluções de CHX, mas também naqueles armazenados em óleo mineral, o que evita a hidrólise enzimática do colágeno (BRESCHI et al., 2010b; GARCÍA-GODOY et al., 2007; TAY et al., 2003). Análises zimográficas correlatas são, ainda, provas categóricas de que as MMPs estão por trás da destruição tempo-dependente da camada híbrida e de que o uso de inibidores das mesmas são uma ferramenta valiosa para melhorar a durabilidade da união resina composta-substrato dentinário (BRESCHI et al., 2010b).

O uso da CHX como um *primer* terapêutico pode resultar, portanto, na formação de camadas híbridas, em dentina normal e/ou erodida, ao menos em médio prazo (seis meses), mais estáveis que aquelas estabelecidas nos respectivos substratos não previamente tratados. Já que todos os espécimes testados foram

armazenados em uma mesma solução (saliva artificial contendo azida de sódio - agente antimicrobiano), que era substituída a cada duas semanas, a possibilidade de terem sido as bactérias as responsáveis pela diminuição dos valores de RU no presente estudo, bem como nos de Carrilho et al. (2007a) e Komori et al. (2009), é mínima. A degradação das fibrilas de colágeno que participam da formação de camadas híbridas tem sido claramente observada na ausência de bactérias (CARRILHO et al., 2007a; HASHIMOTO et al., 2003b; PASHLEY et al., 2004).

Cabe ressaltar, ainda, que a CHX, por ser um agente antimicrobiano de largo espectro e um inibidor inespecífico de MMPs, pode contribuir para com a estabilidade das camadas híbridas também por meio de seu efeito detergente, que facilitaria a impregnação dos monômeros resinosos na dentina desmineralizada, ou mesmo por meio da inibição de outras enzimas da matriz dentinária (BRESCHI et al., 2010a; SCAFFA et al., 2010).

Além das MMPs, proteases cisteínicas *papaínas-like* lisossômicas da família das catepsinas têm sido relacionadas a várias condições fisiológicas e patológicas que resultam na degradação de componentes da matriz extracelular (DICKINSON, 2002; LI et al., 2004; SCAFFA et al., 2012; TURK; TURK; TURK, 1997), como o colágeno tipo I e proteoglicanos (OBERMAJER et al., 2008). Recentemente, a expressão genética de diferentes catepsinas cisteínicas, destacavelmente da catepsina B, foi demonstrada para a polpa e odontoblastos humanos (SCAFFA et al., 2012; TERSARIOL et al., 2010). A atividade das catepsinas cisteínicas na dentina e sua correlação com a atividade das MMPs também foram evidenciadas (SCAFFA et al., 2012; TERSARIOL et al., 2010). Scaffa et al. (2012) confirmaram a suposição de que a atividade proteolítica de enzimas do próprio hospedeiro na dentina é parcialmente decorrente da expressão de catepsinas cisteínicas (NASCIMENTO et al., 2011; TERSARIOL et al., 2010), em adição à das MMPs. Tais catepsinas podem ser ativadas em ambientes moderadamente ácidos e sua ativação pode resultar, posteriormente, na ativação de MMPs (LIU et al., 2011). Ainda, glicosaminoglicanos podem acelerar a conversão das formas latentes das catepsinas para sua forma ativa em pH neutro (OBERMAJER et al., 2008).

Em conjunto, três diferentes experimentos indicaram, também, que a CHX não inibe apenas as MMPs, mas interage profundamente, por meio de ligações eletrostáticas, com as catepsinas, inibindo adicionalmente a atividade destas

enzimas, de forma dose-dependente (SCAFFA et al., 2012). Já que as MMPs não são as únicas proteases presentes na dentina, a aplicação de um inibidor de largo espectro, como a CHX, pode ser responsável pela inibição dessas outras enzimas proteolíticas dentinárias (SCAFFA et al., 2012), quem sabe, contribuindo para com a preservação ou minimização da diminuição dos valores de resistência de união de materiais resinosos a diferentes substratos dentinários.

Por outro lado, já que o galardin, um inibidor sintético e específico de MMPs, tem mostrado habilidade semelhante em prevenir a degradação de interfaces adesivas, torna-se evidente que a inibição, designadamente, das MMPs da dentina pode ser importante para prolongar a vida útil de restaurações adesivas (BRESCHI et al., 2010a).

Cuidado deve ser atribuído, todavia, à aceitação da efetividade absoluta e incondicional de tal estratégia, já que, depois de um ano de envelhecimento, nenhuma das soluções aplicadas após o condicionamento ácido foi capaz de evitar a diminuição dos valores de RU da resina composta às dentinas normal ou erodida, ao contrário do que observaram Breschi et al. (2010b), ao avaliarem o efeito da aplicação de soluções de CHX a 0,2% e a 2% na estabilidade de interfaces adesivas por dois anos.

Aventa-se a forte possibilidade de que, na dentina tratada com soluções de CHX, as enzimas proteolíticas permaneçam inibidas apenas enquanto essa substância permanecer vinculada à matriz dentinária (CARRILHO et al., 2007b; CARRILHO et al., 2009; CARRILHO et al., 2010). Apesar de tal vínculo ser mantido, na dentina desmineralizada, pelo HEMA, após os procedimentos adesivos; ele é eletrostático por natureza e reversível (KIM, 2010). Parece, portanto, que a CHX, mesmo que a 2%, de acordo com os resultados obtidos, não permaneceu retida à dentina, normal ou erodida, diante do envelhecimento dos espécimes por um ano.

Carrilho et al. (2010) observaram notável substantividade da CHX, no que se refere às expectativas relacionadas ao seu efeito antiproteolítico, à dentina mineralizada, parcialmente desmineralizada ou completamente desmineralizada diante da incubação dos espécimes em tampão fosfato salino por, no máximo, oito semanas. O sucesso da utilização de soluções de CHX para postergar a degradação da união resina composta-substrato dentinário requer, então, que esforços científicos sejam direcionados à compreensão dos mecanismos responsáveis pela interação da CHX com a dentina em diferentes condições. Ou seja, é preciso

estudar variáveis tangentes à sua substantividade, numa tentativa de se protocolar sua aplicação clínica, de forma a maximizar sua retenção e eficácia (CARRILHO et al., 2010).

Ademais, como a camada híbrida é uma combinação da matriz orgânica da dentina com cristais residuais de hidroxiapatita, monômeros resinosos e solventes, os efeitos de seu envelhecimento podem ser decorrentes do comprometimento de cada um desses componentes, individualmente, ou da combinação sinérgica de vários processos de degradação que a acometem como um todo (BRESCHI et al., 2008; HASHIMOTO et al., 2002b). De fato, dentre os fenômenos que contribuem para com a degradação da interface de união resina composta-substrato dentinário, após armazenamento por longos períodos, destaca-se, considerando-se o contexto do presente estudo, a ação de enzimas proteolíticas da dentina (BRESCHI et al., 2010b; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; HASHIMOTO et al., 2000; HASHIMOTO et al., 2003c; HEBLING et al., 2005; KOSHIRO et al., 2005; LOGUERCIO et al., 2009; MAZZONI et al., 2006; DE MUNCK et al., 2003; NISHITANI et al., 2006; PASHLEY et al., 2004; TAY; PASHLEY, 2004a). A impregnação insuficiente de monômeros resinosos na dentina condicionada, a subpolimerização dos mesmos, a alta permeabilidade e separação de fases dos diferentes sistemas adesivos e, por conseguinte, a hidrólise do conteúdo resinoso interfibrilar são, por sua vez, outros ensejos que justificam a diminuição dos valores de RU de materiais resinosos à dentina com o passar do tempo (BRESCHI et al., 2008; HASHIMOTO et al., 2000; HASHIMOTO et al., 2002b; HASHIMOTO et al., 2003b; HASHIMOTO et al., 2003c; SANO et al., 1995a; SANO et al., 1995b; SANO et al., 1999; TAY; PASHLEY; YOSHIYAMA, 2002; VAIDYANATHAN; VAIDYANATHAN, 2009; VARGAS; COBB; DENEHY, 1997).

O efeito da lixiviação, ou seja, da solubilização seletiva de certos constituintes da camada híbrida, pode ser, de fato, especialmente significativo para estudos baseados em testes de microtração realizados *in vitro*, já que uma diminuição considerável dos valores de RU para espécimes tratados com CHX tem sido observada nesta condição (CARRILHO et al., 2007a), como no presente estudo, mas não *in vivo* (CARRILHO et al., 2007b). Muito provavelmente, espécimes obtidos de restaurações com margens em esmalte, seccionados apenas no momento da realização dos testes (CARRILHO et al., 2007b), são menos expostos aos efeitos depreciativos do envelhecimento artificial.

Nesse contexto, a redução dos valores de RU da resina composta ao substrato dentinário normal ou erodido, em função do envelhecimento por um ano, não minimizada nem mesmo pela aplicação da solução de CHX a 2%, poderia ser, então, atribuída não somente à ação das MMPs, mas também à degradação hidrolítica do sistema adesivo (KOMORI et al., 2009). Se a camada híbrida não é exposta a soluções aquosas, suas propriedades mecânico-químicas podem ser preservadas e, simultaneamente, as fibrilas de colágeno estariam protegidas da ação das MMPs endógenas. Tais enzimas necessitam de água para hidrolisar as ligações peptídicas das moléculas de colágeno (PASHLEY et al., 2004) e, portanto, o contato da interface adesiva dos espécimes seccionados em palitos com a saliva artificial em que foram armazenados desempenha efeito particular na degradação das fibrilas de colágeno pelas MMPs (KOMORI et al., 2009), além de depreciar a integridade dos componentes resinosos da camada híbrida (CARRILHO et al., 2005b).

O envelhecimento de microespécimes em soluções aquosas pode ser considerado, ainda, bastante agressivo, já que a interface adesiva, de dimensões consideravelmente reduzidas, está diretamente exposta à respectiva solução, que a penetra facilmente, tornando-a muito propensa à degradação hidrolítica (DE MUNCK et al., 2005; HASHIMOTO et al., 2000; ZIMMERLI et al., 2012). A substituição da solução de armazenamento dos espécimes a cada duas semanas, nem sempre adotada, ou não descrita, por estudos com resultados distintos dos aqui observados (BRESCHI et al., 2010a; BRESCHI et al., 2010b; LOGUERCIO et al., 2009), pode ter potencializado os efeitos de tal envelhecimento, contribuindo para com a redução dos valores de RU ao substrato dentinário normal ou erodido com o passar do tempo.

Depois de um ano de envelhecimento, inclusive, os espécimes, de maneira geral, pareceram mais propensos a fraturar precocemente durante o processamento pertinente à realização dos testes de microtração, em consonância com o observado por Zimmerli et al. (2012). Tal estudo mostra que as secções dos espécimes de resina composta-dentina erodida envelhecidos por um ano, preparadas para avaliação em microscopia eletrônica de transmissão (MET), relacionavam-se a uma maior nanoinfiltração (deposição de prata) e a uma menor pigmentação da matriz colágena, o que indica que as fibrilas expostas foram gravemente afetadas pelo envelhecimento.

Clinicamente, a possibilidade de tal degradação acontecer nessas proporções parece ser menor e, na verdade, ensaios clínicos randomizados devem ser conduzidos para que evidências definitivamente sólidas sobre o papel de inibidores de MMPs na preservação da qualidade da união de materiais resinosos à dentina sejam obtidas. De qualquer forma, com base nos resultados aqui discutidos, atenção deve ser atribuída à possibilidade da CHX não ser efetiva em longo prazo.

Quanto à análise do padrão de fratura (KOMORI et al., 2009; ZIMMERLI et al., 2012) dos palitos testados, falhas adesivas e/ou mistas foram as preponderantemente observadas, em conformidade com o demonstrado pela literatura conexa (BRESCHI et al., 2009; BRESCHI et al., 2010a; BRESCHI et al., 2010b; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; KOMORI et al., 2009; LOGUERCIO et al., 2009). Assim sendo, admite-se que os valores de RU obtidos, passíveis de interpretação segura, refletem a real qualidade da união resina composta-substrato dentinário.

A análise dos valores de RU ao substrato dentinário em diferentes condições e do padrão de fratura que apresentaram os palitos testados foi, por fim, complementada pela apreciação qualitativa dos espécimes. A avaliação da micromorfologia de interfaces adesivas, em MCVL, permite, quando da incorporação de corantes fluorescentes aos agentes adesivos, que a camada híbrida, a extensão, quantidade e regularidade dos *tags*, e possíveis defeitos ou alterações existentes sejam contemplados e qualitativamente discutidos (D'ALPINO et al., 2006a; D'ALPINO et al., 2006b; WATSON, 1991).

Inoportunamente, diferenças evidentes entre os grupos experimentais, no presente estudo, não puderam ser observadas, ainda que tenha sido possível sugerir que a qualidade da hibridização para a dentina erodida é inferior à qualidade da hibridização para a dentina normal, independentemente da solução com que foram reidratadas ou do tempo de envelhecimento dos respectivos espécimes. É possível notar que a penetração do sistema adesivo no interior dos túbulos dentinários é diferente para os distintos tipos de dentina estudados. Talvez a erosão tenha proporcionado a precipitação de resíduos advindos da dissolução da dentina e/ou dos próprios meios de armazenagem (Coca-cola® e saliva artificial) no interior dos respectivos túbulos, interferindo na formação dos *tags*. Ilustra-se, portanto, a qualidade da adesão aos referidos substratos, aferida pelos testes de microtração.

Finalmente, não se pode desconsiderar a contribuição do presente estudo, *in vitro*, à compreensão do papel da aplicação de soluções de CHX, posteriormente ao condicionamento ácido, na adesão à dentina normal e, pioneiramente, à erodida. Discutindo-se os resultados obtidos, nota-se, mais uma vez, que a atividade das MMPs na matriz dentinária não deve despertar apenas o interesse acadêmico-científico (CARRILHO et al., 2007a). Os cirurgiões-dentistas precisam compreender o papel dessas enzimas diante de protocolos relacionados à restauração adesiva não apenas do substrato dentinário normal ou acometido pela cárie, mas também daquele que sofreu erosão dentária.

Estudos clínicos dificilmente permitiriam isolar as variáveis estudadas e trabalhos realizados *in vitro* podem, portanto, incitar conclusões acerca da realidade em consideração. Experimentos *in vitro* são, ainda, a base para justificar trabalhos *in situ*, *in vivo* com animais e, só então, os ensaios clínicos randomizados (HANNAS et al., 2007).

Cabe ressaltar que, como a RU e a durabilidade das restaurações adesivas parecem depender da qualidade da camada híbrida como um todo e não da espessura ou morfologia de tal camada ou dos *tags* de resina (DE MUNCK et al., 2005), diferentes abordagens têm sido propostas para melhorar a infiltração dos monômeros resinosos na dentina desmineralizada e reduzir a taxa de absorção de água e a degradação do colágeno. A aplicação de uma camada adicional ou de múltiplas camadas de um agente adesivo hidrofóbico (HASHIMOTO et al., 2004; HASHIMOTO et al., 2005; ITO et al., 2005; KING et al., 2005; PASHLEY et al., 2002), a evaporação vigorosa do solvente (VAN LANDUYT et al., 2005), a polimerização prolongada do adesivo (CADENARO et al., 2005; CADENARO et al., 2006), o uso de corrente elétrica para melhorar a impregnação dos monômeros (BRESCHI et al., 2006; PASQUANTONIO et al., 2007) e, destacadamente, o uso de inibidores de MMPs (BRESCHI et al., 2009; BRESCHI et al., 2010a; BRESCHI et al., 2010b; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; HEBLING et al., 2005; KOMORI et al., 2009; LOGUERCIO et al., 2009; STANISLAWCZUK et al., 2009), são algumas das modificações atribuídas aos protocolos clínicos que minimizam as limitações da adesão à dentina (BRESCHI et al., 2008).

Ainda não se sabe claramente, contudo, quais os mecanismos envolvidos na inibição das MMPs pela CHX, qual seu potencial de difusão na dentina diante da pressão intrapulpar, qual a concentração ideal capaz de inibir as MMPs sem causar

efeitos tóxicos às células pulpares; quais as causas da diminuição remanescente da RU à dentina tratada com CHX, qual o tempo ideal para sua aplicação, qual o tempo em que ela permanece retida na camada híbrida, qual a longevidade de seu efeito (CARRILHO et al., 2007a; LESSA et al., 2010b; LOGUERCIO et al., 2009), dentre outras informações imprescindíveis ao estabelecimento de protocolos clínicos efetivos.

Assim, investigações futuras são necessárias para confirmar os resultados aqui discutidos e elucidar outras curiosidades relacionadas à utilização da CHX como inibidora de enzimas proteolíticas da dentina.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que a aplicação de soluções de digluconato de clorexidina, a 2%, apresenta-se como uma estratégia promissora à prevenção da diminuição dos valores de resistência de união de resinas compostas tanto à dentina normal quanto à dentina erodida. Com o tempo, no entanto, seu efeito pode tornar-se reduzido ou irrelevante.

Cada hipótese nula proposta deve ser, portanto, respectivamente:

1) Rejeitada, pois os valores de RU da resina composta à dentina erodida foram inferiores aos valores de RU da resina composta à dentina normal, independentemente do tempo de envelhecimento dos espécimes e da aplicação das soluções de CHX em diferentes concentrações;

2) Rejeitada, pois os valores de RU da resina composta à dentina, normal ou erodida, tratada com a solução controle e com a de CHX a 0,004% experimentaram redução significativa com o passar do tempo, prevenida pela aplicação da solução de CHX a 2%, até os 6 meses de envelhecimento dos espécimes;

3) Rejeitada, pois os valores de RU da resina composta à dentina, normal ou erodida, experimentaram redução significativa após 6 meses de envelhecimento dos espécimes, quando da aplicação da água deionizada e da solução de CHX a 0,004%, e após 1 ano de envelhecimento dos espécimes, quando da aplicação da água deionizada (redução ainda maior) e das soluções de CHX a 0,004% e mesmo a 2%.

Referências

REFERÊNCIAS

Abrahamsen TC. The worn dentition--pathognomonic patterns of abrasion and erosion. *Int Dent J*. 2005;55(4 Suppl 1):268-76.

Al-Dlaigan YH, Shaw L, Smith A. Dental erosion in a group of British 14-year-old, school children. Part I: Prevalence and influence of differing socioeconomic backgrounds. *Br Dent J*. 2001;190(3):145-9.

Al-Dlaigan YH, Shaw L, Smith AJ. Dental erosion in a group of British 14-year-old, school children. Part III: Influence of oral hygiene practises. *Br Dent J*. 2002;192(9):526-30.

Amaechi BT, Higham SM. Dental erosion: possible approaches to prevention and control. *J Dent*. 2005;33(3):243-52.

Amaechi BT, Higham SM. Eroded enamel lesion remineralization by saliva as a possible factor in the site-specificity of human dental erosion. *Arch Oral Biol*. 2001;46(8):697-703.

Aranha AC, Eduardo C de P, Cordás TA. Eating disorders. Part I: Psychiatric diagnosis and dental implications. *J Contemp Dent Pract*. 2008;9(6):73-81.

Armstrong S, Geraldeli S, Maia R, Raposo LH, Soares CJ, Yamagawa J. Adhesion to tooth structure: a critical review of "micro" bond strength test methods. *Dent Mater*. 2010;26(2):e50-62.

Armstrong SR, Jessop JL, Winn E, Tay FR, Pashley DH. Denaturation temperatures of dentin matrices. I. Effect of demineralization and dehydration. *J Endod*. 2006;32(7):638-41.

Armstrong SR, Jessop JL, Winn E, Tay FR, Pashley DH. Effects of polar solvents and adhesive resin on the denaturation temperatures of demineralised dentine matrices. *J Dent*. 2008;36(1):8-14.

Armstrong SR, Vargas MA, Chung I, Pashley DH, Campbell JA, Laffoon JE et al. Resin-dentin interfacial ultrastructure and microtensile dentin bond strength after five-year water storage. *Oper Dent*. 2004;29(6):705-12.

Attin T, Siegel S, Buchalla W, Lennon AM, Hannig C, Becker K. Brushing abrasion of softened and remineralised dentin: an in situ study. *Caries Res*. 2004;38(1):62-6.

Azzopardi A, Bartlett DW, Watson TF, Sherriff M. The measurement and prevention of erosion and abrasion. *J Dent*. 2001;29(6):395-400.

Azzopardi A, Bartlett DW, Watson TF, Sherriff M. The surface effects of erosion and abrasion on dentine with and without a protective layer. *Br Dent J*. 2004;196(6):351-4.

Bader JD, Levitch LC, Shugars DA, Heymann HO, McClure F. How dentists classified and treated non-carious cervical lesions. *J Am Dent Assoc*. 1993;124(5):46-54.

Badra VV, Faraoni JJ, Ramos RP, Palma-Dibb RG. Influence of different beverages on the microhardness and surface roughness of resin composites. *Oper Dent*. 2005;30(2):213-9.

Barbour ME, Shellis RP, Parker DM, Allen GC, Addy M. An investigation of some food-approved polymers as agents to inhibit hydroxyapatite dissolution. *Eur J Oral Sci*. 2005;113(6):457-61.

Barron RP, Carmichael RP, Marcon MA, Sándor GK. Dental erosion in gastroesophageal reflux disease. *J Can Dent Assoc*. 2003;69(2):84-9.

Bartlett D, Ganss C, Lussi A. Basic Erosive Wear Examination (BEWE): a new scoring system for scientific and clinical needs. *Clin Oral Investig*. 2008;12 Suppl 1:S65-8.

Bartlett D, Sundaram G. An up to 3-year randomized clinical study comparing indirect and direct resin composites used to restore worn posterior teeth. *Int J Prosthodont*. 2006;19(6):613-7.

Bartlett DW, Phillips K, Smith B. A difference in perspective--the North American and European interpretations of tooth wear. *Int J Prosthodont*. 1999;12(5):401-8.

Bartlett DW, Shah P. A critical review of non-carious cervical (wear) lesions and the role of abfraction, erosion, and abrasion. *J Dent Res*. 2006;85(4):306-12.

Bartlett JD, Beniash E, Lee DH, Smith CE. Decreased mineral content in MMP-20 null mouse enamel is prominent during the maturation stage. *J Dent Res*. 2004;83(12):909-13.

Basrani B, Santos JM, Tjäderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J et al. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;94(2):240-5.

Bassiouny MA, Zarrinnia K. Dental erosion: a complication of pervasive developmental disorder. *J Clin Pediatr Dent*. 2004;28(3):273-8.

Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol*. 1993;64(5 Suppl):474-84.

Birkhed D. Sugar content, acidity and effect on plaque pH of fruit juices, fruit drinks, carbonated beverages and sport drinks. *Caries Res*. 1984;18(2):120-7.

Borcic J, Anic I, Smojver I, Catic A, Miletic I, Ribaric SP. 3D finite element model and cervical lesion formation in normal occlusion and in malocclusion. *J Oral Rehabil*. 2005;32(7):504-10.

Boukpepsi T, Menashi S, Camoin L, Tencate JM, Goldberg M, Chaussain-Miller C. The effect of stromelysin-1 (MMP-3) on non-collagenous extracellular matrix proteins of demineralized dentin and the adhesive properties of restorative resins. *Biomaterials*. 2008;29(33):4367-73.

Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Bagnell R, Yamauchi M. Immunohistochemical localization of matrixmetalloproteinase-2 in human coronal dentin. *Arch Oral Biol*. 2008;53(2):109-16.

Brackett WW, Brackett MG, Dib A, Franco G, Estudillo H. Eighteen-month clinical performance of a self-etching primer in unprepared class V resin restorations. *Oper Dent*. 2005a;30(4):424-9.

Brackett WW, Ito S, Tay FR, Haisch LD, Pashley DH. Microtensile dentin bond strength of self-etching resins: effect of a hydrophobic layer. *Oper Dent*. 2005b;30(6):733-8.

Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dib A, Sword RJ, Pashley DH. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. *Oper Dent*. 2007;32(2):107-11.

Breschi L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vita F, Carrilho M et al. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. *J Adhes Dent*. 2009;11(3):191-8.

Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L et al. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dent Mater*. 2010a;26(6):571-8.

Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L et al. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dent Mater*. 2010b;26(4):320-5.

Breschi L, Mazzoni A, Pashley DH, Pasquantonio G, Ruggeri A, Suppa P et al. Electric-current-assisted application of self-etch adhesives to dentin. *J Dent Res*. 2006;85(12):1092-6.

Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater*. 2008;24(1):90-101.

Brunton PA, Hussain A. The erosive effect of herbal tea on dental enamel. *J Dent*. 2001;29(8):517-20.

Brunton PA, Kalsi KS, Watts DC, Wilson NH. Resistance of two dentin-bonding agents and a dentin desensitizer to acid erosion in vitro. *Dent Mater*. 2000;16(5):351-5.

- Cadenaro M, Antonioli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Prati C et al. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2005;113(6):525-30.
- Cadenaro M, Breschi L, Antonioli F, Mazzoni A, Di Lenarda R. Influence of whitening on the degree of conversion of dental adhesives on dentin. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(3):257-62.
- Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipolito V, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res.* 2007a;86(1):90-4.
- Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Nicolau J, Breschi L, Mazzoni A et al. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dent Mater.* 2010;26(8):779-85.
- Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Yiu C, Pashley DH. Durability of resin-dentin bonds related to water and oil storage. *Am J Dent.* 2005a;18(6):315-9.
- Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, Pashley D. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res.* 2007b;86(6):529-33.
- Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjäderhane L, Mazzoni A et al. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;90(1):373-80.
- Carrilho MR, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L, Carvalho RM. Mechanical stability of resin-dentin bond components. *Dent Mater.* 2005b;21(3):232-41.
- Caterina JJ, Skobe Z, Shi J, Ding Y, Simmer JP, Birkedal-Hansen H et al. Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem.* 2002;277(51):49598-604.
- Ceballos L, Camejo DG, Victoria Fuentes M, Osorio R, Toledano M, Carvalho RM et al. Microtensile bond strength of total-etch and self-etching adhesives to caries-affected dentine. *J Dent.* 2003;31(7):469-77.
- Ceruti P, Menicucci G, Mariani GD, Pittoni D, Gassino G. Non carious cervical lesions. A review. *Minerva Stomatol.* 2006;55(1-2):43-57.

- Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res.* 2006;85(1):22-32
- D'Alpino PH, Pereira JC, Rueggeberg FA, Svizero NR, Miyake K, Pashley DH. Efficacy of composite surface sealers in sealing cavosurface marginal gaps. *J Dent.* 2006a; 34(3):252-9.
- D'Alpino PH, Pereira JC, Svizero NR, Rueggeberg FA, Pashley DH. Use of fluorescent compounds in assessing bonded resin-based restorations: A literature review. *J Dent.* 2006b; 34(9):623-4.
- Davis WB, Winter PJ. Dietary erosion of adult dentine and enamel. Protection with a fluoride toothpaste. *Br Dent J.* 1977;143(4):116-9.
- Dayan D, Binderman I, Mechanic GL. A preliminary study of activation of collagenase in carious human dentine matrix. *Arch Oral Biol.* 1983;28(2):185-7.
- de Castro FL, de Andrade MF, Duarte Júnior SL, Vaz LG, Ahid FJ. Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. *J Adhes Dent.* 2003;5(2):129-38.
- De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res.* 2005;84(2):118-32.
- De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res.* 2003;82(2):136-40.
- de Souza LB, de Aquino SG, de Souza PP, Hebling J, Costa CA. Cytotoxic effects of different concentrations of chlorhexidine. *Am J Dent.* 2007;20(6):400-4.
- Deery C, Wagner ML, Longbottom C, Simon R, Nugent ZJ. The prevalence of dental erosion in a United States and a United Kingdom sample of adolescents. *Pediatr Dent.* 2000;22(6):505-10.
- Demeule M, Brossard M, Pagé M, Gingras D, Béliveau R. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1478(1):51-60.

Devlin H, Bassiouny MA, Boston D. Hardness of enamel exposed to Coca-Cola and artificial saliva. *J Oral Rehabil.* 2006;33(1):26-30.

Dickinson DP. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(3):238-75.

Dietschi D, Argente A. A comprehensive and conservative approach for the restoration of abrasion and erosion. Part I: concepts and clinical rationale for early intervention using adhesive techniques. *Eur J Esthet Dent.* 2011;6(1):20-33.

Driscoll SE. A pattern of erosive carious lesions from cocaine use. *J Mass Dent Soc.* 2003;52(3):12-4.

Dung SZ, Gregory RL, Li Y, Stookey GK. Effect of lactic acid and proteolytic enzymes on the release of organic matrix components from human root dentin. *Caries Res.* 1995;29(6):483-9.

Dynesen AW, Bardow A, Petersson B, Nielsen LR, Nauntofte B. Salivary changes and dental erosion in bulimia nervosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106(5):696-707.

Eccles JD, Jenkins WG. Dental erosion and diet. *J Dent.* 1974;2(4):153-9.

Eccles JD. Dental erosion of nonindustrial origin. A clinical survey and classification. *J Prosthet Dent.* 1979;42(6):649-53.

Eccles JD. Erosion affecting the palatal surfaces of upper anterior teeth in young people. A report of 19 cases. *Br Dent J.* 1982a;152(11):375-8.

Eccles JD. Tooth surface loss from abrasion, attrition and erosion. *Dent Update.* 1982b;9(7):373-4, 376-8, 380-1.

Edwards M, Creanor SL, Foye RH, Gilmour WH. Buffering capacities of soft drinks: the potential influence on dental erosion. *J Oral Rehabil.* 1999;26(12):923-7.

Ejeil AL, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Godeau G, Gogly B. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva. *J Periodontol*. 2003;74(2):188-95.

El-din AK, Miller BH, Griggs JA. Resin bonding to sclerotic, noncarious, cervical lesions. *Quintessence Int*. 2004;35(7):529-40.

Federlin M, Thonemann B, Schmalz G, Urlinger T. Clinical evaluation of different adhesive systems for restoring teeth with erosion lesions. *Clin Oral Investig*. 1998;2(2):58-66.

Ferrari M, Tay FR. Technique sensitivity in bonding to vital, acid-etched dentin. *Oper Dent*. 2003;28(1):3-8.

Francisconi LF, Honório HM, Rios D, Magalhães AC, Machado MA, Buzalaf MA. Effect of erosive pH cycling on different restorative materials and on enamel restored with these materials. *Oper Dent*. 2008;33(2):203-8.

Franco CF, Pataro AL, E Souza LC, Santos VR, Cortés ME, Sinisterra RD. In vitro effects of a chlorhexidine controlled delivery system. *Artif Organs*. 2003;27(5):486-91.

Frank RM, Voegel JC. Ultrastructure of the human odontoblast process and its mineralisation during dental caries. *Caries Res*. 1980;14(6):367-80.

Frank RM. Structural events in the caries process in enamel, cementum, and dentin. *J Dent Res*. 1990;69 Spec No:559-66.

Fusayama T. Intratubular crystal deposition and remineralization of carious dentin. *J Biol Buccale*. 1991;19(3):255-62.

Galardy RE, Cassabonne ME, Giese C, Gilbert JH, Lapierre F, Lopez H et al. Low molecular weight inhibitors in corneal ulceration. *Ann N Y Acad Sci*. 1994a;732:315-23.

Galardy RE, Grobelny D, Foellmer HG, Fernandez LA. Inhibition of angiogenesis by the matrix metalloprotease inhibitor N-[2R-2-(hydroxamidocarbonylmethyl)-4-methylpentanoyl]-L-tryptophan methylamide. *Cancer Res*. 1994b;54(17):4715-8.

Galler K, Hiller KA, Ettl T, Schmalz G. Selective influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting materials. *J Endod*. 2005;31(5):396-9.

Ganss C, Klimek J, Giese K. Dental erosion in children and adolescents-a cross-sectional and longitudinal investigation using study models. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2001;29(4):264-71

Ganss C, Klimek J, Starck C. Quantitative analysis of the impact of the organic matrix on the fluoride effect on erosion progression in human dentine using longitudinal microradiography. *Arch Oral Biol*. 2004;49(11):931-5.

Ganss C, Schlueter N, Hardt M, von Hinckeldey J, Klimek J. Effects of toothbrushing on eroded dentine. *Eur J Oral Sci*. 2007;115(5):390-6.

Garbisa S, Sartor L, Biggin S, Salvato B, Benelli R, Albini A. Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. *Cancer*. 2001;91(4):822-32.

García-Godoy F, Tay FR, Pashley DH, Feilzer A, Tjäderhane L, Pashley EL. Degradation of resin-bonded human dentin after 3 years of storage. *Am J Dent*. 2007;20(2):109-13.

Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999;6(3):437-9.

Grando LJ, Tames DR, Cardoso AC, Gabilan NH. In vitro study of enamel erosion caused by soft drinks and lemon juice in deciduous teeth analysed by stereomicroscopy and scanning electron microscopy. *Caries Res*. 1996;30(5):373-8.

Greenstein G, Polson A. The role of local drug delivery in the management of periodontal diseases: a comprehensive review. *J Periodontol*. 1998;69(5):507-20.

Grippio JO, Simring M, Schreiner S. Attrition, abrasion, corrosion and abfraction revisited: a new perspective on tooth surface lesions. *J Am Dent Assoc*. 2004;135(8):1109-18.

Grippio JO. Abfractions: a new classification of hard tissue lesions of teeth. *J Esthet Dent*. 1991;3(1):14-9.

Grippio JO. Bioengineering seeds of contemplation: a private practitioner's perspective. *Dent Mater*. 1996;12(3):198-202.

Grippio JO. Erosion vs. corrosion. *J Am Dent Assoc*. 2007;138(12):1535; author reply 1535-6.

Grippio JO. Noncarious cervical lesions: the decision to ignore or restore. *J Esthet Dent*. 1992;4(Suppl):55-64.

Grobelny D, Poncz L, Galardy RE. Inhibition of human skin fibroblast collagenase, thermolysin, and *Pseudomonas aeruginosa* elastase by peptide hydroxamic acids. *Biochemistry*. 1992;31(31):7152-4.

Grobler SR, van der Horst G. Biochemical analysis of various cool drinks with regard to enamel erosion, de- and remineralization. *J Dent Assoc S Afr*. 1982;37(10):681-4.

Gusman H, Santana RB, Zehnder M. Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. *Eur J Oral Sci*. 2002;110(5):353-7.

Haj-Ali R, Walker M, Williams K, Wang Y, Spencer P. Histomorphologic characterization of noncarious and caries-affected dentin/adhesive interfaces. *J Prosthodont*. 2006;15(2):82-8.

Hanks CT, Craig RG, Diehl ML, Pashley DH. Cytotoxicity of dental composites and other materials in a new in vitro device. *J Oral Pathol*. 1988;17(8):396-403.

Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand*. 2007;65(1):1-13

Hao JL, Nagano T, Nakamura M, Kumagai N, Mishima H, Nishida T. Galardin inhibits collagen degradation by rabbit keratocytes by inhibiting the activation of pro-matrix metalloproteinases. *Exp Eye Res*. 1999;68(5):565-72.

Hara AT, Ando M, Cury JA, Serra MC, González-Cabezas C, Zero DT. Influence of the organic matrix on root dentine erosion by citric acid. *Caries Res.* 2005;39(2):134-8.

Hara AT, Zero DT. Analysis of the erosive potential of calcium-containing acidic beverages. *Eur J Oral Sci.* 2008;116(1):60-5.

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

Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Sano H, Endo K, Oguchi H. The extent to which resin can infiltrate dentin by acetone-based adhesives. *J Dent Res.* 2002a;81(1):74-8.

Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. Degradation patterns of different adhesives and bonding procedures. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2003a;66(1):324-30.

Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. *Biomaterials.* 2003b;24(21):3795-803.

Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Tay FR, Kaga M, Kudou Y et al. Micromorphological changes in resin-dentin bonds after 1 year of water storage. *J Biomed Mater Res.* 2002b;63(3):306-11.

Hashimoto M, Sano H, Yoshida E, Hori M, Kaga M, Oguchi H et al. Effects of multiple adhesive coatings on dentin bonding. *Oper Dent.* 2004;29(4):416-23.

Hashimoto M, Tay FR, Ito S, Sano H, Kaga M, Pashley DH. Permeability of adhesive resin films. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005;74(2):699-705.

Hashimoto M, Tay FR, Ohno H, Sano H, Kaga M, Yiu C et al. SEM and TEM analysis of water degradation of human dentinal collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2003c;66(1):287-98.

Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res.* 2005;84(8):741-6.

Hellwig E, Lussi A. Oral hygiene products and acidic medicines. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:112-8.

Hemmings KW, Darbar UR, Vaughan S. Tooth wear treated with direct composite restorations at an increased vertical dimension: results at 30 months. *J Prosthet Dent.* 2000;83(3):287-93.

Hidalgo E, Dominguez C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro.* 2001;15(4-5):271-6.

Hjeljord LG, Rolla G, Bonesvoll P. Chlorhexidine-protein interactions. *J Periodontal Res Suppl.* 1973;12:11-6.

Holbrook WP, Arnadóttir IB, Kay EJ. Prevention. Part 3: prevention of tooth wear. *Br Dent J.* 2003;195(2):75-81.

Honório HM, Rios D, Francisconi LF, Magalhães AC, Machado MA, Buzalaf MA. Effect of prolonged erosive pH cycling on different restorative materials. *J Oral Rehabil.* 2008a;35(12):947-53.

Honório HM, Rios D, Santos CF, Magalhães AC, Buzalaf MA, Machado MA. Effects of erosive, cariogenic or combined erosive/cariogenic challenges on human enamel: an in situ/ex vivo study. *Caries Res.* 2008b;42(6):454-9.

Hooper S, West NX, Sharif N, Smith S, North M, De'Ath J et al. A comparison of enamel erosion by a new sports drink compared to two proprietary products: a controlled, crossover study in situ. *J Dent.* 2004;32(7):541-5.

Hugoson A, Bergendal T, Ekfeldt A, Helkimo M. Prevalence and severity of incisal and occlusal tooth wear in an adult Swedish population. *Acta Odontol Scand.* 1988;46(5):255-65.

Ibsen RL, Ouellet DF. Restoring the worn dentition. *J Esthet Dent.* 1992;4(3):96-101.

Imfeld T. Dental erosion. Definition, classification and links. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(2 (Pt 2)):151-5.

Ito S, Tay FR, Hashimoto M, Yoshiyama M, Saito T, Brackett WW et al. Effects of multiple coatings of two all-in-one adhesives on dentin bonding. *J Adhes Dent*. 2005;7(2):133-41.

Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. *Monogr Oral Sci*. 2006;20:44-65.

Jensdottir T, Arnadottir IB, Thorsdottir I, Bardow A, Gudmundsson K, Theodors A et al. Relationship between dental erosion, soft drink consumption, and gastroesophageal reflux among Icelanders. *Clin Oral Investig*. 2004;8(2):91-6.

Johansson AK, Lingström P, Imfeld T, Birkhed D. Influence of drinking method on tooth-surface pH in relation to dental erosion. *Eur J Oral Sci*. 2004;112(6):484-9.

Jones SJ, Boyde A. Scanning microscopic observations on dental caries. *Scanning Microsc*. 1987;1(4):1991-2002.

Kaidonis JA. Tooth wear: the view of the anthropologist. *Clin Oral Investig*. 2008;12(Suppl 1):21-6.

Kato MT, de Moraes Italiani F, de Araújo JJ, Garcia MD, de Carvalho Sales-Peres SH, Buzalaf MA. Preventive effect of an iron varnish on bovine enamel erosion in vitro. *J Dent*. 2009a;37(3):233-6.

Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MA. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. *J Dent Res*. 2010;89(5):468-72.

Kato MT, Magalhães AC, Rios D, Hannas AR, Attin T, Buzalaf MA. Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. *J Appl Oral Sci*. 2009b;17(6):560-4.

Katz S, Park KK, Palenik CJ. In-vitro root surface caries studies. *J Oral Med*. 1987;42(1):40-8.

Kawasaki K, Featherstone JD. Effects of collagenase on root demineralization. *J Dent Res*. 1997;76(1):588-95.

Khan F, Young WG, Shahabi S, Daley TJ. Dental cervical lesions associated with occlusal erosion and attrition. *Aust Dent J*. 1999;44(3):176-86.

Kilpatrick N, Mahoney EK. Dental erosion: part 2. The management of dental erosion. *N Z Dent J*. 2004;100(2):42-7.

Kim J, Gu L, Breschi L, Tjäderhane L, Choi KK, Pashley DH et al. Implication of ethanol wet-bonding in hybrid layer remineralization. *J Dent Res*. 2010;89(6):575-80.

King NM, Tay FR, Pashley DH, Hashimoto M, Ito S, Brackett WW et al. Conversion of one-step to two-step self-etch adhesives for improved efficacy and extended application. *Am J Dent*. 2005;18(2):126-34.

Kleter GA, Damen JJ, Buijs MJ, Ten Cate JM. The Maillard reaction in demineralized dentin in vitro. *Eur J Oral Sci*. 1997;105(3):278-84.

Kleter GA, Damen JJ, Everts V, Niehof J, Ten Cate JM. The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin in vitro. *J Dent Res*. 1994;73(9):1523-9.

Klont B, ten Cate JM. Remineralization of bovine incisor root lesions in vitro: the role of the collagenous matrix. *Caries Res*. 1991;25(1):39-45.

Komori PC, Pashley DH, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, de Goes MF et al. Effect of 2% chlorhexidine digluconate on the bond strength to normal versus caries-affected dentin. *Oper Dent*. 2009;34(2):157-65.

Koshiro K, Inoue S, Sano H, De Munck J, Van Meerbeek B. In vivo degradation of resin-dentin bonds produced by a self-etch and an etch-and-rinse adhesive. *Eur J Oral Sci*. 2005;113(4):341-8.

Krutchkoff DJ, Eisenberg E, O'Brien JE, Ponzillo JJ. Cocaine-induced dental erosions. *N Engl J Med*. 1990;322(6):408.

Lambrechts P, Van Meerbeek B, Perdigão J, Gladys S, Braem M, Vanherle G. Restorative therapy for erosive lesions. *Eur J Oral Sci*. 1996;104(2):229-40.

Larsen MJ, Nyvad B. Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res.* 1999;33(1):81-7.

Larsen MJ, Richards A. Fluoride is unable to reduce dental erosion from soft drinks. *Caries Res.* 2002;36(1):75-80.

Larsen MJ. On the chemical and physical nature of erosions and caries lesions in dental enamel. *Caries Res.* 1991;25(5):323-9.

Lee WC, Eakle WS. Possible role of tensile stress in the etiology of cervical erosive lesions of teeth. *J Prosthet Dent.* 1984;52(3):374-80.

Lessa FC, Aranha AM, Nogueira I, Giro EM, Hebling J, Costa CA. Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. *J Appl Oral Sci.* 2010a;18(1):50-8.

Lessa FC, Nogueira I, Huck C, Hebling J, Costa CA. Transdental cytotoxic effects of different concentrations of chlorhexidine gel applied on acid-conditioned dentin substrate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010b;92(1):40-7.

Li Z, Yasuda Y, Li W, Bogoy M, Katz N, Gordon RE et al. Regulation of collagenase activities of human cathepsins by glycosaminoglycans. *J Biol Chem.* 2004;279(7):5470-9.

Litonjua LA, Andreana S, Bush PJ, Cohen RE. Tooth wear: attrition, erosion, and abrasion. *Quintessence Int.* 2003;34(6):435-46.

Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J et al. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res.* 2011;90(8):953-68.

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

Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res.* 2004;38(Suppl 1):34-44.

Lussi A, Jaeggi T. Erosion--diagnosis and risk factors. Clin Oral Investig. 2008;12 Suppl 1:S5-13.

Lussi A, Jäggi T, Schärer S. The influence of different factors on in vitro enamel erosion. Caries Res. 1993;27(5):387-93.

Lussi A, Kohler N, Zero D, Schaffner M, Megert B. A comparison of the erosive potential of different beverages in primary and permanent teeth using an in vitro model. Eur J Oral Sci. 2000;108(2):110-4.

Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. Caries Res. 2011;45 Suppl 1:2-12.

Lussi A. Dental erosion clinical diagnosis and case history taking. Eur J Oral Sci. 1996;104(2 (Pt 2)):191-8.

Magalhães AC, Moraes SM, Rios D, Buzalaf MA. Effect of ion supplementation of a commercial soft drink on tooth enamel erosion. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2009a;26(2):152-6.

Magalhães AC, Stancari FH, Rios D, Buzalaf MA. Effect of an experimental 4% titanium tetrafluoride varnish on dental erosion by a soft drink. J Dent. 2007;35(11):858-61.

Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MA. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. J Dent. 2009b;37(12):994-8.

Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Honório HM, Buzalaf MA. Insights into preventive measures for dental erosion. J Appl Oral Sci. 2009c;17(2):75-86.

Mahoney EK, Kilpatrick NM. Dental erosion: part 1. Aetiology and prevalence of dental erosion. N Z Dent J. 2003;99(2):33-41.

Mäkelä M, Salo T, Uitto VJ, Larjava H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. J Dent Res. 1994;73(8):1397-406.

Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR et al. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mater*. 2006;22(10):973-80.

Marais JT. Restoring palatal tooth loss with composite resin, aided by increased vertical height. *SADJ*. 1998;53(3):111-9.

Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol*. 2000;45(9):757-65.

Maseki T, Tanaka H. Symmetry of non-carious cervical lesions in canines and premolars. *Gerodontology*. 2006;23(3):183-6.

Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GA, Papa S, Mazzotti G et al. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res*. 2007;86(5):436-40.

Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials*. 2006;27(25):4470-6.

Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri A Jr et al. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis. *J Biomed Mater Res A*. 2009;88(3):697-703.

Meurman JH, Drysdale T, Frank RM. Experimental erosion of dentin. *Scand J Dent Res*. 1991;99(6):457-62.

Meurman JH, Frank RM. Progression and surface ultrastructure of in vitro caused erosive lesions in human and bovine enamel. *Caries Res*. 1991a;25(2):81-7.

Meurman JH, Frank RM. Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res*. 1991b;25(1):1-6.

Meurman JH, Ten Cate JM. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *Eur J Oral Sci*. 1996;104(2):199-206.

Meurman JH, Vesterinen M. Wine, alcohol, and oral health, with special emphasis on dental erosion. *Quintessence Int.* 2000;31(10):729-33.

Millward A, Shaw L, Smith A. Dental erosion in four-year-old children from differing socioeconomic backgrounds. *ASDC J Dent Child.* 1994;61(4):263-6.

Millward A, Shaw L, Smith AJ, Rippin JW, Harrington E. The distribution and severity of tooth wear and the relationship between erosion and dietary constituents in a group of children. *Int J Paediatr Dent.* 1994;4(3):151-7.

Misra DN. Interaction of chlorhexidine digluconate with and adsorption of chlorhexidine on hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res.* 1994;28(11):1375-81.

Moss SJ. Dental erosion. *Int Dent J.* 1998;48(6):529-39.

Nakajima M, Sano H, Burrow MF, Tagami J, Yoshiyama M, Ebisu S et al. Tensile bond strength and SEM evaluation of caries-affected dentin using dentin adhesives. *J Dent Res.* 1995;74(10):1679-88.

Nakajima M, Sano H, Urabe I, Tagami J, Pashley DH. Bond strengths of single-bottle dentin adhesives to caries-affected dentin. *Oper Dent.* 2000;25(1):2-10.

Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldini S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. *J Dent Res.* 2011;90(4):506-11.

Negoro T, Briggs J, Plesh O, Nielsen I, McNeill C, Miller AJ. Bruxing patterns in children compared to intercusp clenching and chewing as assessed with dental models, electromyography, and incisor jaw tracing: preliminary study. *ASDC J Dent Child.* 1998;65(6):449-548.

Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A et al. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(2):160-6.

Nixon PJ, Youngson CC, Beese A. Tooth surface loss: does recreational drug use contribute? *Clin Oral Investig.* 2002;6(2):128-30.

- Nunn J, Shaw L, Smith A. Tooth wear--dental erosion. *Br Dent J.* 1996;180(9):349-52.
- Nunn JH. Prevalence of dental erosion and the implications for oral health. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(2 (Pt 2)):156-61.
- Nuttall RK, Sampieri CL, Pennington CJ, Gill SE, Schultz GA, Edwards DR. Expression analysis of the entire MMP and TIMP gene families during mouse tissue development. *FEBS Lett.* 2004;563(1-3):129-34.
- Obermajer N, Jevnikar Z, Doljak B, Kos J. Role of cysteine cathepsins in matrix degradation and cell signalling. *Connect Tissue Res.* 2008;49(3):193-6.
- Oginni O, Olusile AO. The prevalence, aetiology and clinical appearance of tooth wear: the Nigerian experience. *Int Dent J.* 2002;52(4):268-72.
- Owens BM, Kitchens M. The erosive potential of soft drinks on enamel surface substrate: an in vitro scanning electron microscopy investigation. *J Contemp Dent Pract.* 2007;8(7):11-20.
- Packer CD. Cola-induced hypokalaemia: a super-sized problem. *Int J Clin Pract.* 2009;63(6):833-5.
- Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci.* 2003;111(2):117-27.
- Pashley DH, Carvalho RM, Sano H, Nakajima M, Yoshiyama M, Shono Y et al. The microtensile bond test: a review. *J Adhes Dent.* 1999;1(4):299-309.
- Pashley DH, Sano H, Ciucchi B, Yoshiyama M, Carvalho RM. Adhesion testing of dentin bonding agents: a review. *Dent Mater.* 1995;11(2):117-25.
- Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res.* 2004;83(3):216-221.

Pashley EL, Agee KA, Pashley DH, Tay FR. Effects of one versus two applications of an unfilled, all-in-one adhesive on dentine bonding. *J Dent*. 2002;30(2-3):83-90.

Pasquantonio G, Tay FR, Mazzoni A, Suppa P, Ruggeri A Jr, Falconi M et al. Electric device improves bonds of simplified etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*. 2007;23(4):513-8.

Peterson, G.; Bratthall, D. The caries decline: a review of reviews. *Eur J Oral Sci*. 1996;104(4):436-43.

Piangprach T, Hengtrakool C, Kukiattrakoon B, Kedjarune-Leggat U. The effect of salivary factors on dental erosion in various age groups and tooth surfaces. *J Am Dent Assoc*. 2009;140(9):1137-43.

Pilo R, Cardash HS, Oz-Ari B, Ben-Amar A. Effect of preliminary treatment of the dentin surface on the shear bond strength of resin composite to dentin. *Oper Dent*. 2001;26(6):569-75.

Piotrowski BT, Gillette WB, Hancock EB. Examining the prevalence and characteristics of abfractionlike cervical lesions in a population of U.S. veterans. *J Am Dent Assoc*. 2001;132(12):1694-701.

Poyser NJ, Briggs PF, Chana HS, Kelleher MG, Porter RW, Patel MM. The evaluation of direct composite restorations for the worn mandibular anterior dentition - clinical performance and patient satisfaction. *J Oral Rehabil*. 2007;34(5):361-76.

Rafeek RN, Marchan S, Eder A, Smith WA. Tooth surface loss in adult subjects attending a university dental clinic in Trinidad. *Int Dent J*. 2006;56(4):181-6.

Redman CD, Hemmings KW, Good JA. The survival and clinical performance of resin-based composite restorations used to treat localised anterior tooth wear. *Br Dent J*. 2003;194(10):566-72.

Rees JS, Jagger DC. Abfraction Lesions: Myth or Reality? *J Esthet Restor Dent*. 2003;15(5):263-71.

Rees JS. The biomechanics of abfraction. *Proc Inst Mech Eng [H]*. 2006;220(1):69-80.

- Reis A, Grandi V, Carlotto L, Bortoli G, Patzlaff R, Rodrigues Accorinte Mde L et al. Effect of smear layer thickness and acidity of self-etching solutions on early and long-term bond strength to dentin. *J Dent*. 2005;33(7):549-59.
- Reis A, Higashi C, Loguercio AD. Re-anatomization of anterior eroded teeth by stratification with direct composite resin. *J Esthet Restor Dent*. 2009;21(5):304-16.
- Ricci HA, Sanabe ME, de Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Chlorhexidine increases the longevity of in vivo resin-dentin bonds. *Eur J Oral Sci*. 2010;118(4):411-6.
- Rios D, Honório HM, Francisconi LF, Magalhães AC, de Andrade Moreira Machado MA, Buzalaf MA. In situ effect of an erosive challenge on different restorative materials and on enamel adjacent to these materials. *J Dent*. 2008;36(2):152-7.
- Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Buzalaf MA, Palma-Dibb RG, Machado MA et al. Influence of toothbrushing on enamel softening and abrasive wear of eroded bovine enamel: an in situ study. *Braz Oral Res*. 2006a;20(2):148-54.
- Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Delbem AC, Machado MA, Silva SM et al. Effect of salivary stimulation on erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: an in situ/ex vivo study. *Caries Res*. 2006b;40(3):218-23.
- Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Wiegand A, de Andrade Moreira Machado MA, Buzalaf MA. Light cola drink is less erosive than the regular one: an in situ/ex vivo study. *J Dent*. 2009;37(2):163-6.
- Rios D, Magalhães AC, Honório HM, Buzalaf MA, Lauris JR, Machado MA. The prevalence of deciduous tooth wear in six-year-old children and its relationship with potential explanatory factors. *Oral Health Prev Dent*. 2007;5(3):167-71.
- Rios D, Santos FC, Honório HM, Magalhães AC, Wang L, de Andrade Moreira Machado MA et al. An in situ/ex vivo comparison of the ability of regular and light colas to induce enamel wear when erosion is combined with abrasion. *Quintessence Int*. 2011;42(3):e44-50.
- Salonen L, Helldén L, Carlsson GE. Prevalence of signs and symptoms of dysfunction in the masticatory system: an epidemiologic study in an adult Swedish population. *J Craniomandib Disord*. 1990;4(4):241-50.

Sano H, Shono T, Sonoda H, Takatsu T, Ciucchi B, Carvalho R et al. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength--evaluation of a micro-tensile bond test. *Dent Mater.* 1994;10(4):236-40.

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

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

Sano H, Yoshiyama M, Ebisu S, Burrow MF, Takatsu T, Ciucchi B et al. Comparative SEM and TEM observations of nanoleakage within the hybrid layer. *Oper Dent.* 1995b;20(4):160-7.

Sartor L, Pezzato E, Dell'Aica I, Caniato R, Biggin S, Garbisa S. Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(2):229-37.

Say EC, Koray F, Tarim B, Soyman M, Gülmez T. In vitro effect of cavity disinfectants on the bond strength of dentin bonding systems. *Quintessence Int.* 2004;35(1):56-60.

Scaffa PM, Vidal CM, Barros N, Gesteira TF, Carmona AK, Breschi L et al. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. *J Dent Res.* 2012;91(4):420-5.

Scherrer SS, Cesar PF, Swain MV. Direct comparison of the bond strength results of the different test methods: a critical literature review. *Dent Mater.* 2010;26(2):e78-93.

Schlueter N, Ganss C, Hardt M, Schegietz D, Klimek J. Effect of pepsin on erosive tissue loss and the efficacy of fluoridation measures in dentine in vitro. *Acta Odontol Scand.* 2007;65(5):298-305.

Schlueter RJ, Veis A. The macromolecular organization of dentine matrix collagen. II. Periodate degradation and carbohydrate cross-linking. *Biochemistry.* 1964;3:1657-65.

Schmalz G, Garhammer P, Schweiki H. A commercially available cell culture device modified for dentin barrier tests. *J Endod.* 1996;22(5):249-52.

Serra MC, Messias DC, Turssi CP. Control of erosive tooth wear: possibilities and rationale. *Braz Oral Res.* 2009;23 Suppl 1:49-55.

Shellis RP, Ganss C, Ren Y, Zero DT, Lussi A. Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:69-77.

Smith BG, Knight JK. An index for measuring the wear of teeth. *Br Dent J.* 1984;156(12):435-8.

Smith BG. Toothwear: aetiology and diagnosis. *Dent Update.* 1989;16(5):204-12.

Smith BGN, Robb ND. The prevalence of tooth wear in 1007 dental patients. *J Oral Rehabil.* 1996;23(1):232-9.

Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis.* 2004;10(6):311-8.

Spranger H. Investigation into the genesis of angular lesions at the cervical margin of teeth. *Quintessence Int.* 1995; 26(2):149-54.

Spreafico RC. Composite resin rehabilitation of eroded dentition in a bulimic patient: a case report. *Eur J Esthet Dent.* 2010;5(1):28-48.

Stanislawczuk R, Amaral RC, Zander-Grande C, Gagler D, Reis A, Loguercio AD. Chlorhexidine-containing acid conditioner preserves the longevity of resin-dentin bonds. *Oper Dent.* 2009;34(4):481-90.

Stanley A, Wilson M, Newman HN. The in vitro effects of chlorhexidine on subgingival plaque bacteria. *J Clin Periodontol.* 1989;16(4):259-64.

Stegge P, Visco-Dangler L, Rye L. Anorexia nervosa: review including oral and dental manifestations. *J Am Dent Assoc.* 1982;104(5):648-52.

Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:463-516.

Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res.* 2002;81(9):603-7.

Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol.* 2007;52(2):121-7.

Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T et al. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *J Dent Res.* 2001;80(6):1545-9.

Sundaram G, Wilson R, Watson TF, Bartlett D. Clinical measurement of palatal tooth wear following coating by a resin sealing system. *Oper Dent.* 2007;32(6):539-43.

Tahmassebi JF, Duggal MS, Malik-Kotru G, Curzon ME. Soft drinks and dental health: a review of the current literature. *J Dent.* 2006;34(1):2-11.

Talic YF. Immediate and 24-hour bond strengths of two dental adhesive systems to three tooth substrates. *J Contemp Dent Pract.* 2003;4(4):28-39.

Tanaka M, Naito T, Yokota M, Kohno M. Finite element analysis of the possible mechanism of cervical lesion formation by occlusal force. *J Oral Rehabil.* 2003;30(1):60-67.

Tay FR, Hashimoto M, Pashley DH, Peters MC, Lai SC, Yiu CK et al. Aging affects two modes of nanoleakage expression in bonded dentin. *J Dent Res.* 2003;82(7):537-41.

Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Monticelli F, Osorio R. Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. *J Endod.* 2006;32(9):862-8.

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

Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Hiraishi N, Yiu CK. Water treeing in simplified dentin adhesives--déjà vu? *Oper Dent*. 2005;30(5):561-79.

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

Tay FR, Pashley DH. Dentin bonding--is there a future? *J Adhes Dent*. 2004a;6(4):263.

Tay FR, Pashley DH. Resin bonding to cervical sclerotic dentin: a review. *J Dent*. 2004b;32(3):173-96.

Telles D, Pegoraro LF, Pereira JC. Incidence of noncarious cervical lesions and their relation to the presence of wear facets. *J Esthet Restor Dent*. 2006;18(4):178-83.

Telles D, Pegoraro LF, Pereira JC. Prevalence of noncarious cervical lesions and their relation to occlusal aspects: a clinical study. *J Aesthet Dent*. 2000;12(1):10-5.

ten Cate JM, Imfeld T. Dental erosion, summary. *Eur J Oral Sci*. 1996;104(2 (Pt 2)):241-4.

Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res*. 1998;77(8):1622-9.

Tjäderhane L, Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Salo T. Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). *Adv Dent Res*. 2001;15:55-8.

Tonami K, Ericson D. Protein profile of pepsin-digested carious and sound human dentine. *Acta Odontol Scand*. 2005;63(1):17-20.

Turk B, Turk V, Turk D. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol Chem*. 1997;378(3-4):141-50.

Uitto VJ, Suomalainen K, Sorsa T. Salivary collagenase. Origin, characteristics and relationship to periodontal health. *J Periodontal Res*. 1990;25(3):135-42.

Uitto VJ, Turto H, Huttunen A, Lindy S, Uitto J. Activation of human leukocyte collagenase by compounds reacting with sulfhydryl groups. *Biochim Biophys Acta*. 1980;613(1):168-77.

Vaidyanathan TK, Vaidyanathan J. Recent advances in the theory and mechanism of adhesive resin bonding to dentin: a critical review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;88(2):558-78.

Van Landuyt KL, De Munck J, Snauwaert J, Coutinho E, Poitevin A, Yoshida Y et al. Monomer-solvent phase separation in one-step self-etch adhesives. *J Dent Res*. 2005;84(2):183-8.

Van Meerbeek B, Peumans M, Poitevin A, Mine A, Van Ende A, Neves A et al. Relationship between bond-strength tests and clinical outcomes. *Dent Mater*. 2010;26(2):e100-21.

van Strijp AJ, Jansen DC, DeGroot J, ten Cate JM, Everts V. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. *Caries Res*. 2003;37(1):58-65.

van Strijp AJ, van Steenberghe TJ, ten Cate JM. Bacterial colonization of mineralized and completely demineralized dentine in situ. *Caries Res*. 1997;31(5):349-55.

Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jul;87(14):5578-82.

Van't Spijker A, Rodriguez JM, Kreulen CM, Bronkhorst EM, Bartlett DW, Creugers NH. Prevalence of tooth wear in adults. *Int J Prosthodont*. 2009;22(1):35-42.

Vargas MA, Cobb DS, Denehy GE. Interfacial micromorphology and shear bond strength of single-bottle primer/adhesives. *Dent Mater*. 1997;13(5):316-24.

Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003;92(8):827-39.

von Fraunhofer JA, Rogers MM. Dissolution of dental enamel in soft drinks. *Gen Dent*. 2004;52(4):308-12.

Voronets J, Lussi A. Thickness of softened human enamel removed by toothbrush abrasion: an in vitro study. *Clin Oral Investig*. 2010 Jun;14(3):251-6.

Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev*. 2000;14(17):2123-33.

Wahlgren J, Salo T, Teronen O, Luoto H, Sorsa T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpal and periapical inflammation and periapical root-canal exudates. *Int Endod J*. 2002;35(11):897-904.

Wang X, Lussi A. Assessment and management of dental erosion. *Dent Clin North Am*. 2010;54(3):565-78.

Wang Y, Spencer P, Walker MP. Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res A*. 2007;81(2):279-86.

Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res*. 2003;82(2):141-5.

Watson TF. Applications of confocal scanning optical microscopy to dentistry. *Br Dent J*. 1991;171(9):287-91.

West NX, Davies M, Amaechi BT. In vitro and in situ erosion models for evaluating tooth substance loss. *Caries Res*. 2011;45 Suppl 1:43-52.

West NX, Hughes JA, Addy M. The effect of pH on the erosion of dentine and enamel by dietary acids in vitro. *J Oral Rehabil*. 2001;28(9):860-4.

Wetton S, Hughes J, West N, Addy M. Exposure time of enamel and dentine to saliva for protection against erosion: a study in vitro. *Caries Res*. 2006;40(3):213-7.

Wilder AD Jr, Swift EJ Jr, Heymann HO, Ritter AV, Sturdevant JR, Bayne SC. A 12-year clinical evaluation of a three-step dentin adhesive in noncarious cervical lesions. *J Am Dent Assoc.* 2009;140(5):526-35.

Wilder-Smith CH, Wilder-Smith P, Kawakami-Wong H, Voronets J, Osann K, Lussi A. Quantification of dental erosions in patients with GERD using optical coherence tomography before and after double-blind, randomized treatment with esomeprazole or placebo. *Am J Gastroenterol.* 2009;104(11):2788-95.

Wood I, Jawad Z, Paisley C, Brunton P. Non-carious cervical tooth surface loss: A literature review. *J Dent.* 2008;36(10):759-66.

Yip KHK, Smales RJ, Kaidonis JA. The diagnosis and control of extrinsic acid erosion of tooth substance. *Gen Dent.* 2003;51(4):350-3.

Yiu CK, Pashley EL, Hiraishi N, King NM, Goracci C, Ferrari M et al. Solvent and water retention in dental adhesive blends after evaporation. *Biomaterials.* 2005;26(34):6863-72.

Yoshiyama M, Carvalho R, Sano H, Horner J, Brewer PD, Pashley DH. Interfacial morphology and strength of bonds made to superficial versus deep dentin. *Am J Dent.* 1995;8(6):297-302.

Yoshiyama M, Sano H, Ebisu S, Tagami J, Ciucchi B, Carvalho RM et al. Regional strengths of bonding agents to cervical sclerotic root dentin. *J Dent Res.* 1996;75(6):1404-13.

Yoshiyama M, Tay FR, Doi J, Nishitani Y, Yamada T, Itou K et al. Bonding of self-etch and total-etch adhesives to carious dentin. *J Dent Res.* 2002;81(8):556-60.

Yoshiyama M, Tay FR, Torii Y, Nishitani Y, Doi J, Itou K et al. Resin adhesion to carious dentin. *Am J Dent.* 2003;16(1):47-52.

Zero DT, Lussi A. Erosion--chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. *Int Dent J.* 2005;55(4 Suppl 1):285-90.

Zero DT. Etiology of dental erosion--extrinsic factors. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(2(Pt2)):162-77.

Zimmerli B, De Munck J, Lussi A, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Long-term bonding to eroded dentin requires superficial bur preparation. Clin Oral Investig. In press 2012.

Apêndices

APÊNDICE A - Declaração de doação de dentes por pacientes do Centro de Urgência e das clínicas de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

DECLARAÇÃO DE DOAÇÃO DE DENTES

Senhor(a) doador(a) ou seu representante legal,

A Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, desenvolve pesquisas que requerem a utilização de dentes humanos extraídos. Desta forma, quando ocorrer, após análise clínica e realização do seu plano de tratamento, a necessidade de extrair (arrancar) um ou mais dentes, solicitamos que o(a) senhor(a) faça a doação do(s) seu(s) dente(s) ou dos dentes do paciente de quem é representante legal. Esta doação não é obrigatória. É assegurado ao doador(a) que seu nome não será divulgado. Caso não queira fazer a doação não será excluído (retirado) do tratamento para o qual foi triado anteriormente. Também, a doação não dará ao doador(a) qualquer prioridade em tratamentos futuros, na Faculdade de Odontologia de Bauru (USP).

Declaro, portanto, ter sido esclarecido sobre quais os motivos que levaram a necessidade de remoção do(s) dente(s) _____ (código) e concordo que os mesmos sejam utilizados na pesquisa de título **“Avaliação *in vitro* de diferentes concentrações de clorexidina na resistência de união à dentina normal e erodida”**, que objetiva *avaliar o efeito de um produto para limpeza dentária (clorexidina), em diferentes concentrações (2% e 0,004%), na união, ao longo do tempo, de um material restaurador a dentes saudáveis ou alterados por bebida ácida (Coca-Cola)*. Fui, ainda, esclarecido pelo pesquisador que minha identidade não será divulgada por qualquer meio e que o material recolhido será utilizado unicamente para a presente pesquisa.

Identificação do doador:

Nome (legível): _____
Data de nascimento: ____/____/____ Local de nascimento: _____ UF: _____
RG nº: _____ CPF nº: _____
Endereço (Rua ou Avenida, nº, Bairro e Complemento): _____
Cidade: _____ UF: _____ CEP: _____
Telefones para contato: (____) _____; (____) _____; (____) _____
e-mail: _____

Bauru, ____ de _____ de ____.

_____
Assinatura

APÊNDICE B - Termo de doação de dentes humanos por cirurgiões-dentistas que atendem em consultórios particulares.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES HUMANOS POR CIRURGIÕES-DENTISTAS

Eu, _____, Cirurgião(ã)-
dentista, inscrito no CRO sob o número _____, com consultório situado à
_____, no bairro _____,
na cidade de _____, UF _____, CEP _____, telefone
_____, doo _____ dentes para a Faculdade de Odontologia de Bauru, da
Universidade de São Paulo, a fim de contribuir para a realização da pesquisa intitulada
**“Avaliação *in vitro* de diferentes concentrações de clorexidina na resistência de união à
dentina normal e erodida”**, de autoria de LUCIANA FÁVARO FRANCISCONI,
ANGÉLICA REIS HANNAS, MELISSA THIEMI KATO, MARÍLIA AFONSO RABELO
BUZALAF, JOSÉ CARLOS PEREIRA e LINDA WANG. Declaro que estes dentes foram
extraídos por indicação terapêutica, cujos históricos fazem parte dos prontuários dos
pacientes de quem se originam, arquivados sob minha responsabilidade. Estou ciente de que
o material recolhido será utilizado pelos pesquisadores desta Faculdade unicamente para a
realização da presente pesquisa.

_____, _____ de _____ de _____.

_____
Cirurgião(ã) - Dentista

APÊNDICE C - Carta de encaminhamento do relatório enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP para obtenção de parecer final.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Senhor Coordenador,

Encaminhamos ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP relatório final (resumo estruturado, material e métodos, resultados) referente ao trabalho, **"Avaliação *in vitro* de diferentes concentrações de clorexidina na resistência de união à dentina normal e erodida"** de autoria de *Luciana Fávaro Francisconi (responsável)*, Angélica Reis Hannas, Melissa Thiemi Kato, Marília Afonso Rabelo Buzalaf e José Carlos Pereira, sob a orientação da *Profª. Drª. Linda Wang*.

Informamos que o respectivo projeto de pesquisa foi **aprovado** na reunião de **26 de agosto de 2009**, sob processo nº **110/2009**, e que não existiam infrações éticas pendentes.

Ressaltamos que, originalmente, conforme descrito na sessão materiais e métodos do projeto de pesquisa, um terço dos palitos obtidos para cada grupo experimental seriam testados imediatamente (I), e os demais (dois terços) seriam armazenados em saliva artificial, a 37°C, por 6 meses (6m), para só então serem testados. Optou-se por, dos dois terços dos espécimes a serem armazenados por 6 meses, testar apenas um terço nesse momento e manter o outro terço armazenado até 1 ano, para, só então, testá-los. Tal estratégia nos permitiu multiplicar os resultados do trabalho e as possibilidades de publicação, sem comprometer nenhum dos aspectos éticos considerados por este comitê, já que o número de dentes humanos coletados para o estudo não sofreu alteração.

Assim, de posse dos dados obtidos testando-se os palitos após 1 ano de armazenagem, solicitamos a aprovação do respectivo Comitê para redigir, além do original, um outro trabalho, sob o título **"Resistência de união de uma resina composta à dentina normal e erodida: o papel da aplicação de soluções de clorexidina em diferentes concentrações após 6 meses e um ano de envelhecimento"** (Orientador: Prof. Dr. José Carlos Pereira; Coorientadora: Profª. Drª. Linda Wang).

Lembramos que os títulos dos trabalhos a serem redigidos a partir do desenvolvimento do projeto de pesquisa aprovado sob processo nº **110/2009** podem ser, ainda, traduzidos ou modificados, para se enquadrar nas normas de revistas especializadas, visando-se a publicação dos mesmos.

Seguem, também, em anexo, os Termos de Doação de Dentes assinados pelos respectivos doadores, segundo a resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Ministério da Saúde, DF).

Atenciosamente,

Profª. Drª. Linda Wang
Orientadora

Luciana Fávaro Francisconi
Responsável

Prof. Dr. FLÁVIO AUGUSTO CARDOSO DE FARIA
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa-FOB-USP

APÊNDICE D - Aplicação dos testes de Kolmogorov-Smirnov (normalidade da distribuição amostral) de Análise de Variância a três critérios (substrato dentinário; tratamento após condicionamento ácido; tempo de envelhecimento) e de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0.05$; SigmaPlot for Windows Version 12.0®; Systat Software Inc., Chigaco/IL - EUA).

Dados [CHX] em N x E 1 ano.xlsx

Three Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook2

General Linear Model

Dependent Variable: RU

Normality Test (Kolmogorov-Smirnov) Failed ($P < 0,050$)

Equal Variance Test: Passed ($P = 0,357$)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Substrato	1	5196,324	5196,324	86,125	<0,001
Tratamento	2	847,467	423,734	7,023	0,001
Tempo	2	7916,429	3958,215	65,604	<0,001
Substrato x Tratamento	2	183,908	91,954	1,524	0,223
Substrato x Tempo	2	722,234	361,117	5,985	0,003
Tratamento x Tempo	4	1212,428	303,107	5,024	<0,001
Substrato x Trat x Tempo	4	301,649	75,412	1,250	0,295
Residual	105	6335,135	60,335		
Total	122	22837,026	187,189		

The main effects for Substrato cannot be properly interpreted since the size of the factor's effect depends upon the level of another factor.

The main effects for Tratamento cannot be properly interpreted since the size of the factor's effect depends upon the level of another factor.

The main effects for Tempo cannot be properly interpreted since the size of the factor's effect depends upon the level of another factor.

The effect of different levels of Substrato does not depend on what level of Tratamento is present. There is not a statistically significant interaction between Substrato and Tratamento. ($P = 0,223$)

The effect of different levels of Substrato depends on what level of Tempo is present. There is a statistically significant interaction between Substrato and Tempo. ($P = 0,003$)

The effect of different levels of Tratamento depends on what level of Tempo is present. There is a statistically significant interaction between Tratamento and Tempo. ($P = <0,001$)

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **Substrato**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
N vs. E	13,044	2	13,124	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **Tratamento**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
2% vs. C	5,897	3	4,887	0,002	Yes
2% vs. 0,004%	5,090	3	4,178	0,011	Yes
0,004% vs. C	0,807	3	0,658	0,888	No

Comparisons for factor: **Tempo**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
I vs. 1a	19,868	3	16,199	<0,001	Yes
I vs. 6m	9,601	3	8,011	<0,001	Yes
6m vs. 1a	10,267	3	8,371	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **Tempo within E**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
I vs. 1a	14,071	3	8,038	<0,001	Yes
I vs. 6m	8,154	3	4,810	0,003	Yes
6m vs. 1a	5,917	3	3,380	0,049	Yes

Comparisons for factor: **Tempo within N**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
I vs. 1a	25,666	3	14,936	<0,001	Yes
I vs. 6m	11,048	3	6,518	<0,001	Yes
6m vs. 1a	14,618	3	8,507	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **Substrato within I**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
N vs. E	17,875	2	10,545	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **Substrato within 6m**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
N vs. E	14,980	2	8,838	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **Substrato within 1a**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
N vs. E	6,279	2	3,541	0,014	Yes

Comparisons for factor: **Tempo within 2%**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
I vs. 1a	19,263	3	9,279	<0,001	Yes
I vs. 6m	0,160	3	0,0768	0,998	No
6m vs. 1a	19,104	3	9,202	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **Tempo within 0,004%**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
I vs. 1a	19,010	3	8,731	<0,001	Yes
I vs. 6m	15,122	3	7,284	<0,001	Yes
6m vs. 1a	3,888	3	1,785	0,420	No

Comparisons for factor: **Tempo within C**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
I vs. 1a	21,333	3	10,068	<0,001	Yes
I vs. 6m	13,522	3	6,513	<0,001	Yes
6m vs. 1a	7,811	3	3,687	0,028	Yes

Comparisons for factor: **Tratamento within I**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
2% vs. C	0,754	3	0,363	0,964	No
2% vs. 0,004%	0,187	3	0,0902	0,998	Do Not Test
0,004% vs. C	0,566	3	0,273	0,980	Do Not Test

Comparisons for factor: **Tratamento within 6m**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
2% vs. 0,004%	15,150	3	7,298	<0,001	Yes
2% vs. C	14,116	3	6,800	<0,001	Yes
C vs. 0,004%	1,034	3	0,498	0,934	No

Comparisons for factor: **Tratamento within 1a**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
0,004% vs. C	2,889	3	1,303	0,628	No
0,004% vs. 2%	0,0661	3	0,0304	1,000	Do Not Test
2% vs. C	2,823	3	1,332	0,615	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

Power of performed test with $\alpha = 0,0500$: for Substrato : 1,000

Power of performed test with $\alpha = 0,0500$: for Tratamento : 0,887

Power of performed test with $\alpha = 0,0500$: for Tempo : 1,000

Power of performed test with $\alpha = 0,0500$: for Substrato x Tratamento: 0,129

Power of performed test with $\alpha = 0,0500$: for Substrato x Tempo : 0,811

Power of performed test with $\alpha = 0,0500$: for Tratamento x Tempo : 0,908

Least square means for Substrato:

Group	Mean	SEM
E	11,935	1,000
N	24,979	0,988

Least square means for Tratamento:

Group	Mean	SEM
2%	22,120	1,199
0,004%	17,029	1,238
C	16,222	1,215

Least square means for Tempo:

Group	Mean	SEM
I	28,280	1,199
6m	18,679	1,199
1a	8,412	1,254

Least square means for Substrato x Tratamento:

Group	Mean	SEM
E x 2%	14,536	1,695
E x 0,004%	9,856	1,804
E x C	11,413	1,695
N x 2%	29,703	1,695
N x 0,004%	24,203	1,695
N x C	21,032	1,741

Least square means for Substrato x Tempo:

Group	Mean	SEM
E x I	19,343	1,695
E x 6m	11,189	1,695
E x 1a	5,272	1,804
N x I	37,218	1,695
N x 6m	26,169	1,695
N x 1a	11,551	1,741

Least square means for Tratamento x Tempo:

Group	Mean	SEM
2% x I	28,594	2,076
2% x 6m	28,434	2,076
2% x 1a	9,331	2,076
0,004% x I	28,407	2,076
0,004% x 6m	13,284	2,076
0,004% x 1a	9,397	2,274
C x I	27,840	2,076
C x 6m	14,319	2,076
C x 1a	6,508	2,161

Least square means for Substrato x Tratamento x Tempo :

Group	Mean	sd	SEM
E x 2% x I	15,971	5,17	2,936
E x 2% x 6m	22,226	9,12	2,936
E x 2% x 1a	5,412	5,47	2,936
E x 0,004% x I	21,121	7,44	2,936
E x 0,004% x 6m	3,473	6,25	2,936
E x 0,004% x 1a	4,973	3,11	3,474
E x C x I	20,937	5,37	2,936
E x C x 6m	7,869	8,81	2,936
E x C x 1a	5,432	4,99	2,936
N x 2% x I	41,217	5,38	2,936
N x 2% x 6m	34,643	6,62	2,936
N x 2% x 1a	13,250	4,83	2,936
N x 0,004% x I	35,692	9,85	2,936
N x 0,004% x 6m	23,096	8,13	2,936
N x 0,004% x 1a	13,821	10,12	2,936
N x C x I	34,744	9,79	2,936
N x C x 6m	20,768	14,35	2,936
N x C x 1a	7,583	4,94	3,171

APÊNDICE E - Aplicação dos testes de Kruskal-Wallis e de Tukey ($p < 0,05$; SigmaPlot for Windows Version 12.0®; Systat Software Inc., Chigaco/IL - EUA) para avaliação da variável padrão de fratura.

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Failed ($P < 0,050$)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Data 1 in Notebook1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
A	18	0	64,5	54,5	67,25
M	18	0	35,5	27,75	43,25
CD	18	0	0	0	2
CR	18	0	0	0	0

$H = 63,126$ with 3 degrees of freedom. ($P = < 0,001$)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = < 0,001$)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Ranks	q	$P < 0,05$
A vs CR	824	9,28	Yes
A vs CD	767	8,638	Yes
A vs M	295	3,322	No
M vs CR	529	5,958	Yes
M vs CD	472	5,316	Yes
CD vs CR	57	0,642	No

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

Anexos

ANEXO A - Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, sob processo nº 110/2009.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – Brasil – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
e-mail: mferrati@fob.usp.br

Processo 110/2009

Bauru, 27 de agosto de 2009.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado **Avaliação in vitro de diferentes concentrações de clorexidina na resistência de união à dentina normal e erodida**, de autoria de Luciana Favaro Francisconi, Angélica Reis Hannas, Melissa Thiemi Kato, Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf e Prof. Dr. José Carlos Pereira, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 26 de agosto de 2009, o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes.

Informamos que qualquer alteração efetuada no trabalho de pesquisa, o pesquisador/orientador deverá comunicar ao CEP-FOB/USP, bem como ao final do trabalho enviar um Relatório para novo parecer, o qual será utilizado para publicação científica.

Atenciosamente,

Profª Drª Maria Teresa Atta

Coordenadora

Profª Drª Linda Wang

Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários

ANEXO B - Aprovação final do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, sob processo nº 110/2009, a ser utilizado para publicação científica.

	Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru Comitê de Ética em Pesquisa	

Proc. CEP nº 110/2009

Bauru, 4 de junho de 2012.

Senhora Professora,

Informamos Vossa Senhoria que após análise por um Relator deste Comitê de Ética em Pesquisa, o **Relatório Final** do trabalho de pesquisa Avaliação in vitro de diferentes concentrações de clorexidina na resistência de união à dentina normal e erodida, de autoria de Luciana Fávoro Francisconi, Angélica Reis Hannas, Melissa Thiemí Kato, Profª Drª Marília Afonso rabelo Buzalaf e Prof. Dr. José Carlos Pereira, sob sua orientação, foi **APROVADO** em reunião deste Comitê, realizada no dia **30 de maio de 2012**.

Informamos também a autorização deste Colegiado para a publicação do trabalho intitulado **Resistência de união de uma resina composta à dentina normal e erodida: o papel da aplicação de soluções de clorexidina em diferentes concentrações após 6 meses e um ano de envelhecimento**, cujos dados foram obtidos a partir da presente pesquisa.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria Filho
Coordenador

Profª Drª Linda Wang
Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos

---

Al: Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P.: 73
e-mail: cep@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
<http://www.fob.usp.br>

"A persistência é o caminho do êxito."

Charles Chaplin