UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

ANA BEATRIZ SILVA SOUSA

**EFEITO DO USO DE PRIMERS BIOATIVOS NA INTERFACE DENTINA-
ADESIVO**

Ribeirão Preto

- 2015 -

ANA BEATRIZ SILVA SOUSA

EFEITO DO USO DE PRIMERS BIOATIVOS NA INTERFACE DENTINA-ADESIVO

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor no Programa de Reabilitação Oral.

Área de concentração: Reabilitação Oral

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda de Carvalho Panzeri
Pires-de-Souza

VERSÃO CORRIGIDA

Ribeirão Preto

- 2015 -

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO DO TEOR TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto

Sousa, Ana Beatriz Silva Sousa

Efeito do uso de primers bioativos na interface dentina-adesivo. Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2015.

132p. : il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Reabilitação Oral. "Versão corrigida da Dissertação/Tese. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa".

Orientadora: Pires-de-Souza, Fernanda de Carvalho Panzeri

1. Adesão. 2. Clorexidina. 3. Extrato de semente de uva. 4. Doxíciclina. 5. Metaloproteinases da Matriz.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANA BEATRIZ SILVA SOUSA

Efeito do uso de primers bioativos na interface dentina-adesivo

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

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

Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros.

A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes.”

Cora Coralina

Dedico este trabalho,

À **Deus**, por guiar meus passos e me proporcionar sabedoria, saúde e proteção necessários para minha caminhada.

Aos meus pais, **Luis** e **Edna**, por todo amor e carinho, por serem sempre o meu porto seguro, me apoiando nos momentos difíceis e dividindo comigo as alegrias e conquistas. Agradeço por terem me *“criado para o mundo”* permitindo que eu vivesse outras experiências. Saibam que este trabalho também é resultado do esforço de vocês. Muito obrigada por tudo que vocês fizeram e fazem por mim. Amo muito vocês!

À toda minha família, por serem pacientes com minha ausência em alguns momentos e por me apoiarem à seguir meus sonhos. Em especial aos meus avós **José Geraldo** e **Diva** por todo carinho e atenção destinados à *“caçulinha”*.

Agradecimientos

Agradecimentos Especiais

À minha orientadora, **Profa. Dra. Fernanda de Carvalho Panzeri Pires-de-Souza**, por toda orientação, confiança, carinho e amizade que sempre dedicou à mim. Agradeço muito pelos nossos caminhos terem se cruzado 8 anos atrás e pelos constantes ensinamentos transmitidos desde então. Obrigada por ser um exemplo de dedicação à docência e à pesquisa. Meu crescimento tanto profissional quanto pessoal foi baseado nas oportunidades que tive durante todos esses anos, e em muitas delas você foi a grande responsável. A considero como alguém da família e saiba que nossa relação não termina por aqui. Sinta-se muito querida!

À **Profa. Dra. Ana Karina Bedran-Russo**, orientadora durante o estágio junto ao *College of Dentistry of the University of Illinois at Chicago (UIC)*. Agradeço pela confiança e pela oportunidade que me permitiu grande aprendizado me estimulando a crescer como pesquisadora. Obrigada também pelo ótimo convívio com o grupo de pesquisa e pela experiência única e inesquecível de morar em outro país. Considero você como um exemplo de profissional e de pessoa. Sinto sempre saudades!

À vocês meu muito obrigada!

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP)** pelas oportunidades oferecidas e por se tornar minha segunda casa, na pessoa do atual diretor **Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros**.

Ao curso de pós-graduação em Reabilitação Oral, fundado pelo **Prof. Dr. Heitor Panzeri** e atualmente tendo como coordenadora a **Profa. Dra. Rossana Pereira de Almeida**.

Aos professores do curso de pós-graduação em Reabilitação Oral da FORP-USP, por seus ensinamentos e exemplos de dedicação: **Profa. Dra. Alma Blásida Concepción Elizaur Benitez Catirse**, **Profa. Dra. Andréa Cândido dos Reis**, **Profa. Dra. Camila Tirapelli**, **Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva**, **Profa. Dra. Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza**, **Profa. Dra. Helena de Freitas Oliveira Paranhos**, **Profa. Dra. Iara Augusta Orsi**, **Profa. Dra. Maria da Gloria Chiarello de Mattos**, **Profa. Dra. Maria de Fátima Jurca da Motta**, **Prof. Dr. Osvaldo Luiz Bezzon**, **Prof. Dr. Osvaldo Zaniquelli**, **Prof. Dr. Raphael Freitas de Souza**, **Profa. Dra. Regina Maura Fernandes**, **Profa. Dra. Renata Cristina Silveira Rodrigues Ferracioli**, **Prof. Dr. Ricardo Faria Ribeiro**, **Profa. Dra. Rossana Pereira de Almeida Antunes**, **Profa. Dra. Takami Hirono Hotta**, **Prof. Dr. Valdir Antonio Muglia**, e **Profa. Dra. Valéria Oliveira Pagnano de Souza**.

Às **Profas. Dras. Camila Tirapelli e Maria de Fátima Jurca da Motta**, pelos ensinamentos clínicos, conhecimento e conversas compartilhadas.

Aos técnicos do Laboratório do Departamento de Materiais Dentários e Prótese: **José de Godoi Filho**, **Lício Firmino Júnior**, **Marcelo Aparecido Vieira**, **Odair Rosa Silva**, **Paulo César Teodoro**, **Paulo Sérgio Ferreira**, **Júlio da Mata**, **Fernando Schivetto** e **Eduardo Destinto**.

Às Secretarias do Departamento de Materiais Dentários e Prótese: **Regiane de C. Tirado Damasceno**, **Ana Paula Xavier** e **Fernanda Thalita de Freitas**, pela colaboração em todo processo do curso do doutorado em Reabilitação Oral.

Às secretarias da Pós-Graduação **Regiane Cristina Moi Sacilotto e Isabel Cristina Galino Sola**, pela paciência e pela pronta disponibilidade em colaborar com o processo burocrático da pós-graduação.

Aos meus colegas de pós-graduação, **Francisca Daniele Jardimino Silame, Marcela Moreira Salles, Gustavo da Col dos Santos Pinto, Lourenço de Moraes Rego Roselino, Tatiana Ramirez Cunha, Maria Paula Della Vecchia, Karina Leoncine Nadotti, Rafael Cândido Pedroso e Silva, Juliana Barchelli e Renata Moraes.**

À equipe do LaAbio, **Lourenço de Moraes Rego Roselino, Carla Cecilia Alandia Román, Francisca Daniele Jardimino Silame, Brahim Drubi Filho, Michelle Chinelatti, Sergio Augusto de Freitas Vicente, Roberto Cesar Biancalana e Marta Maria Martins Giamatei Contente.** Em especial à Carlita e Dani por serem além de parceiras de laboratório amigas com quem posso contar sempre.

Aos amigos do *Laboratory of Applied Dental Biomaterials and Interfaces (UIC)*, **Cristina de Mattos Pimenta Vidal, Ariene Arcas Topal Paes Leme, Ana Paula Farina, Doglas Cecchin, Paulo Vinícius Soares, Camila Andrade Zamperini Navarro e Thaiane Rodrigues Aguiar.** Além de todos os ensinamentos agradeço pela convivência, por toda amizade e por terem feito parte de um ano inesquecível. Mesmo sendo mais jovem e estando em outro momento da carreira, sempre me senti muito acolhida por vocês e isso fez total diferença no meu estágio. Obrigada à Cris e Arie pela ajuda fundamental no desenvolvimento deste estudo. Saudades sempre!

Às amigas **Isabella Vieira Marques e Sofia Alves**, por terem sido minha família em Chicago. Agradeço muito por ter encontrado vocês, por todos os momentos compartilhados, viagens, risadas. Nosso último ano foi muito intenso e as minhas experiências não seriam as mesmas sem vocês. A falta que sinto do nosso “trio” é diária mas as levo sempre no coração. Obrigada pela amizade nessa caminhada!

À amigas **Graziela Bianchi Leoni e Laís Araújo** presentes em todas as horas, obrigada pelo apoio e pelos conselhos.

Às amigas **Ana Flávia Maída, Andrea Sayuri Terada, Nathalia Giusti de Campos, Mariana Dassiê Crivelenti, Paula Ferreira, Mariana Silva e Souza, Priscilla Romualdo, Larissa Nogueira e Larissa Ramos** que desde a graduação fazem parte da minha vida.

À técnica **Rafaella Tonani** do Laboratório de Materiais Dentários Prof. Dr. Heitor Panzeri, por toda a ajuda, disposição, amizade e pelo desempenho impecável de sua função.

Aos funcionários do LIPEM (Laboratório Integrado de Pesquisa de Biocompatibilidade - FORP -USP) **Edson Volta e Ricardo de Souza Antunes**, pela ajuda no desenvolvimento de estudos durante o doutorado.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio financeiro recebido até o momento de mudança para o doutorado direto (processo número 2011/15610-3). Agradeço também à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de estudo de doutorado e pelo apoio financeiro durante o doutorado sanduíche através do Ciência sem Fronteiras (processo número 99999.012329/2013-04).

Resumo

SOUSA, A.B.S. **Efeito do uso de primers bioativos na interface dentina-adesivo.** Ribeirão Preto, 2015. 132p. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A longevidade das restaurações com compósitos está diretamente relacionada ao sucesso do tratamento estético. A vida útil das restaurações pode ser influenciada por vários fatores como o material empregado, tempo de uso clínico e a degradação da matriz dentinária por metaloproteinases da matriz (MMPs), que podem afetar a integridade da interface adesiva, fazendo com que a união dentina-adesivo seja comprometida. Assim, buscando melhores resultados na durabilidade das restaurações adesivas, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de substâncias inibidoras de MMPs (soluções de clorexidina – CHX a 0,2%, extrato de semente de uva - *grape seed extract* - GSE a 15% e doxiciclina a 3%) na Resistência de União (RU) de restaurações de resina composta submetidas à ciclagem mecânica. Cavidades de Classe I foram preparadas na área central da superfície exposta de 48 molares humanos hígidos, posteriormente separados em 4 grupos (n=12) de acordo com o tratamento de superfície recebido após o condicionamento de ácido: Grupo I - Controle (Sistema Adesivo - Adper Single Bond Plus - 3M ESPE); Grupo II - CHX 0,2% + Sistema Adesivo; Grupo III - GSE 15% + Sistema Adesivo e Grupo IV - Doxiciclina 3% + Sistema Adesivo. Após os procedimentos restauradores (Filtek Supreme Ultra - 3M ESPE), as amostras foram armazenadas em água destilada durante 24 horas a 37°C e subdivididas em dois subgrupos: A - Controle (armazenado em saliva artificial) e B - Submetido à ciclagem mecânica (Coil – Cycler, Proto-tech, força de 50 N, frequência de 1,5 Hz em 1×10^6 ciclos de aplicação). Após ciclagem mecânica, os corpos de prova foram cortados em palitos (0,8 x 0,8 mm; n = 5 por dente) e submetidos ao teste de microtração (Bisco) à velocidade de 1 mm/min. A atividade colagenolítica da MMP-2 sob a ação dos primers bioativos foi analisada utilizando o kit EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay (D-12054, Molecular Probes). A atividade gelatinolítica das MMPs-2 e -9 após incubação com os primers bioativos foi avaliada através de zimografia convencional. Os resultados obtidos das duas análises foram apresentados na forma de porcentagem de inibição. Zimografia *in situ* foi realizada utilizando gelatina de fluorescência conjugada (Kit EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay) como substrato de MMPs e avaliada com aumento de 40x através de microscopia de fluorescência. Posteriormente, os fótons fluorescentes foram analisados em software (ImageJ). Obtidos os resultados, os dados foram submetidos à análise estatística (2-way ANOVA, Tukey, $p > 0,05$) e demonstraram que os primers bioativos não exerceram influência significativa sobre a RU dentina-adesivo, independente da ação da ciclagem mecânica. A atividade colagenolítica, segundo zimografia convencional, demonstrou que os primers bioativos foram capazes de inibir as MMPs, sendo a CHX menos eficiente. Na análise de zimografia *in situ*, os primers bioativos diminuíram a atividade das MMPs localizadas na interface adesiva, com aumento da atividade gelatinolítica do grupo Controle sendo maior quando submetidos à ciclagem mecânica, efeito não encontrados no grupos tratados com primers bioativos. Concluiu-se que, apesar de não apresentarem efeitos sobre a RU da interface adesiva, os primers bioativos apresentam ação sobre a degradação da camada híbrida.

Palavras chaves: Adesão, clorexidina, extrato de semente de uva, doxiciclina, metaloproteinases da matriz.

Abstract

SOUSA, A.B.S. **Effect of bioactive primers on dentin-adhesive interface**. Ribeirão Preto, 2015. 132p. Thesis (PhD in Oral Rehabilitation). School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

The durability of composite resin restorations is one of the main points related to the success in aesthetic treatments. The longevity of adhesive restorations can be affected by various factors such as the materials, the clinical time of use and the dentin matrix degradation mediated by matrix metalloproteinases (MMPs). MMPs can affect the adhesive interface, compromising the bonding between dentin and adhesive. Thus, searching for better results on the longevity of adhesive restorations, the aim of this study was to evaluate the effect of MMPs inhibitors (chlorhexidine - CHX 0.2%, grape seed extract - GSE 15% and doxycycline 3%) on resin composite microtensile bond strength (μ TBS) of restorations submitted to load cycling. Class I cavities were performed in the central area of the exposed surface of 48 sound human molars. Then, the teeth were separated into 4 groups according to the surface treatment received after the acid etching: Group I - Control (Adhesive System - Adper Single Bond Plus - 3M ESPE); Group II - CHX 0.2% + Adhesive System; Group III - GSE 15% + Adhesive System and Group IV - Doxycycline 3% + Adhesive System. After restorative procedures (Filtek Supreme Ultra - 3M ESPE), the samples were stored in distilled water for 24 hours at 37°C and then subdivided into two subgroups (n=6): A - Control (stored in artificial saliva) and B - Submitted to load cycling (Coil – Cycler, Proto-tech, 50 N, 1.5 Hz, 1 x 10⁶ cycles). After load cycling, the specimens were cut into sticks (0.8 x 0.8 mm; n = 5 per teeth) and submitted to the microtensile test (Bisco) at 1 mm/min. The collagenolytic activity of MMP-2 under the action of bioactive primers was analyzed using EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay Kit (D-12054, Molecular Probes). The gelatinolytic activity of MMPs-2 and -9 after incubation with the bioactive primers was evaluated by gelatin zymography. The results of these two analyzes were presented by the percentage of inhibition. *In situ* zymography was performed using fluorescence conjugated gelatin (EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay Kit) as MMPs substrate and evaluated using 40x magnification under fluorescence microscopy. Then the fluorescent photons were analyzed with an appropriate software (ImageJ). The results were subjected to statistical analysis (2-way ANOVA, Tukey, p<0.05) and the bioactive primers showed no significant influence on the dentin-adhesive μ TBS, regardless the load cycling action. According to gelatin zymography, the collagenolytic activity demonstrated that the bioactive primers were able to inhibit MMPs activity and CHX was less efficient. *In situ* zymography analysis showed that the bioactive primers decreased the activity of MMPs located in the adhesive interface. The data also demonstrated increased gelatinolytic activity on Control group, being higher when submitted to load cycling, and which effect was not found in the groups treated with bioactive primers. It could be concluded that although the bioactive primers did not influence the BS of the adhesive interface, they demonstrated positive results on hybrid layer degradation.

Keywords: Adhesion, chlorhexidine, grape seed extract, doxycycline, matrix metalloproteinase.

Lista de Figuras

Fig. 1 -	Grupos e estruturas das MMPs	44
Fig. 2 -	Passo a passo do protocolo restaurador	67
Fig. 3 -	Equipamento Coil – Cyclor	69
Fig. 4 -	Corpo-de-prova acoplado ao equipamento.....	69
Fig. 5 -	Corte do corpo-de-prova em formato de palito	70
Fig. 6 -	Máquina de teste de microtração	70
Fig. 7 -	Leitor de placas utilizado	71
Fig. 8 -	Cuba de eletroforese montada para ensaio	75
Fig. 9 -	Microscópio de fluorescência utilizado	77
Fig. 10 -	Imagens das interfaces adesivas	78
Fig. 11 -	Imagem do gel de Zimografia	84
Fig. 12 -	Imagem do gel de zimografia incubado com fenantrolina	84
Fig. 13 -	Imagens feitas da análise de Zimografia <i>in situ</i>	87

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	 Materiais utilizados no estudo	 63
Tabela 2 -	 Grupos e protocolo de aplicação dos primers bioativos	 66
Tabela 3 -	 Grupos e número de amostras	 68
Tabela 4 -	 Grupos e quantidade de cada componente empregado	 72
Tabela 5 -	 Composição dos géis de separação, de largada e seus volumes	 73
Tabela 6 -	 Esquema de inserção das amostras nos poços do gel de zimografia	 75
Tabela 7 -	 Média e desvio padrão da resistência de união	 83
Tabela 8 -	 Primers bioativos e porcentagem de inibição	 83
Tabela 9 -	 Porcentagem de inibição através de densitometria óptica	 85
Tabela 10 -	 Quantificação da fluorescência	 86

Lista de Abreviaturas e Siglas

APMA	Acetato de 4-aminofenilmercúrio
APS	Persulfato de amônio
Bis - EMA	Bisfenol A-glicidil dimetacrilato etoxilado
Bis - GMA	Bisfenol A-glicidil metacrilato
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CHX	Clorexidina
DOXI	Doxiciclina
Fig	Figura
GSE	<i>Grape seed extract</i>
H₂O	Água
HEMA	Hidroxietil metacrilato
HEPES	Ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1
Hz	Hertz
kDA	QuiloDalton
kgf	Quilograma-força
kV	Quilovolt
M	Molar
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MDPF	2-metoxi-2,4-difenil-3(2H) furanona
mg	Miligrama
min	Minuto
ml	Mililitro

mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMP	Metalo proteinase da matriz
MMP-2	Metalo proteinase da matriz 2
MMP-9	Metalo proteinase da matriz 9
MPa	Megapascal
mW	Miliwatt
N	Newton
NaN₃	Azida sódica
nm	Nanometro
PAC	Proantocianidina
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
RU	Resistência de união
RNA	Ácido ribonucléico
s	Segundo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TC	Tetraciclina
TEGMA	Trietilenoglicol dimetacrilato
TEMED	Tetrametilenodiamino
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UDMA	Uretano dimetacrilato
V	Volt
ZnCl₂	Cloreto de zinco

Sumário

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de figuras

Lista de tabelas

Listas de abreviaturas e siglas

1. INTRODUÇÃO	41
2. PROPOSIÇÃO	59
2.1. Objetivo Geral	59
2.2. Objetivos específicos	59
3. MATERIAL E MÉTODOS	63
3.1. Material	63
3.2. Métodos	63
3.2.1. Preparo dos primers bioativos	64
3.2.2. Aplicação dos primers	65
3.2.3. Protocolo restaurador	66
3.2.4. Ciclagem Mecânica	66
3.2.5. Teste de microtração	69
3.2.6. Ensaio de inibidores de colagenase/gelatinase	71
3.2.7. Avaliação da atividade gelatinolítica por Zimografia convencional	73
3.2.7.a) Preparo do gel de Zimografia	73
3.2.7.b) Preparo das amostras	74

3.2.7.c) Inserção das amostras	74
3.2.7.d) Eletroforese e incubação do gel.....	75
3.2.8. Zimografia <i>in situ</i>	76
4. RESULTADOS	83
4.1. Teste de microtração	83
4.2. Ensaio de inibidores de collagenase/gelatinase	83
4.3. Zimografia convencional	84
4.4. Zimografia <i>in situ</i>	86
5. DISCUSSÃO	91
6. CONCLUSÃO	111
7. REFERÊNCIAS	115
8. ANEXO	131

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a longevidade de restaurações com compósito é uma questão de grande importância em odontologia adesiva (BRESCHI *et al.*, 2010; CHANG, SHIN, 2010). Ao longo das duas últimas décadas, avanços químicos e técnicos dos materiais restauradores contribuíram para o aumento da resistência de união (RU) do compósito à dentina. No entanto, a diminuição prematura na RU ainda é um dos problemas que afeta as restaurações adesivas reduzindo acentuadamente a sua durabilidade (MJÖR, MOORHEAD, DAHL, 2000; CARRILHO *et al.*, 2005; TJÄDERHANE *et al.*, 2013; TJÄDERHANE, 2015).

É conhecido que a união dentina-compósito resinoso obtida através dos sistemas adesivos contemporâneos pode se deteriorar ao longo do tempo (PASHLEY *et al.*, 2004), e a sua vida útil pode ser inferior àquela estimada anteriormente (HEBLING *et al.*, 2005; DE MUNCK *et al.*, 2005). Este fato é baseado em estudos *in vivo* e *in vitro*, onde a degradação da interface adesiva foi associada à suscetibilidade dos adesivos dentinários atuais à sorção dos fluidos orais, dilatação polimérica, e consequente lixiviação resinosa (DE MUNCK *et al.*, 2003; HASHIMOTO *et al.*, 2003).

A principal estrutura responsável pela retenção micromecânica dos materiais adesivos à estrutura dentária é conhecida como camada híbrida (NAKABAYASHI, KOJIMA, MASUHARA, 1982). Composta de fibrilas colágenas incorporadas ao metacrilato resinoso do agente adesivo, empregado na formação de uma camada híbrida satisfatória, é essencial na adesão bem sucedida de um compósito resinoso à dentina humana (BRESCHI *et al.*, 2010). Tal camada criada por sistemas adesivos que contém altas porcentagens de monômeros hidrofílicos (HEMA), resultando na formação de poros na interface de união (WANG, SPENCER, 2003), comportando-se como uma membrana permeável (TAY *et al.*, 2002),

permitindo a eluição de monômeros não reagidos, sorção de água, expansão polimérica e hidrólise do compósito (HASHIMOTO *et al.*, 2003; MALACARNE *et al.*, 2006). Assim, o colapso da interface adesiva está diretamente relacionado à diminuição da estabilidade hidrofílica dos componentes resinosos que formam a camada híbrida (TAY *et al.*, 2002; DE MUNCK *et al.*, 2005; BRESCHI *et al.*, 2008).

Adicionalmente, o declínio da RU entre a dentina e o compósito também pode ser associado ao tempo de uso clínico da restauração (DE MUNCK *et al.*, 2003; DONMEZ *et al.*, 2005; HASHIMOTO *et al.*, 2000; KOSHIRO *et al.*, 2004). Enquanto estudos relacionam essa queda aos efeitos de plastificação dos monômeros resinosos (YIU *et al.*, 2004; CARRILHO *et al.*, 2005; ITO *et al.*, 2005; MALACARNE *et al.*, 2006) Carrilho *et al.* (2007) consideram a degradação da matriz dentinária o principal fator nessa diminuição.

A integridade da matriz dentinária tem sido cada vez mais demonstrada como sendo um fator fundamental na longevidade da interface adesiva (TAY *et al.*, 2002; WANG, SPENCER *et al.*, 2003; HASHIMOTO *et al.*, 2003, FANG *et al.*, 2012). A matriz dentinária é uma rede complexa de fibrilas e estruturas globulares que constitui a parte orgânica da dentina (MARSHALL *et al.*, 1997). Embora seja formada principalmente por colágeno tipo I (aproximadamente 90%), proteínas da matriz dentinária também são encontradas nesse tecido e desempenham um papel fundamental como mediadoras de interações celulares, na maturação e mineralização da dentina (BOSKEY, 1991). Estas proteínas pertencem à família das metaloproteinases da matriz (MMPs) e estão envolvidas no turn-over do tecido conjuntivo (VISSE, NAGASE, 2003; SORSA, TJÄDERHANE, SALO, 2004).

As MMPs representam um grupo de proteases zinco/cálcio dependentes que são capazes de degradar os componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno na sua

forma natural (CARRILHO *et al.*, 2009) ou desnaturada (BIRKEDAL-HANSEN, 1995). São enzimas que podem ser secretadas pelos odontoblastos e outras células pulpares durante a síntese da matriz extracelular, e a sua expressão pode ser regulada por fatores de crescimento. Esse controle é essencial na formação da matriz dentinária e na remodelação durante processos fisiológicos e patológicos (STERNLICHT, WERB, 2001).

Essas proteases foram classificadas de acordo com as suas especificidades em relação ao seu potencial substrato presente na matriz extracelular. Dessa forma, inicialmente foram agrupadas como collagenases, gelatinases, estromelisinases e matrilisinases. Atualmente, as MMPs são definidas em grupos, segundo suas estruturas (Fig. 1), dos quais cinco classes são secretadas para a matriz extracelular (Fig. 1, 1-5) e três são do tipo membrana (Fig. 1, 6-8) (EGEBLAD, WERB, 2002).

Basicamente, a estrutura das MMPs é formada por um pró-peptídeo, um domínio catalítico (contendo um sítio de ligação ao zinco), uma região denominada *hinge* (região de união) e um domínio hemopexina (media a interação entre enzimas e inibidores teciduais de metaloproteinases e a associação aos receptores celulares). No domínio catalítico são identificadas repetições contendo cisteína, as quais estão relacionadas à atividade dessas proteases. As gelatinases apresentam o domínio da fibronectina, que é requerido para a ligação e quebra do colágeno (HANNAS *et al.*, 2007; VISSE, NAGASE, 2003).

Figura 1 – Grupos e estruturas das MMPs. Fonte: Egeblad, Werb, 2002.

Por terem propriedades potencialmente destrutivas, as MMPs são sintetizadas como pró-formas, enzimaticamente inativas e denominada de zimogênios (MALACARNE *et al.*, 2006). Assim, a ativação enzimática requer a remoção do domínio pro-peptídeo por meio da degradação deste por outras proteases, tais como plasmina e MMPs do tipo transmembrana, além de ocorrer quimicamente pela ação do APMA (acetato de aminofenilmercúrio) (MAZZONI *et al.*, 2007; VISSE, NAGASE, 2003).

A atividade das MMPs é inibida por inibidores endógenos ou pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (NAGASE, WOESSNER, 1999; VISSE, NAGASE, 2003). Assim, o equilíbrio entre MMPs e TIMPs é crítico para eventual remodelação da matriz extracelular no tecido. A degradação da matriz extracelular é uma característica importante para desenvolvimento, reparação tecidual, e remodelação. A causa de muitas doenças, tais como a nefrite, doenças cardíacas, cancro, úlceras, artrite, e fibrose, podem ser decorrentes das atividades desreguladas das MMPs (VISSE, NAGASE, 2003; NAGASE, VISSE, MURPHY, 2006).

Odontoblastos são responsáveis pela síntese das MMPs, que participam no desenvolvimento dentário (TJÄRDERHANE *et al.*, 1998), no processo de cárie (CHAUSSAIN-MILLER *et al.*, 2006; TJÄRDERHANE *et al.*, 1998) e na degradação da camada híbrida em interfaces adesivas (Mazzoni *et al.*, 2006; PASHLEY *et al.*, 2004). Além disso, as MMPs também contribuem para organização e mineralização da matriz dentinária (CHAUSSAIN-MILLER *et al.*, 2006). Várias MMPs são identificadas na dentina mineralizada humana, dentre elas: MMP-8 collagenase, (SULKALA *et al.*, 2007) MMP-2 e MMP-9 gelatinases, (MAZZONI *et al.*, 2007, MAZZONI *et al.*, 2009) e MMP-20, que degrada o esmalte (SULKALA *et al.*, 2002). Embora MMP-2 e MMP-9 sejam consideradas como gelatinases, outros estudos associam atividade collagenolítica a essas duas MMPs (AIMES, QUIGLEY, 1995; GARNERO 2003).

As MMPs permanecem retidas na dentina após a finalização do processo de mineralização e como são secretadas na sua forma latente, podem ser ativadas quando a matriz dentinária é solubilizada por cáries (TJÄRDERHANE *et al.*, 1998) ou por outros processos que envolvam a remoção do conteúdo inorgânico deste substrato, como condicionamento ácido (RICCI *et al.*, 2010). Apesar do mecanismo exato da ativação ácida

das MMPs ainda não ser claro (TJÄRDERHANE *et al.*, 1998), sugere-se que, provavelmente, ocorra através da quebra da ligação entre cisteína e zinco (PERDIGÃO, REIS, LOGUERCIO, 2013). Por outro lado, segundo PASHLEY *et al.* (2014), o ácido fosfórico usado na técnica de condicionamento dentinário, necessária para a desmineralização superficial da dentina (NAKABAYASHI, KOJIMA, MASUHARA, 1982), é altamente ácido (pH 0,7 a -1) e seria capaz de desnaturar as MMPs devido à sua baixa acidez.

Para a formação da camada híbrida, é necessária a desmineralização superficial da dentina (Nakabayashi, Kojima, Masuhara, 1982). Quando a profundidade desta desmineralização excede a capacidade de infiltração dos monômeros resinosos, é formada uma zona de dentina desmineralizada sem cobertura resinosa na base da camada híbrida (HASHIMOTO *et al.*, 2010; NAKABAYASHI, WATANABE, ARAO 1998; SPENCER, WANG, 2002; WANG, SPENCER, 2003), fato que ocorre tanto no sistema convencional (NAKABAYASHI, WATANABE, ARAO, 1998; SPENCER, WANG, 2002; WANG, SPENCER, 2003) quanto nos sistemas adesivos autocondicionantes (CARVALHO *et al.*, 2005; SANO *et al.*, 1995). As fibrilas de colágeno expostas sem proteção tornam-se suscetíveis à degradação hidrolítica e enzimática (MAZZONI *et al.*, 2006; PASHLEY *et al.*, 2004) podendo ser mediada pelas MMPs dentinárias (PASHLEY *et al.*, 2004). Em adição, fibras de colágeno também podem permanecer expostas na interface adesiva, como resultado da eluição de polímeros hidroliticamente instáveis, durante o uso das restaurações, contribuindo para o aumento da formação de porosidades na camada híbrida e a ocorrência de microinfiltração (DE MUNK *et al.*, 2003; FERRARI, TAY, 2003; PASHLEY *et al.*, 2004; WANG, SPENCER, 2003). Este fenômeno permite o continuo ingresso de fluidos, metabólitos bacterianos, MMPs vindas da saliva, e o

sinergismo desses produtos resulta na degradação das fibras de colágeno desnudas presentes na parte inferior da camada híbrida (PASHLEY *et al.*, 2004).

O uso de substâncias sintéticas que imitam a ação dos TIPMs e a inativação dessas enzimas por um “primer terapêutico” poderia aumentar a estabilidade funcional da união adesivo-dentina (RICCI *et al.*, 2010). Nestas condições, a aplicação de inibidores de MMPs na dentina desmineralizada, antes da aplicação do sistema adesivo, parece ser uma abordagem racional para estender a longevidade da união dentina-compósito resinoso (PASHLEY *et al.*, 2004).

Vários autores tem demonstrado a eficácia da incorporação da clorexidina (CHX) nos protocolos adesivos buscando a prevenção da degradação na camada híbrida (BRESCHI *et al.*, 2009; CARRILHO *et al.*, 2007b; HEBLING *et al.*, 2005; LOGUERCIO *et al.*, 2009, TJÄDERHANE *et al.*, 2013), isto porque, a atividade colagenolítica/ gelatinolítica da matriz dentinária humana (PASHLEY *et al.*, 2004) mostrou ser reprimida pelo o digluconato de CHX, um inibidor de protease não específico (GENDRON *et al.*, 1999).

Assim como o EDTA (FRANÇOIS *et al.*, 1977) e a Tetraciclina (GOLUB *et al.*, 1983), a CHX é um inibidor de gelatinase/colagenase que age pela quelação não específica de cátions como Zn^{2+} e Ca^{2+} que são necessários para manter as funções enzimáticas das MMPs e pode, segundo alguns autores (GENDRON *et al.*, 1999), inativar as MMP-2, -8 e -9. Além disso, a sua utilização pode melhorar o comportamento da interface adesiva não apenas por controlar a atividade das MMPs, mas também pela inibição de outras enzimas da matriz dentinária, ou mesmo por um efeito de detergente que aumenta a impregnação dos monômeros resinosos na dentina desmineralizada (BRESCHI *et al.*, 2010). Além disso, Gendron *et al.* (1999), especulam que a matriz desmineralizada saturada por CHX torna-se

isolada de fluidos por tags resinosos que ocluem os túbulos dentinários, produzindo sua retenção prolongada. No mais, os processos inflamatórios podem ser a origem das MMPs e a CHX poderia agir equilibrando esse ambiente inflamatório ácido, causando, consequentemente, uma diminuição nas atividades das MMPs (GENDRON *et al.*, 1999).

Mesmo antes da CHX ser testada como potencial inibidor de proteases, as soluções à base de digluconato de CHX já eram reconhecidas como os desinfetantes químicos cavitários mais populares usados em procedimentos odontológicos comuns (PERDIGÃO, REIS, LOGUERCIO, 2013), por possuir amplo espectro contra atividade de bactérias orais (STANLEY, WILSON, NEWMAN, 1989). Clinicamente, a retenção de CHX à matriz dentinária pode ser melhorada através da sua aplicação sem enxágue em dentina condicionada e, em seguida, cobrindo-a com material adesivo (CARRILHO *et al.*, 2010).

Ademais, a sua utilização como um “primer antiproteolítico” para preservação da matriz dentinária mostra-se extremamente conveniente devido sua disponibilidade comercial em diferentes concentrações: como agente enxaguatório bucal (a 0,12-0,2%) e desinfetante (2%) (BRESCHI *et al.*, 2010); e pelo seu sucesso em conjunto com adesivos convencionais já ter sido relatado anteriormente (CARRILHO *et al.*, 2007; HEBLING *et al.*, 2005). Além disso, um estudo *in vitro* confirmou a função protetora da CHX a 0,2% na união adesiva após um ano de armazenamento dos espécimes em saliva artificial, o que sugere que, mesmo concentrações mais baixas de CHX, podem ser igualmente eficazes em comparação com concentrações de 2% (BRESCHI *et al.*, 2009).

É conhecido que o uso de primers aquosos contendo CHX resulta na preservação da resistência de união dentinária e na integridade da camada híbrida ao longo do tempo (CARRILHO *et al.*, 2007a; RICCI *et al.*, 2010; SCAFFA *et al.*, 2012), de modo semelhante a

quando CHX está incluída na composição do ácido fosfórico comercial (STANISLAWCZUK *et al.*, 2009; STANISLAWCZUK, REIS, LOGUERCIO, 2011) ou incorporada na composição de alguns adesivos (ZHOU *et al.*, 2011), sendo que, um dos benefícios de se utilizar CHX como um agente antimicrobiano é que ele possui substantividade (MOHAMMADI, ABBOTT, 2009). Entretanto, apesar da CHX ser capaz de se ligar mais facilmente na dentina desmineralizada do que na mineralizada (KIM *et al.*, 2010b), a lavagem com água pode removê-la facilmente dessa estrutura (PERDIGÃO, REIS, LOGUERCIO, 2013) porque a ligação da CHX na dentina é de origem eletroestática e reversível. Porém, a CHX não é desvinculada pelo HEMA e pode permanecer unida à dentina desmineralizada depois da adesão (KIM *et al.*, 2010b). Esta pode ser a razão para a eficácia a longo prazo da CHX como inibidor de MMP em interfaces adesivas. Quantidades relativamente grandes de CHX permanecem ligadas à dentina parcialmente e completamente desmineralizada durante pelo menos 8 semanas (CARRILHO *et al.*, 2010).

Contudo, embora numerosos benefícios *in vitro* e *in vivo* dos efeitos da CHX tenham sido encontrados, o mecanismo de ação desse composto ainda continua sendo objeto de investigações (BRESCHI *et al.*, 2010; DE MUNCK *et al.*, 2009; GENDRON *et al.*, 1999; ZHENG *et al.*, 2015).

As ligações cruzadas intermoleculares e interfibrilares é a base para estabilidade, resistência e viscoelasticidade da matriz dentinária. A quantidade e o tipo de ligações cruzadas também determina estabilidade do colágeno e sua capacidade de resistir a biodegradação. O aumento das ligações cruzadas do colágeno da dentina exposta tem como objetivo melhorar a estabilidade da base da camada híbrida (BEDRAN-RUSSO *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2011), e também podem permitir o aumento do uso de adesivos mais

hidrofóbicos, sem risco de colapso da matriz de colágeno durante a aplicação do adesivo (TJÄRDERHANE, 2015).

Ao longo dos últimos anos, houve um crescente interesse sobre os agentes de ligação cruzada com objetivo de aumentar a longevidade da RU dentina- compósito resinoso. Vários estudos foram realizados utilizando agentes de ligação como o glutaraldeído, *genipin*, proantocianidina, carbodiimida; para introduzir ligações cruzadas adicionais ao colágeno da dentina desmineralizada (AL-AMMAR *et al.*, 2009; BEDRAN-RUSSO *et al.*, 2009, 2010; CASTELLAN *et al.*, 2010). Estes estudos *in vitro* demonstraram que o uso de agentes de ligações cruzadas melhorou as propriedades mecânicas do colágeno dentinário a curto prazo, reduzindo sua susceptibilidade à degradação enzimática através da ação de collagenases, e dessa forma, aumentando a estabilidade da interface adesiva (LIU *et al.*, 2011).

As proantocianidinas (PACs), também conhecidas como taninos condensados, são um exemplo de agente de ligação ou agente *cross-linking* natural, que pode ser extraído de várias frutas, vegetais, castanhas, sementes, flores e cascas (FANG *et al.*, 2012). No campo da pesquisa, tem havido um crescente interesse em extratos de sementes de uva devido sua disponibilidade como suplementos dietéticos e seu potencial uso em vários campos da medicina. O extrato de semente de uva, GSE (do inglês *grape seed extract*), é uma das principais fontes de PACs (JOSHI, KUSZYNSKI, BAGCHI, 2001), capaz de melhorar as propriedades mecânicas da dentina através da indução de ligações cruzadas nas fibras colágenas (AGUIAR *et al.*, 2014; BEDRAN-RUSSO *et al.*, 2008). Sugere-se que os mecanismos de ligações cruzadas entre as PACs e o colágeno possam ocorrer através de ligações covalentes e de pontes de hidrogênio. Onde a molécula de colágeno exibe dois

sítios de ligação terminais um amina e outro carboxila e as PACs apresentam capacidade de se ligar nessas regiões através do seu grupo hidroxila. Estes sítios adicionais de ligações disponíveis, juntamente com a estrutura do colágeno, podem permitir a ligação proantocianidina-colágeno ou colágeno-colágeno, podendo gerar ligações intermoleculares e interfibrilares (HAGERMAN, KLUCHER, 1986; BEDRAN-RUSSO *et al.*, 2014).

Recentemente, a introdução da utilização de extratos de PACs no procedimento restaurador com o objetivo de aumentar a estabilidade da camada híbrida vem sendo reportado na literatura (AL-AMMAR *et al.*, 2009; CASTELLAN *et al.*, 2013; FANG *et al.*, 2012). Porém, o efeito das PACs na adesão dentinária ainda não é completamente elucidado. Embora a incorporação de PACs 2% em adesivos dentários experimentais não tenha tido nenhum efeito adverso sobre a RU à dentina (EPASINGHE *et al.*, 2012), uma concentração de 3% de PACs foi capaz de diminuir significativamente a RU (EPASINGHE *et al.*, 2012).

Além de aumentar a resistência do colágeno à degradação por proteases, alguns agentes de ligação cruzada mostraram ter propriedades anti-MMPs (KOSTORYZ *et al.*, 2009; TEZVERGIL-MUTLUAY *et al.*, 2012). Os efeitos inibitórios das PACs sobre as proteases tem sido descritos como não-específicos, fazendo com que sua determinação seja um desafio para os pesquisadores, pois os potentes efeitos inibidores das PACs decorreria de vários mecanismos, como a regulação da expressão das proteases endógenas, a inativação/silenciamento das proteases e a proteção dos sítios de clivagem dentro de colágeno (BEDRAN-RUSSO *et al.*, 2014).

Dessa forma, sendo o GSE um agente de ligação cruzada com habilidade única de biomodificar a matriz dentinária (CASTELLAN *et al.*, 2013) e também com possível ação inibitória contra proteases, torna-se importante testá-lo como um método para melhorar a

estabilidade e resistência à degradação do colágeno da matriz dentinária a fim de expandir o conhecimento sobre o assunto e potencializar sua aplicabilidade clínica (BEDRAN-RUSSO *et al.*, 2008; TEZVERGIL-MUTLUAY *et al.*, 2012).

Atualmente, dentre os inibidores sintéticos de MMPs disponíveis, alguns autores tem sugerido o tratamento da superfície dentinária com tetraciclinas (TCs) (PERDIGÃO, REIS, LOGUERCIO, 2013; TJÄDERHANE *et al.*, 2013). Embora as TCs sejam comumente conhecidas como antibióticos de largo espectro que atuam ao nível dos ribossomos onde interferem com a síntese de proteínas, elas também exercem outras ações biológicas, tais como a inflamação, a imunomodulação, a proliferação celular, e angiogênese (GOLUB *et al.*, 1998). Três grupos de TCs estão disponíveis atualmente: produtos naturais, quimicamente modificados e compostos semissintéticos (SAPADIN, FLEISCHMAJER, 2006). Este último grupo, apresenta potencial terapêutico, mas não parece induzir efeitos secundários antibióticos, (GOLUB *et al.*, 1998) tais como perturbações gastrointestinais. A doxiciclina é um tipo de TC semissintética que apresenta vasta e difundida aplicação médica e odontológica. É considerada segura e uma das TCs mais estudada no tratamento do câncer (FIFE *et al.*, 1997; GILBERTSON-BEADLING *et al.*, 1995) e de periodontites crônicas (CATON, RYAN, 2011; GOLUB *et al.*, 1990) sendo também considerada o inibidor mais potente e não seletivo de MMPs (GOLUB *et al.*, 1991, 1998).

Embora as TCs sejam quelantes de Zn^{2+} (PETERSON, 2004), o mecanismo primário de inibição das MMPs pela doxiciclina ainda não está totalmente elucidado. Entretanto, foi proposto que a doxiciclina possa se ligar próximo ao Zn^{2+} no sítio catalítico e romper a ligação entre esse íon e o cálcio, bloqueando, assim, o sítio ativo e inibindo a atividade das

MMPs (GARCIA *et al.*, 2005). Outrossim, acredita-se que tal TC também possa regular negativamente a transcrição do RNA das MMPs (CASTRO, TANUS-SANTOS, GERLACH, 2011).

Neste contexto, a doxiciclina é considerada potente inibidor de MMP, que tem se mostrado eficaz na inibição das suas atividades em concentrações plasmáticas significativamente inferiores às necessárias para produzir efeitos antimicrobianos (CHOW, CENA, SCHULZ, 2007; RIZZI *et al.*, 2010) tanto em estudos clínicos e em condições *in vitro* (CASTRO, TANUS-SANTOS, GERLACH, 2011). Segundo, Guimarães *et al.* (2010) 30 mg/ml é uma dose efetiva na diminuição das atividades das MMPs. Já sua ação contra microorganismos se associa a inibição de ribossomos procarióticos, afetando assim, somente os microorganismos e sendo segura para as células humanas (CHOPRA, ROBERTS, 2001). Dessa maneira, estudos demonstram segurança na sua utilização local (STECHMILLER, COWAN, SCHULTZ, 2010; CASTILHO *et al.*, 2011).

Apesar da aplicação de soluções aquosas de doxiciclina, como um passo preliminar após condicionamento ácido sobre o desempenho adesivo imediato, ter sido investigado recentemente (STANISLAWCZUK *et al.*, 2011), o uso de TCs e seus análogos na dentina como uma forma de prolongar RU dentinária ainda é escasso na literatura e deve ser o foco de investigações mais aprofundadas, devido ao potencial papel das TCs na inibição das MMPs (PERDIGÃO, REIS, LOGUERCIO, 2013).

Uma análise clássica para avaliação mecânica da qualidade da interface adesiva é o teste de microtração (ARMSTRONG *et al.*, 2010). Sano *et al.* (1994), introduziram este ensaio na pesquisa odontológica com o objetivo de mensurar a resistência à tração e módulo de elasticidade da dentina mineralizada e desmineralizada. O teste de microtração proporciona algumas vantagens sobre os outros testes que aferem a RU, dentre elas: exibição de maior

número de falhas adesivas e menos falhas coesivas; medição das maiores forças de RU médias e suas variações, que podem ser calculadas para dentes individuais; permite executar testes em superfícies irregulares; permite o teste de áreas muito pequenas (aproximadamente 1 mm²) e facilita análise em SEM/MET (ARMSTRONG *et al.*, 2010).

O estudo das enzimas presentes na dentina é geralmente feito por métodos bioquímicos ou por técnicas de microscopia associadas ou não aos métodos imuno-histoquímicos, que permitem avaliar a presença e localização das enzimas no complexo dentinopulpar, assim como avaliar a atividade das enzimas e a degradação da matriz orgânica dentinária (SHIMADA *et al.*, 2009; TEZVERGIL-MUTLUAY *et al.*, 2010; MAZZONI *et al.*, 2011). Em vista disso, o ensaio de inibidores da atividade colagenolítica fornece rapidez, alta sensibilidade e conveniência requeridas para quantificação da atividade de colagenases/gelatinases ou para o rastreio de inibidores em potencial (EnzChek® Gelatinase/Collagenase Assay Kit, Product information). O kit de ensaio EnzChek®, utilizado em algumas investigações (MAZZONI *et al.*, 2006; TAY *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2011), contém gelatina conjugada com fluoresceína (Gelatina DQ) fornecida na sua forma inativa. Quando tal substrato é digerido por alguma colagenase/gelatinase, ele dá origem a peptídeos de baixo peso molecular com capacidade de emitir alta fluorescência. Esse aumento na fluorescência é proporcional à atividade proteolítica e pode ser monitorada através da utilização de um leitor de microplacas de fluorescência (EnzChek® Gelatinase/Collagenase Assay Kit, Product information-2001).

A zimografia convencional é uma técnica que permite visualizar diferentes isoformas de uma enzima ou das formas pró-enzima e enzima ativa, as quais são muito frequentes em enzimas proteolíticas extracelulares, como as MMPs. A zimografia é uma

técnica simples, sensível e quantificável que identifica MMPs por meio da degradação do seu substrato preferencial e de seus pesos moleculares (SNOEK-VAN BEURDEN, VON DEN HOFF, 2005). Nesta técnica as proteínas são separadas por electroforese sob ação de um agente desnaturante (dodecil sulfato de sódio - SDS), em condições não redutoras. Sendo que, zimografia em gelatina (convencional) é utilizada, principalmente, para a detecção das gelatinases, MMP-2 e MMP-9, respectivamente (SNOEK-VAN BEURDEN, VON DEN HOFF, 2005).

Vários estudos tem demonstrado presença e atividade de enzimas proteolíticas endógenas na dentina humana, mas poucos avaliam a atividade proteolítica *in situ* na interface adesiva (ALMAHDY *et al.*, 2015; MAZZONI *et al.*, 2012; MAZZONI *et al.*, 2014). O principal obstáculo para essa análise baseia-se nos métodos disponíveis para detecção, localização precisa e medição da atividade das enzimas no tecido como um todo, porque a maioria das metodologias requer que as enzimas proteolíticas sejam extraídas a partir dos tecidos antes da análise (MAZZONI *et al.*, 2012). A imuno-histoquímica é rotineiramente utilizada para localizar proteínas em tecidos (FREDERIKS, MOOK, 2004), e embora permita a localização específica das MMPs, não fornece informações sobre a atividade enzimática. Além disso, a maioria das enzimas são sintetizadas inativas ou em forma de proenzima (também chamado zimogênio), que normalmente não podem ser diferenciadas das proteases ativas através da utilização de imunohistoquímica (FREDERIKS, MOOK, 2004). Dessa forma, a metodologia da zimografia *in situ* é uma boa opção para superar essas limitações, visto que tem por objetivo avaliar a atividade proteolítica na camada híbrida diretamente no local de ocorrência, sem a necessidade de desmineralização da estrutura dentária ou extração proteica (MAZZONI *et al.*, 2012; MAZZONI *et al.*, 2014).

Resumidamente, zimografia *in situ* utiliza um substrato que é depositado sobre ou sob uma fatia de uma amostra não fixada (YAN, BLOMME, 2003). Durante o período de incubação, o substrato é digerido pelas MMPs ativadas (YAN, BLOMME, 2003) e a degradação do substrato é detectada por microscopia de luz ou microscopia de fluorescência, dependendo do tipo de substrato (SNOEK-VAN BEURDEN, VON DEN HOFF, 2005). Uma modificação mais sensível deste método utiliza um substrato conjugado com fluoróforo (OH *et al.*, 1999). Então, quando o substrato é clivado, as MMPs são detectadas como fortes manchas fluorescentes contra um fundo preto (SNOEK-VAN BEURDEN, VON DEN HOFF, 2005).

De maneira geral, dado que existem diferenças quantitativas e qualitativas no colágeno exposto na camada híbrida (Breschi *et al.*, 2004), a zimografia *in situ* combinada com os ensaios de atividade proteolítica seriam ótimas ferramentas para examinar as diferenças na ativação e atividades enzimáticas na interface adesiva (MAZZONI *et al.*, 2012).

Por fim, a presença das MMPs na matriz dentinária não se limita apenas ao interesse acadêmico. Profissionais da odontologia precisam entender a bioquímica destas enzimas e como elas podem responder aos procedimentos realizados e produtos utilizados na odontologia adesiva (CARRILHO *et al.*, 2007). Com base em investigações indicando que as MMPs-2, 3, 8, 9 e 20 estão presentes na matriz dentinária humana (TJÄDERHANE *et al.*, 1998; SULKALA *et al.*, 2002, 2007; MAZZONI *et al.*, 2007;) e que o uso da CHX já demonstrou aumentar a longevidade da camada híbrida (BRESCHI *et al.*, 2010) seria interessante avaliar o efeito do uso de outros inibidores de MMPs em restaurações adesivas submetidas a condições de envelhecimento.

Proposição

2. PROPOSIÇÃO

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivos geral avaliar o efeito do uso dos primers bioativos na interface adesiva dentina-adesivo.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este estudo teve como objetivos específicos:

- Avaliar o efeito do uso dos primers bioativos na resistência de união à dentina de restaurações em compósitos submetidas à ciclagem mecânica.
- Quantificar a inibição da atividade proteolítica da MMP-2 e MMP-9 pelos primers bioativos através de ensaios de inibidores de collagenase/gelatinase e zimografia convencional e in situ.

2.3. HIPÓTESE NULA

Este estudo partiu da Hipótese Nula de que não haveria diferença na resistência de união adesivo-dentina, independente da utilização de primers bioativos e da ciclagem mecânica; e que não haveria diferença entre a ação proteolítica destes primers sobre as MMPs estudadas.

Material e

Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Os materiais utilizados neste estudo estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Materiais utilizados no presente estudo.

Categoria	Nome Comercial	Fabricante	Composição	Lote
Compósito resinoso	Filtek Supreme Ultra	3M ESPE, St. Paul, MN, USA	Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, resinas de bis-EMA, partículas de sílica (20 nm), partículas de zircônia (4 a 11 nm) e agregados de partículas de zircônia/ sílica.	N566267
Sistema adesivo	Adper Single Bond Plus	3M ESPE, St. Paul, MN, USA	Bis-GMA, HEMA, dimetacrilatos, etanol, água, fotoiniciadores, copolímero acrílico funcional metacrilato de poliacrílico, ácidos poliilacônicos e partículas de sílica coloidal.	N561025

*Bis-GMA, bisfenol A-glicidil metacrilato; Bis-EMA, bisfenol A-glicidil dimetacrilato etoxilado; HEMA, hidroxietil metacrilato; TEGMA, trietilenoglicol dimetacrilato; UDMA, uretano dimetacrilato.

3.2. MÉTODOS

Após aprovação do protocolo da pesquisa pelo Comitê de Ética (CAAE 41786715.5.0000.5419), quarenta e oito molares humanos hígidos recém-extraídos foram coletados junto ao Banco de dentes da unidade FORP - USP, limpos e armazenados à temperatura de -2º C até o uso. As raízes dos dentes foram embebidas em resina acrílica e a superfície oclusal foi aplainada com lixas abrasivas de granulação 600 (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) até a crista marginal, perpendicular ao longo eixo do dente e 5 mm acima da junção

amelocementária.

Cavidades de Classe I foram preparadas na área central da superfície exposta utilizando broca carbide número 245 (Regular Carbide Burs – Dentsply, Des Plaines, IL, USA) montada em alta rotação refrigerado com água. Após o preparo de 4 cavidades as brocas eram trocadas por novas. As dimensões das cavidades preparadas foram de 5 mm de comprimento, 4 mm de largura e 3 mm de profundidade; as medidas foram checadas com auxílio de paquímetro. Em seguida, as superfícies da cavidade foram condicionadas com ácido fosfórico a 35% (Scotchbond Universal Etchant Gel – 3M; Neuss, Germany) (Fig. 2 – A) durante 15 s, lavadas (Fig. 2 – B e C) e o excesso de água foi removido com papel absorvente (Kimwipes; Kimberly Clark, Irving, TX, USA) mantendo a umidade na dentina (Fig. 2 – D).

Então os corpos de prova foram separados randomicamente em quatro grupos (n=12) de acordo com o tratamento recebido após o condicionamento ácido: Grupo I - Controle (Sistema Adesivo); Grupo II - Clorexidina 0,2% + Sistema Adesivo; Grupo III – Extrato de semente de uva/*grape seed extract* 15% + Sistema Adesivo e Grupo IV - Doxiciclina 3% + Sistema Adesivo.

3.2.1. PREPARO DOS PRIMERS BIOATIVOS

A solução de CHX a 0,2% foi preparada através da diluição de digluconato de clorexidina a 20% (CHX - Chlorhexidine digluconate 20% - Sigma; St. Louis, MO, USA) em água destilada. As soluções de extrato de semente de uva *grape seed extract* (GSE-UP, MegaNatural, Polyphenolics, Madera, CA, USA) e Doxiciclina (DOXI - Doxycycline Hydrochloride – Fisher Scientific, New Jersey, NJ, USA) foram obtidas através da dissolução

do pó dos compostos em tampão (HEPES buffer solution 20 mM pH = 7,4 , Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA) utilizado por favorecer o processo. Após a diluição e dissolução, o pH das soluções foi ajustado para 7,4 com pHmetro (SevenMulti, Mettler Toledo, Columbus, OH, USA). Todos os primers bioativos foram preparados no dia da sua utilização, sendo aplicados nas cavidades em temperatura ambiente.

3.2.2. APLICAÇÃO DOS PRIMERS

Nas amostras do grupo I (controle), após o condicionamento ácido, foi aplicado nas superfícies dentinárias, durante 60 s, o tampão (HEPES), também utilizado na dissolução do GSE (MegaNatural) e DOXI (Fisher Scientific). Ele foi empregado para garantir que não haveria nenhuma interferência da sua utilização como solvente, e por padronizar também a aplicação de uma solução antes do sistema adesivo no grupo controle. Após a aplicação do tampão as superfícies dentinárias foram lavadas com água abundante, durante 60 s. O excesso de água foi então removido com papel absorvente (Kimwipes) mantendo a umidade da dentina.

No grupo II, após o condicionamento ácido, 100 µl de CHX (Sigma) a 0,2% foi aplicado no interior de cada cavidade com a utilização de pipeta (Fig. 2-E). A solução permaneceu em contato com as superfícies dentinárias durante 60 s. Em seguida, o excesso de CHX (Sigma) foi removido com papel absorvente (Kimwipes) mantendo a umidade da dentina.

Nos grupos III e IV, houve aplicação de GSE-UP a 15 % (MegaNatural), e DOXI a 3% (Fisher Scientific), respectivamente, seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente

para o Grupo II (Fig 2 – F e G) . Entretanto, após os 60 s de aplicação das soluções de GSE (MegaNatural) e DOXI (Fisher Scientific), as cavidades das amostras foram lavadas durante 60 s e então o excesso de água foi removido (Kimwipes). O protocolo de aplicação dos primers é apresentado na tabela 2.

Tabela 2 – Grupos e protocolo de aplicação dos primers bioativos.

Grupos	Concentração dos primers bioativos	Tempo de aplicação	Tempo de lavagem
I - Controle	-	-	60 s
II – CHX	0,2%	60 s	-
III – GSE-UP	15%	60 s	60 s
IV - DOXY	3%	60 s	60 s

3.2.3. PROTOCOLO RESTAURADOR

O sistema adesivo (Adper Single Bond Plus - 3M ESPE, St. Paul, MN, USA) foi aplicado de acordo com as instruções do fabricante: sobre as superfícies da cavidade durante 15 s com microbrush (KG Brush Regular, Cotia, SP, BR) (Fig. 2 – H e I). Em seguida, leves jatos de ar foram aplicados para a remoção do solvente. O adesivo foi, então, fotoativado utilizando aparelho de luz halógena (Optilux 501 – Halogen Curing Light, Kerr Corporation, Orange, CA, USA - 830 mW/cm²) durante 20 s (Fig. 2-J). Depois as cavidades foram restauradas com compósito (Filtek Supreme Ultra – 3M ESPE, St. Paul, MN, USA) segundo a técnica de inserção incremental proporcionando menor contração e cada incremento foi fotoativado durante 40 s (Fig. 2 – K e L).

3.2.4. CICLAGEM MECÂNICA

Após os procedimentos restauradores, as amostras foram estocadas em água destilada durante 24 horas `a 37°C e em seguida foram subdividas em dois subgrupos: A -

Controle (Armazenado em saliva artificial) e B - Submetido à ciclagem mecânica.

Figura 2 – A: Condicionamento ácido do corpo-de-prova. **B e C:** Lavagem das superfícies condicionadas. **D:** Remoção do excesso de água com papel absorvente. **E, F e G:** Aplicação de CHX, DOXI e GSE na cavidade dentinária. **H e I:** Aplicação do sistema adesivo nas superfícies dentinárias. **J:** Fotopolimerização do sistema adesivo. **K e L:** Inserção do compósito restaurador na cavidade.

Durante o período dos ciclos de ciclagem mecânica (aproximadamente nove dias) as amostras do grupo controle foram mantidas em estufa à 37 °C (Tabela 3).

Tabela 3 – Grupos e número de amostras (dentes).

Grupo I	Controle (n=12)	A-	Controle (n=6)
		B-	Ciclagem mecânica (n=6)
Grupo II	CHX (n=12)	A-	Controle (n=6)
		B-	Ciclagem mecânica (n=6)
Grupo III	GSE-UP (n=12)	A-	Controle (n=6)
		B-	Ciclagem mecânica (n=6)
Grupo IV	DOXI (n=12)	A-	Controle (n=6)
		B-	Ciclagem mecânica (n=6)

Para o ensaio de ciclagem mecânica foi utilizado o equipamento Coil - Cycler (Proto-tech, Portland, OR, USA)(Fig. 3). O aparelho consiste de quatro pistões de aço inoxidável, capazes de aplicar carga cíclica de até 400 N com frequência de até 4 Hz. Cada pistão apresenta uma ponta cilíndrica de aço ligado à sua extremidade, responsável por manter contato com as amostras. O valor da força e do número de ciclos aplicados por cada um dos pistões é controlado através do feedback da célula de carga conectado a um software específico (DASYLab v 9.0).

Antes das amostras serem submetidas à ciclagem, foram adaptadas à dispositivos metálicos próprios, e então os conjuntos (amostra+dispositivo) foram acoplados à base da máquina sem que houvesse nenhuma inclinação com a mesma. As pontas dos pistões foram montadas em contato com as superfícies oclusais das restaurações, numa angulação de 90 graus, permanecendo deste modo durante todo o período de ciclagem (Fig. 4).

Figura 3: Equipamento Coil – Cyclor. **Figura 4:** Corpo-de-prova acoplado ao equipamento.

Os pistões foram ajustados para realizar movimentos intermitentes axiais com força de 50 N e frequência de 1,5 Hz. Foram executados 1×10^6 ciclos de aplicação de carga para cada espécime, sendo possível ciclar quatro corpos de prova simultaneamente a cada processo. Sendo assim, uma amostra de cada grupo foi randomicamente submetido à ciclagem a cada 1×10^6 ciclos.

A ciclagem foi realizada buscando maior proximidade com a condição da cavidade oral, sendo assim, cada uma das quatro camaras de acetato contendo as amostras e os pistões foram preenchidas com saliva artificial (5 mM HEPES; 2,5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,3 mM NaN_3 ; ZnCl_2 , pH = 7,4) e mantidas à temperatura ambiente.

3.2.5. TESTE DE MICROTRAÇÃO

Após os corpos de prova serem submetidos à ciclagem mecânica e ao armazenamento em estufa, foram cortados com disco de diamante (Buehler – Series 15 LC Diamond, Buehler, Lake Buff, IL, USA) montado em máquina de corte (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) em formato de palito (0,8 x 0,8 mm; n = 5 por dente), de acordo com a técnica de teste de microtração *non-trimming* (PASHLEY *et al.*, 1999) (Fig. 5).

Figura 5: Corte do corpo-de-prova no formato de palito. **Figura 6:** Máquina de teste de microtração.

Os palitos ($n = 5$) foram adaptados em um dispositivo metálico, composto de duas partes cilíndricas. Foram fixados no centro do dispositivo com éster de cianoacrilato gel (Super Bonder Flex Gel, Henkel Loctite Ltda., São Paulo, Brasil), na união entre as duas partes do dispositivo. Cada segmento foi, então, acoplado às extremidades da Máquina de Teste de Microtração (Bisco, Schaumburg, IL, USA) sendo realizado o teste à velocidade de 1 mm/min (Fig. 6). A resistência de união foi calculada de acordo com a fórmula $R = (F/A) / 10$, onde “R” é a resistência (MPa), “F” é a carga exigida para a ruptura do corpo-de-prova (kgf) e “A” é a área da interface do corpo-de-prova (mm^2). Somente os palitos que apresentaram fratura na interface adesiva foram considerados no cálculo de resistência de união. As médias e desvios padrão (DP) da resistência de união à microtração de cada grupo foram calculados e expressos em MPa. Após a obtenção dos resultados, os valores foram submetidos à análise de variância (2 – way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$), sendo o dente considerado como unidade experimental. O nível de significância de 5% foi empregado em todas as análises realizadas utilizando o programa de estatística SPSS 20 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS, IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

3.2.6. ENSAIO DE INIBIDORES DE COLAGENASE/GELATINASE

A atividade colagenolítica da rMMP-2 (Recombinant Human MMP-2, 10 µg/mL, AnaSpec, Fremont, CA, USA) sob a ação dos primers bioativos foi analisada de acordo com o protocolo descrito por Tay *et al.* (2006), utilizando o kit EnzChek Gelatinase/Colagenase Assay (D-12054, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). A fluorescência do substrato colagenolítico (kit EnzChek) sendo latente, somente é liberada quando tal substrato for degradado enzimaticamente, gerando peptídeos de baixo peso molecular e altamente fluorescentes. Os produtos gerados pela clivagem foram lidos em leitor de placas fluorescentes de 96 poços (Victor X5, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), operado em absorção máxima de 495 nm e máxima emissão fluorescente de 515 nm (Fig. 7). As leituras foram realizadas com 0 (baseline), 1, 2, 4 e 24 horas de incubação à 37°C. Todas as análises foi realizadas de forma triplicada e com a inclusão de controle negativo (blanks).

Figura – 7: Leitor de placas utilizado.

Para este ensaio 1,0 mg/mL de solução estoque de gelatina fluorescente (Kit EnzChek) foi preparada pela adição de 1,0 mL de água destilada/deionizada aos frascos contendo o substrato liofilizado e foi mantida em -20°C até o uso. Sendo esta uma análise foto sensível, todo o ensaio foi realizado em uma placa, na cor preta, com 96 poços em formato de “U” (BrandTech, Essex, CT, USA). A placa também era vedada com tampa

(BrandTech), evitando assim a evaporação do conteúdo interno durante os períodos de incubação. O volume final de cada poço foi de 100 µl e todos os poços analisados continham 10 µl de gelatina fluorescente (Kit EnzChek). Para o controle negativo sem a presença dos primers bioativos foi adicionado 90 µl de solução tampão (Tris-CaCl₂ 50 mM, Fisher Chemical, pH: 7,0) em cada poço, enquanto nos controles negativos com primers bioativos foram adicionados 80 µl solução tampão (Tris-CaCl₂ 50 mM, pH: 7,0) e 10 µl de cada uma das seguintes soluções; CHX `a 20% (Sigma), GSE `a 6,5% (MegaNatural) e DOXI `a 30% (Fisher Scientific). Dessa maneira, no volume final de cada poço os primers bioativos estavam nas concentrações de 0,2%, 0,65% e 3%, respectivamente.

A rMMP-2 utilizada (AnaSpec) foi ativada previamente com solução de APMA (acetato aminofenilmercúrico 5 mM, Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA) durante uma hora à 37°C. Nos poços onde foi analisada a atividade collagenolítica somente da enzima, foram adicionados 1 µl da mistura rMMP-2 (AnaSpec) + APMA (Sigma) e 89 µl de solução tampão (Tris-CaCl₂ 50 mM, pH: 7,0). Já nos poços onde foi analisada a ação dos primers bioativos na atividade collagenolítica da enzima foram adicionados 1 µl da mistura rMMP-2 (AnaSpec) + APMA (Sigma), 79 µl de solução tampão (Tris-CaCl₂ 50 mM, pH: 7,0) e 10 µl de cada solução de primer bioativo (Tabela 4). Os resultados foram obtidos e apresentados na forma de porcentagem de inibição.

Tabela 4 – Grupos e quantidade de cada componente empregado.

Grupos	Gelatina Fluorescente	Enzima	Tampão	Solução – Primer bioativos
Controle Negativo	10 µl	-	90 µl	-
Controle Negativo + CHX /GSE-UP/ DOXI	10 µl	-	80 µl	10 µl
rMMP - 2	10 µl	1 µl	89 µl	-
rMMP - 2 + CHX /GSE-UP/ DOXI	10 µl	1 µl	79 µl	10 µl

3.2.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA POR ZIMOGRÁFIA CONVENCIONAL

A atividade gelatinolítica das rMMP-2 (AnaSpec) e rMMP-9 (Recombinant Human MMP-9, catalytic domain, AnaSpec, Fremont, CA, USA) após incubação com os primers bioativos foi avaliada por zimografia conforme descrito por Mannello, Sebastiani (2003).

3.2.7.A) PREPARAÇÃO DO GEL DE ZIMOGRÁFIA

O gel de separação foi colocado entre as placas de vidro com o auxílio de uma pipeta de transferência e foi aguardado o período de 45 min para sua polimerização em temperatura ambiente. Tal gel de 10% SDS – PAGE foi copolimerizado com gelatina de pele de porco (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) marcada com o componente fluorescente MDPF (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) como substrato, possibilitando assim, a análise de degradação por proteases. Em seguida, o gel de largada foi inserido acima do gel de separação, sendo polimerizado juntamente com o pente (Mini-PROTEAN 3 System, Bio-Rad, Laboratories, Inc, CA, EUA) para a delimitação dos poços de inserção das amostras. As composições dos géis preparados estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 – Composição dos géis de separação, de largada e seus volumes.

Reagente/Solução	Gel de separação	Gel de largada
Água destilada	6895 µl	1573 µl
Acrilamida/ Bis-acrilamida a 40% - (Bio-Rad, Laboratories, Inc, CA, EUA)	10 µl	-
Tris 1,5 M pH 8,8	10 µl	1 µl
Tris 0,5 M pH 6,8	10 µl	1 µl
Gelatina a 5% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)	300 µl	-
SDS a 10% (Bio-Rad, Laboratories, Inc, CA, EUA)	150 µl	25 µl
TEMED (Bio-Rad, Laboratories, Inc, CA, EUA)	7,5 µl	2,5 µl
APS	150 µl	25 µl
Volume Final	15 ml	2,5 ml

3.2.7.B) PREPARO DAS AMOSTRAS

O volume final de cada amostra foi de 15 µl, sendo que cada uma delas recebeu 3 µl de rMMP-2 ou 5 µl de rMMP - 9 (AnaSpec). Antes do ensaio, a rMMP-2 utilizada (AnaSpec) foi ativada com 2 µl de solução de APMA (acetato aminofenilmercúrico 5 mM, Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, EUA) durante uma hora à 37°C.

Após, as MMPs foram incubadas com 5 µl dos primers bioativos. Para isso, foram preparadas soluções de CHX a 0,4%, GSE a 1,3% e DOXI a 6%. Dessa forma, quando diluídos nas amostras, os primers bioativos estavam nas concentrações de 0,2%, 0,65% e 3%, respectivamente. As amostras foram, então, incubadas por 1 hora a 37°C. No momento da inserção no gel, foram adicionados 5 µL de tampão de amostra para zimografia (Zymogram sample buffer, Bio-Rad, Laboratories, Inc, CA, EUA).

3.2.7. C) INSERÇÃO DAS AMOSTRAS

O padrão de peso molecular (Pre stained SDS-PAGE Standards – Low Range, Bio-Rad Laboratories Inc, CA, EUA) utilizado foi inserido no primeiro poço, calibrado com os pesos moleculares. A zimografia foi padronizada da seguinte forma (Tabela 6):

- Poço 1: Padrão de peso molecular (PPM).
- Poços 2 e 3: Controles positivos de rMMP-9 e rMMP-2, respectivamente.
- Poços 5 e 6: rMMP-9 e rMMP- 2 mais CHX.
- Poços 8 e 9: rMMP-9 e rMMP- 2 mais GSE-UP.
- Poços 11 e 12: rMMP-9 e rMMP- 2 mais DOXI.

Tabela 6 - Esquema de inserção das amostras nos poços do gel de zimografia.

Poço	Amostra	Poço	Amostra
1	PPM	7	Vazio
2	rMMP-9	8	rMMP-9 + GSE-UP
3	rMMP-2	9	rMMP-2 + GSE
4	Vazio	10	Vazio
5	rMMP-9 + CHX	11	rMMP-9 + DOXI
6	rMMP-2 + CHX	12	rMMP-2 + DOXI

3.2.7.D) ELETROFORESE E INCUBAÇÃO DO GEL

Controles positivos (MMPs somente) e as amostras preparadas foram submetidas à eletroforese, em condições não reduzidas. As corridas foram realizadas em sistema de separação proteica por eletroforese (Mini-PROTEAN 3 System, Bio-Rad, Laboratories Inc, CA, EUA), com voltagem fixada em 110 V (Fig. 8).

Figura 8: Cuba de eletroforese montada para ensaio.

Após a eletroforese, os géis foram lavados duas vezes com Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) a 2% por 30 min sob agitação constante e, então, foram incubados com tampão de incubação para MMPs (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 5 mM e ZnCl₂ 1 µM) por 24 horas a 37°C. Os géis foram feitos em duplicata sendo que um deles foi incubado nas mesmas condições, porém com tampão contendo fenantrolina 2 mM (inibidor de MMPs). Depois do período de incubação, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% (Bio-Rad, Laboratories Inc, CA, EUA), descorados e imagens foram realizadas no

equipamento Odyssey CLx (LI-COR, NE, EUA) com exposição em luz branca.

A quantificação da atividade gelatinolítica mostrada nos zimogramas foi realizada com o programa de análise de imagens ImageJ (NIH, Frederick, MD, EUA). A análise foi realizada baseando-se nos resultados de densidade óptica de cada pixel das bandas avaliadas.

3.2.8. ZIMOGRAFIA *IN SITU*

Secções (0,6 mm) vindas de todos os grupos (n = 4 por dente) foram cortadas (Buehler – Series 15 LC Diamond), expondo a interface adesiva das restaurações. Em seguida, cada secção foi colada com éster de cianoacrilato gel (Super Bonder Flex Gel) sobre uma lamínula de microscópio (Fisherbrand, Loughborough, LE, UK) e foi reduzida com lixas abrasivas de granulação 1200 (Buehler) até a espessura de 500 µm.

A zimografia *in situ* foi realizada utilizando gelatina de fluorescência conjugada (Kit EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay) como o substrato de MMP. Seu preparo ocorreu da mesma forma descrita anteriormente para o ensaio de inibidores de collagenase/gelatinase. Assim, a solução estoque de gelatina fluorescente foi diluída na proporção 1:8 em tampão de diluição (NaCl 150 mM, CaCl 25 mM, Tris-HCl 50 mM, pH = 8,0). Oitenta µL da mistura de gelatina fluorescente (Kit EnzChek) + solução tampão foi aplicada sobre cada secção e coberta com uma lamínula de cobertura (Microscope Cover Slips, Rochester Scientific CO., INC, Rochester, NY, USA). Em seguida, as amostras foram mantidas protegidas da luz e incubadas em câmara umidificada à 37°C.

Imagens foram feitas após 2 horas de incubação (PESSOAL *et al*, 2013; MAZZONI *et*

al., 2012). A hidrólise do substrato (gelatina conjugada com fluoresceína- Kit EnzChek), indicativo de atividade enzimática gelatinolítica, foi avaliada por meio de exame sob um microscópio de fluorescência em aumento de 40 vezes (Leica DMI 6000, Buffalo Grove, IL, USA) (Fig. 9). Foram feitas imagens ao longo da interface adesiva de todas as fatias, e posteriormente três imagens representativas de cada grupo foram selecionadas para análise com o programa ImageJ (NIH, Frederick, MD, USA).

Figura – 9: Microscópio de fluorescência utilizado.

Utilizando o plugin RGB (Red/Green/Blue) do ImageJ é possível quantificar, em determinada área, o número de fótons fluorescentes nas cores vermelha, verde e azul. Na análise de zimografia *in situ*, a gelatina conjugada com fluoresceína (Kit EnzChek) quando hidrolisada e sob microscópio apropriado é capaz de emitir fluorescência na cor verde.

Sendo assim, foram analisadas três regiões ao longo da interface adesiva de cada uma das três imagens previamente selecionadas. A localização dessas regiões foi escolhida de forma aleatória e por uma pessoa não participante do estudo. Dessa forma, foram selecionadas uma região no centro da imagem, uma à sua esquerda e uma à sua direita. O formato das áreas analisadas eram lineares e todas apresentavam as mesmas medidas

(Figura 10).

Figura – 10: A, B e C imagens das interfaces adesivas, e a demarcação das áreas analisadas com ImageJ.

Após a obtenção dos valores de fluorescência da cor verde de cada uma das três secções analisadas, foi realizada a média por imagem e, ao final, os valores foram submetidos à análise estatística (2 – way ANOVA, Tukey, $p > 0,05$) utilizando SPSS com nível de significância de 5%.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. TESTE DE MICROTRAÇÃO

As médias e desvios padrão do teste de resistência de união (RU) para cada grupo são apresentados na Tabela 7. A análise de variância (2-way ANOVA, Tukey, $p > 0,05$) mostrou que o uso de primers bioativos (CHX, GSE-UP e GSE) não influenciou a resistência de união dentina-adesivo ($p = 0,637$), independentemente se as amostras foram submetidas a ciclagem mecânica ou não ($p = 0,733$). Nenhuma interação foi encontrada quando esses dois fatores foram comparados ($p = 0,993$).

Tabela 7: Média e desvio padrão (DP) da resistência de união (MPa) para os grupos experimentais.

	Controle	CHX 0,2%	GSE-UP 15%	DOXI 3%
Sem ciclagem mecânica (Controle)	36,68 (3,61)	35,82 (10,92)	35,37 (12,27)	34,84 (9,67)
Com ciclagem mecânica	40,26 (10,51)	35,93 (6,46)	38,70 (3,44)	36,25 (6,66)

*Para todas as comparações, $p > 0,05$.

4.2. ENSAIO DE INIBIDORES DE COLAGENASE/GELATINASE

O uso de GSE-UP a 0,065% e DOXI a 3% foi capaz de inibir próximo de 100% a atividade proteolítica da rMMP-2, em todos os tempos avaliados (Tabela 8). Já a CHX a 0,2% foi eficiente na redução da atividade da rMMP-2 somente nas duas primeiras horas analisadas, apresentando 67% de inibição como seu maior valor. Nos demais tempos testados, a CHX não foi capaz de inibir a atividade proteolítica da MMP em questão.

Tabela 8: Primers bioativos e porcentagem de inibição de acordo com os tempos analisados.

	1 h	2 h	4 h	24 h
CHX 0,2%	62,2%	67%	0%	0%
GSE-UP 0,65%	100%	100%	100%	100%
DOXI 3%	100%	99,60%	100%	100%

4.3. ZIMOGRAFIA CONVENCIONAL

A figura 11 mostra a avaliação da atividade gelatinolítica das rMMPs-2 e -9, e o resultado da utilização dos primers bioativos na atividade das mesmas. Os dados da quantificação das rMMPs-9 (92 e 86 kDa) e rMMPs-2 (72 e 64 kDa) apresentaram diminuição significativa de suas expressões quando as enzimas foram incubadas com os primers bioativos (Gráficos 1 e 2). A densitometria do gel (Tabela 9) revelou porcentagens de inibição superiores a 50% para todos os primers bioativos testados. O grupo DOXI + rMMP-9 revelou a maior porcentagem de inibição do teste (99%), enquanto o menor valor foi apresentado pelo grupo CHX + rMMP-2 (68,85%). As porcentagens de inibição foram maiores para a rMMP-9 que para a rMMP-2, independentemente do primer testado. A completa inibição pela fenantrolina 2 mM no gel de zimografia confirmou a natureza das atividades gelatinolíticas como sendo das MMPs (Figura 12).

Figura 11 – Imagem do gel de zimograma mostrando atividade gelatinolítica das rMMPs -2 e -9 quando incubadas com os diferentes primers bioativos. PM: padrão de peso molecular com bandas expressas em kDa. rMMP-9: enzima rMMP-9 e rMMP-2: enzima rMMP-2. rMMP-9/2 + CHX: enzima rMMP-9/2 + clorexidina 0,2%. rMMP-9/2 + GSE-UP: enzima MMP-9/2 + extrato de semente de uva a 0,65%. rMMP-9/2 + DOXI: enzima rMMP-9/2 + doxiciclina a 3%.

Figura 12 – Imagem do gel de zimograma ilustrativo da incubação com tampão contendo fenantrolina. É possível notar que não há atividade gelatinolítica das enzimas (rMMP-2 e rMMP-9).

Gráfico 1 - Atividade gelatinolítica apresentada pela rMMP-2 incubada ou não com os primers bioativos.

Gráfico 2 - Atividade gelatinolítica apresentada pela rMMP-9 incubada ou não com os primers bioativos.

Tabela 9: Primers bioativos e porcentagem de inibição das rMMPs analisadas através da densitometria óptica do gel.

	rMMP - 9	rMMP - 2
CHX 0,2%	98,4%	68,85%
GSE-UP 0,65%	95,05%	83,06%
DOXY 3%	99%	97,85%

4.4. ZIMOGRAFIA IN SITU

Para os corpos-de-prova que não foram submetidas à ciclagem mecânica, a zimografia *in situ* revelou maior média de fótons fluorescentes verdes, ou maior atividade proteolítica, para o grupo controle (1,47), com diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos tratados com os primers bioativos ($p < 0,05$) (Fig. 13 - A, C, E e G). O menor valor obtido, representando menor degradação da gelatina, foi encontrado no grupo tratado com CHX (0,00). Após os corpos-de-prova serem submetidos à ciclagem mecânica, todos os grupos demonstraram aumento das médias de fluorescência, indicando elevação da hidrólise gelatinolítica (Tabela 10). Novamente, o maior valor foi encontrado no grupo controle (24,45) com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos e também em relação ao grupo controle não ciclado (Figura 13 - B, D, F e H). A menor média de fótons fluorescentes foi apresentada mais uma vez pelo grupo tratado com CHX (1,88). Entre os grupos tratados com os primers bioativos, não foram encontradas diferenças com significância estatística ($p > 0,05$) (Tabela 10).

Tabela 10: Quantificação de fluorescência verde de acordo com os grupos experimentais.

	Controle	CHX 0,2%	GSE 15%	DOXI 3 %
Sem ciclagem mecânica (Controle)	1,47 Aa (1,88)	0,00 B (0,00)	0,73 B (1,40)	0,91 B (2,6)
Ciclagem mecânica	24,45 Ab (11,35)	1,88 B (5,64)	3,78 B (7,56)	2,83 B (7,72)

Letras diferentes, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Para comparação entre grupos nos quais os primers bioativos foram utilizados, $p > 0,05$.

Figura 13 – Imagens feitas após 2 h de incubação, sob aumento de 40x, onde **R** = resina composta, **IA** = interface adesiva e **D** = dentina. **A, C, E e G**: Imagens dos grupos controle, CHX, GSE e DOXI, respectivamente, não submetidos à ciclagem mecânica. **B, D, F e H**: Imagens dos grupos controle, CHX, GSE e DOXI, respectivamente, submetidos à ciclagem mecânica.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito do uso de primers bioativos, (soluções de clorexidina a 0,2%, de GSE a 15% e de doxiciclina a 3%,) na resistência de união (RU) de restaurações de resina composta submetidas à ciclagem mecânica e partiu da hipótese nula de que não haveria interferência na interface adesiva independente do primer utilizado. Os resultados encontrados no presente estudo permitem aceitar tal hipótese, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na RU de restaurações independente do primer utilizado, submetidas ou não à ciclagem mecânica.

Entretanto, era importante avaliar além da RU, pois esta propriedade pode não ser alterada em função do tipo de sistema adesivo utilizado (DENG *et al.*, 2014), porém a utilização de tratamentos prévios do substrato pode proporcionar maior longevidade da camada híbrida devido à diminuição da degradação colagenolítica (TJÄDERHANE *et al.*, 2013). Assim, este estudo também teve por objetivo quantificar a inibição da atividade proteolítica de duas MMPs (2 e 9), importantes na degradação da camada híbrida (BRESCHI *et al.*, 2010; DE MUNCK *et al.*, 2009) após o uso dos primers bioativos. Partiu-se da hipótese nula de que não haveria diferença na ação proteolítica destes primers sobre as MMPs estudadas. Avaliando-se os resultados encontrados no estudo, esta hipótese não pode ser aceita, uma vez que a clorexidina (CHX) apresentou inibição da collagenase/gelatinase apenas nas duas primeiras horas de incubação, enquanto os outros dois primers bioativos foram eficientes mesmo após 24 horas de incubação.

Além disso, após ciclagem mecânica, houve menor atividade proteolítica quando os primers bioativos foram utilizados em relação ao grupo controle, que apresentou maior degradação após a ciclagem mecânica ($p < 0,05$).

Desde a introdução do conceito de *total – etching* (FUSAYAMA, 1980), os efeitos do condicionamento ácido sobre a dentina tem sido objetivo de muitos estudos (PASHLEY, CIUCCHI, SANO, 1993; PASHLEY *et al.*, 2011; TAY, PASHLEY, 2002). O condicionamento dentinário com ácido fosfórico a 32-37% remove conteúdo mineral da dentina e expõe as fibras colágenas da matriz, criando, assim, espaço para a infiltração dos monômeros a fim de que seja alcançada a retenção micromecânica do material adesivo (NAKABAYASHI, PASHLEY, 1998). Embora tal procedimento proporcione RU inicial satisfatória, existe queda na durabilidade dessa ligação a longo prazo, resultando no aumento de interesse sobre a estabilidade das restaurações com compósitos resinosos (REIS *et al.*, 2008).

Pesquisas *in vitro* tem demonstrado que a união entre dentina e compósito resinoso se deteriora com o envelhecimento (ARMSTRONG *et al.*, 2004; BRESCHI *et al.*, 2008) como um resultado da degradação da camada híbrida na interface adesiva (De MUNCK *et al.*, 2009). Além da degradação hidrolítica dos materiais adesivos (HASHIMOTO *et al.*, 2000), a degradação proteolítica das fibrilas colágenas também é relatada como responsável pelo declínio da RU dentinária ao longo do tempo (HASHIMOTO *et al.*, 2010). Este fato é baseado em estudos *in vivo* que demonstram que o colágeno da camada híbrida sofre degradação hidrolítica gradual (SANO *et al.*, 1999; TAKAHASHI *et al.*, 2002).

A desmineralização da dentina, com posterior infiltração do componente resinoso do adesivo, são passos clinicamente necessários para promover a união dentina-adesivo (TOLEDANO *et al.*, 2014). A dentina desmineralizada e desprotegida, localizada na parte inferior da camada híbrida, é a zona mais fraca da interface adesiva, sendo susceptível à ação proteolítica das MMPs (SPENCER *et al.*, 2010). Então, sendo as MMPs capazes de degradar esta estrutura, alguns autores afirmam que, para aumentar a durabilidade da

união dentina-adesivo, a atividade de tais metaloproteinases deve ser inibida (PASHLEY *et al.*, 2010). Adicionalmente, considerando a queda da RU o maior problema que afeta as restaurações adesivas (SAMPAIO DE-MELO *et al.*, 2013), diminuindo a longevidade das mesmas (CARRILHO *et al.*, 2005; DE MUNCK *et al.*, 2005), seria importante prolongar sua vida útil clínica, aumentando a estabilidade da interface adesiva (DURSUN *et al.*, 2013).

Para isso, o uso de inibidores exógenos de MMPs, tais como CHX, doxíciclina, e extratos naturais (AGUIAR *et al.*, 2014; DEMEULE *et al.*, 2000; LOGUERCIO *et al.*, 2009) pode ser uma estratégia eficaz para melhorar a longevidade das restaurações adesivas (PERDIGÃO *et al.*, 2013). Neste estudo, as substâncias inibidoras avaliadas foram denominadas de primers bioativos, por serem compostos capazes de interagir com a estrutura biológica no momento de formação da camada híbrida.

Após anos de pesquisa, inibidores de MMPs mostraram preservar a união adesiva entre o compósito resinoso e a dentina, diminuindo assim a taxa de falhas na interface das restaurações (BRESCHI *et al.*, 2010). Alguns estudos mostraram aumento imediato da RU depois do tratamento dentinário com substâncias bioativas (AL-AMMAR *et al.*, 2009; CASTELLAN *et al.*, 2013), porém tal resultado não foi demonstrado neste estudo.

A RU de materiais restauradores à estrutura dentária vem sendo utilizada para quantificar a qualidade da adesão desde a invenção do condicionamento ácido (BUONOCORE, 1955). O teste de microtração é uma das abordagens mais avaliadas em novos materiais no conhecimento da influência de procedimentos adesivos na performance clínica (ARMSTRONG *et al.*, 2010; PASHLEY *et al.*, 1995). Sugerido por Sano *et al.* (1994), tal teste avalia a RU de corpos-de-prova com áreas de junção adesiva reduzidas. A versão “non-trimming” desta técnica é considerado teste de adesão confiável, permitindo uma

distribuição de estresse mais uniforme sobre as pequenas áreas dos corpos-de-prova. A probabilidade de que um defeito estrutural possa afetar as medidas de resistência na interface, como ocorre em outros testes adesivos, é limitado pela pequena área de superfície avaliada (PASHLEY *et al.*, 1999).

A constante inovação de materiais e técnicas restauradoras, faz com que os estudos *in vitro* que simulem condições próximas das orais sejam cada vez mais preconizados (BEDRAN-DE-CASTRO *et al.*, 2004). Neste contexto, um método *in vitro* capaz de avaliar a longevidade de restaurações adesivas é a simulação do meio oral através da ciclagem mecânica (TOLEDANO *et al.*, 2013). Tal metodologia foi empregada no presente estudo, em que a força (50 N), frequência (1,5 Hz) e número de ciclos aplicados (1×10^6) em cada espécime foram estabelecidos baseados na literatura (ANDERSON, 1956; BEDRAN-DE-CASTRO *et al.*, 2004; FRANKENBERGER *et al.*, 2005; VIDAL *et al.*, 2013; TOLEDANO *et al.*, 2014).

Alguns estudos reportaram queda na RU após a ciclagem mecânica (FRANKENBERGER *et al.*, 2005; KASRAEI, KHAMVERDI, 2008; TOLEDANO *et al.*, 2006). Entretanto, os resultados do grupo controle e dos grupos tratados com os primers bioativos nesse estudo se mantiveram estáveis após a ciclagem mecânica, não apresentando diferenças estatisticamente significantes entre si ($p>0,05$). Isso provavelmente se deve ao fato de que a ciclagem mecânica não foi capaz de modificar a estabilidade da interface adesiva de forma que alterasse a qualidade da adesão obtida, pois a técnica restauradora realizada manteve a umidade da dentina (Osorio *et al.*, 2005).

Recentemente, Toledano *et al.* (2014), apresentaram resultados contrastantes em que a ciclagem mecânica produziu aumento significativo das propriedades nanomecânicas

na camada híbrida. Porém, tal estudo foi realizado com armazenamento das amostras em solução de fluido corporal simulado, induzindo remineralização na interface adesiva. O presente trabalho utilizou armazenamento e a ciclagem mecânica em saliva artificial. A lógica para a utilização de saliva artificial foi de que a presença dos íons de cálcio preveniria desmineralização adicional da estrutura em questão e esta desmineralização poderia ser a causa da alteração da profundidade do condicionamento ácido na dentina, gerando maior degradação da interface adesiva (PASHLEY *et al.*, 2004).

Contudo, a comparação entre diferentes estudos que simulam o meio oral através da ciclagem mecânica é bastante difícil, pois existem variações nas metodologias como tipos de preparos cavitários, materiais restauradores, número e frequência de ciclos e força aplicada (BEDRAN-DE-CASTRO *et al.*, 2004).

A análise estatística dos resultados de RU permitiu verificar a ocorrência de altos valores de desvio padrão. Tal fato pode ter decorrido da confecção das cavidades com brocas montadas em alta rotação, que não gera superfícies dentinárias tão padronizadas quanto dentina exposta através de lixas abrasivas (BARROS *et al.*, 2005; DIAS, PEREIRA, SWIFT JR., 2004).

Outrossim, a técnica de obtenção dos espécimes para microtração pode causar microfraturas na superfície das amostras, o que pode justificar os altos valores de desvio padrão (ISHIKAWA *et al.*, 2007; SHONO *et al.*, 1999).

Adicionalmente, em se tratando da longevidade de restaurações adesivas deve-se levar em consideração o importante e fundamental papel exercido pelo sistema adesivo empregado (PASHLEY *et al.*, 2011). Neste estudo, optou-se pela utilização de apenas um

sistema adesivo *etch-and-rinse* (Single Bond Plus – 3M) para que este fator de variação fosse isolado dos demais.

O Single Bond Plus é um adesivo à base de álcool e água, que apesar de ser sensível à técnica, é capaz de obter altos valores de RU à dentina quando comparado a outros adesivos *total-etching* (DE MUNCK *et al.*, 2003). Neste estudo, esta característica pode ter contribuído na estabilidade da RU apresentada após a ciclagem mecânica, pois os valores se mantiveram estáveis mesmo para o grupo controle submetido à ciclagem mecânica.

É conhecido que na adesão criada por sistemas adesivos *etch-and-rinse*, a parte mais comprometida e susceptível a degradação enzimática é a área de colágeno desnuda, total ou parcialmente, localizada na parte inferior da camada híbrida onde as fibras colágenas se encontram desprotegidas do adesivo (CARRILHO *et al.*, 2007). Dessa forma, a inibição de enzimas colagenolíticas poderia eliminar ou retardar a degradação do colágeno, e deslocar o principal local de falha para outro ponto (TJÄDERHANE *et al.*, 2013).

A efetividade da CHX decorre de suas importantes propriedades catiônicas. Uma vez que as superfícies orais são carregadas negativamente, a carga positiva da CHX é responsável pelo seu efeito antimicrobiano prolongado (EMILSON, 1977; TULUNOGLU *et al.*, 1998). Dessa forma, a CHX apresenta forte afinidade pelas estruturas orgânicas (colágeno) e inorgânicas (hidroxiapatita) da dentina quando aplicada após o condicionamento ácido (NORDBO 1972; ISKANDER, ELKASSAS, MOHSEN, 2015). Teoricamente, tal aplicação poderia melhorar a RU entre a dentina e o adesivo devido à sua forte carga iônica positiva, que facilmente se liga aos grupos fosfato carregados negativamente (SAY *et al.*, 2004).

Além disso, é conhecido que a substantividade da CHX é dependente da sua concentração (CARRILHO *et al.*, 2010), e uma das preocupações relatadas com o seu uso no pré-tratamento da dentina é sua toxicidade. A concentração de 0,002% tem sido referida como não tóxica para as células humanas periodontais (CHANG *et al.*, 2001) ou para as células odontoblásticas (DE SOUZA *et al.*, 2007). No entanto, não se sabe ainda qual concentração de CHX deve ser aplicada inicialmente a fim de que esta concentração (0,002%) seja alcançada próxima à polpa, após o efeito da diluição do fluido através dos túbulos dentinários (MOBARAK, 2011). No presente estudo, foi utilizada concentração de solução de CHX a 0,2% conforme sugerido por Carrilho *et al.*, (2010). Segundo os autores, em dentina parcialmente desmineralizada (como no procedimento restaurador) a substantividade da CHX é maior quando aplicada na concentração de 0,2%. Além disso, a aplicação de altas concentrações de CHX levaria somente à supersaturação do substrato com uma rápida liberação do excesso da solução (Carrilho *et al.*, 2010).

Neste estudo, os resultados de RU do grupo CHX-Controle são semelhantes aos achados de Breschi *et al.* (2010). Porém, quando as amostras envelhecidas foram comparadas, os resultados divergem, uma vez que os autores encontraram menores resultados de RU após os corpos-de-prova serem estocados dois anos em saliva artificial. Adicionalmente, os resultados de CHX encontrados no presente estudo corroboram ao estudo clínico de Dutra-Correa *et al.* (2013) em que a aplicação de CHX antes dos adesivos dentinários não influenciou na performance clínica da restauração durante 18 meses em serviço.

Os efeitos dos extratos de *Vitis vinifera* (nome científico da planta de onde o GSE é extraído) no colágeno da matriz dentinária tem sido bastante estudados (BEDRAN-RUSSO *et*

al., 2011; CASTELLAN *et al.*, 2011; DOS SANTOS *et al.*, 2011). Ademais, o uso de extratos de GSE tem mostrado resultados positivos nos ensaios de RU, *stiffness* (MIESCKE *et al.*, 2008; YAMAUCHI *et al.*, 2007) e na estabilidade do colágeno dentinário ao longo do tempo (CASTELLAN *et al.*, 2010; CASTELLAN *et al.*, 2011). O GSE apresenta capacidade única de biomodificar a matriz dentinária através da formação de ligações cruzadas exógenas; criando substrato dentinário mais resistente sem interferir no estabelecimento da camada híbrida, e consequentemente, melhorando a RU a curto e longo prazo (CASTELAN *et al.*, 2013).

As proantocianidinas são grupo específico de compostos polifenólicos. Sendo assim, fatores como solventes, o processo de extração dos produtos, pH e temperatura podem influenciar na sua estrutura e composição, bem como no seu potencial de realizar ligações cruzadas (KU, SATHISHKUMAR, MUN, 2007). Estudos realizados sobre a interação entre o colágeno e plantas derivadas de polifenóis sugerem que os mecanismos de ligação cruzada são, na sua maioria, não covalentes, tais como pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (NAPOLITANO *et al.*, 2014; NAPOLITANO *et al.*, 2013). Alguns estudos também relatam possíveis interações covalentes entre os polifenóis e o colágeno (BEART, LILLEY, HASLAM, 1985; OZDAL, CAPANOGLU, ALTAY, 2013). Embora os mecanismos de ligações cruzadas entre as proantocianidinas e o colágeno ainda não estejam bem definidos, acredita-se que estas ligações podem ocorrer através da formação de pontes de hidrogênio entre os grupos amina e carboxila do colágeno e a hidroxila fenólica das PACs (HAGERMAN, KLUCHER, 1986; FANG *et al.*, 2012). Estes sítios adicionais de ligações de hidrogênio disponíveis, juntamente com a estrutura do colágeno, podem permitir a ligação proantocianidina-colágeno ou colágeno-colágeno, induzindo a formação de ligações cruzadas e resultando em propriedades mecânicas melhores (NALLA *et al.*, 2005).

Neste estudo, o uso de GSE no procedimento restaurador não teve influência nos resultados de RU dentina-adesivo, resultados divergentes de outros estudos (AL-AMMAR *et al.*, 2009; CASTELLAN *et al.*, 2013; FANG *et al.*, 2012). Porém, sabendo que os grupos experimentais deste estudo não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$) entre si, mesmo quando ciclados, os resultados dos grupos tratados com GSE podem ser considerados satisfatórios.

Até então, uma das principais desvantagens da inclusão do GSE no procedimento restaurador era o longo tempo de aplicação necessário para a obtenção do efeito terapêutico desejado (PERDIGÃO *et al.*, 2013). Dessa forma, para viabilizar seu uso clínico, neste estudo tal primer bioativo foi aplicado em tempo reduzido (60 s) sobre as superfícies dentinárias. O protocolo empregado foi baseado em estudos pilotos onde diferentes concentrações e tempos de aplicação de GSE foram avaliados. A maior parte dos estudos utilizando GSE no tratamento da dentina, previamente a adesão, foi realizado com o composto a concentração de 6,5% (AL-AMMAR *et al.*, 2009; CASTELLAN *et al.*, 2013). Como o objetivo era reduzir o tempo de aplicação, no presente estudo a concentração utilizada foi de 15%, concentração permitida devido à baixa toxicidade apresentada pelo GSE (PERDIGÃO *et al.*, 2013).

Além disso, autores sugerem que a utilização do GSE em conjunção ao Single Bond pode ser benéfica, devido à maior afinidade entre os solventes do adesivo e as soluções de GSE; visto que o etanol é um solvente polar miscível em água (CASTELLAN *et al.*, 2013).

Portanto, mais estudos sobre os protocolos de inserção do GSE no tratamento restaurador são necessários, uma vez que trata-se de um material natural, barato e um

método promissor no aumento das ligações cruzadas no colágeno dentinário (CASTELLAN *et al.*, 2013).

Além da CHX e do GSE, neste estudo foi proposta a utilização da doxiciclina no tratamento das superfícies dentinárias. As tetraciclina e os seus análogos são capazes de inibir MMPs através de mecanismos independentes da propriedade antimicrobiana destes antibióticos (ACHARYA *et al.*, 2004; GOLUB *et al.*, 1991). Autores afirmam que os sítios de ligação de cálcio e zinco das tetraciclina e seus análogos são responsáveis, pelo menos em parte, pela inibição das atividades extracelulares das MMPs (ACHARYA *et al.*, 2004; GOLUB *et al.*, 1998). Considerando a influência das MMPs na estabilidade de estruturas compostas de colágeno, foi reportado que a doxiciclina diminuiu fortemente a degradação da matriz dentinária (TJÄDERHANE *et al.*, 2013), quando absorvida pela mesma (RASIMICK *et al.*, 2010).

A aplicação de soluções aquosas de doxiciclina, como um passo preliminar depois do condicionamento ácido na RU imediata, foi investigada em alguns estudos recentes (ELKASSAS *et al.*, 2014; FEITOSA *et al.*, 2014; MACHNICK *et al.*, 2003; STANISLAWCZUK *et al.*, 2011). Neste estudo, houve aplicação de doxiciclina a 3%, considerada dose subantimicrobiana e efetiva na inibição de MMPs (Guimarães *et al.*, 2010). Os valores de RU dos grupos com esse primer não foram diferentes estatisticamente ($p > 0,05$) dos valores alcançados pelos outros grupos, mostrando que não houve prejuízo do desempenho adesivo, resultados semelhantes a Feitosa *et al.* (2014), em que o uso de doxiciclina, encapsulada no adesivo através de nanotubúlos, não gerou diferenças estatisticamente significantes na RU dentina-adesivo.

Assim, reconhece-se que o uso de tetraciclinas e seus análogos na união dentinária, como um modo de prolongar a adesão entre dentina e adesivo, é ainda escasso na literatura e por isso, deve ser o foco de futuras investigações devido a potencial função das tetraciclinas na inibição de MMPs (Perdigão *et al.*, 2013).

De acordo com os resultados apresentados nesta parte do estudo, pode-se inferir que substâncias inibidoras de MMPs não necessariamente são capazes de gerar aumento de RU dentina-adesivo. É importante notar, entretanto, que a utilização dos primers bioativos não diminui os valores de RU, não causando efeito negativo na interface adesiva. Além disso, o teste de microtração, mesmo sendo uma análise clássica de RU, pode não ter sido capaz de gerar informações mais específicas sobre a ação dos primers bioativos na interface adesiva. Logo, outras análises são necessárias para a obtenção de resultados mais abrangentes, gerando conhecimento mais profundo.

Dessa forma, este estudo também teve por objetivo quantificar a inibição da atividade proteolítica da MMP-2 e MMP-9 pelos primers bioativos através de ensaios de inibidores de collagenase/gelatinase e zimografia convencional e *in situ*.

Estudos anteriores relacionam melhoria na estabilidade da camada híbrida e da RU, a longo prazo, com a inibição das MMP-2, -8, -9 no tecido dentinário (CARRILHO *et al.*, 2007 a e b; GENDRON *et al.*, 1999; HEBLING *et al.*, 2005). O pressuposto é lógico, uma vez que essas MMPs são as principais enzimas responsáveis pela degradação da matriz dentinária (BRESCHI *et al.*, 2010; MARTIN-DE LAS HERAS, VALENZUELA, OVERALL, 2000; MAZZONI *et al.*, 2007; SULKALA *et al.*, 2005).

A MMP-2 foi encontrada tanto em dentina sadia mineralizada e desmineralizada (TAY *et al.*, 2006). Mesmo que as análises quantitativas das diferentes MMPs em dentina ainda não estejam concluídas, os dados atualmente disponíveis indicam que a MMP-2 pode ser a MMP mais prevalente na dentina (BRESCHI *et al.*, 2010; MARTIN-DE LAS HERAS, VALENZUELA, OVERALL, 2000; MAZZONI *et al.*, 2007; SULKALA *et al.*, 2007). Embora, a MMP-9 não esteja diretamente envolvida na degradação do colágeno tipo I (CHAUSSAIN-MILLER *et al.*, 2006), ela pode degradar seus remanescentes, dando origem a peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos, contribuindo assim para a continuação da hidrólise enzimática (TAY *et al.*, 2006). Além disso, intensa atividade da MMP-2 e -9 foram detectados na parte basal da camada híbrida (BRESCHI *et al.*, 2010; DE MUNCK *et al.*, 2009). Sendo assim, uma vez que as MMPs -2 e -9 estão entre as principais enzimas proteolíticas presentes na dentina, buscou-se avaliar a presença e as concentrações das suas formas moleculares através do ensaio de zimografia convencional (HU *et al.*, 2007) que é uma avaliação muito sensível às gelatinases.

De acordo com a densitometria óptica do gel, quando os valores de inibição para MMP-9 foram analisados, todos os primers mostraram resultados acima de 95%, demonstrando eficácia. Porém, quando os dados de inibição da MMP-2 foram avaliados houve um distanciamento entre os valores de acordo com o primer bioativo utilizado; de forma que doxiciclina, GSE e CHX foram capazes de inibir respectivamente, 97,85%, 83,06% e 68,85, da atividade proteolítica.

Alguns estudos demonstraram diferenças na inibição de gelatinases que podem estar relacionadas ao domínio fibronectina (COLLIER *et al.*, 1992; XU *et al.*, 2004) As MMPs-2 e -9, são classificadas como gelatinases e apresentam uma estrutura em comum localizada

no sítio catalítico que as torna diferentes das outras MMPs, nomeada fibronectina. Essa estrutura é responsável pela ligação da enzima à estrutura do colágeno e da gelatina (COLLIER *et al.*, 1992; XU *et al.*, 2004). Em adição, apesar de apresentarem propriedades funcionais semelhantes, as MMPs -2 e -9 podem ter diferentes sensibilidades aos inibidores (XU *et al.*, 2005). Por exemplo, dimetilsulfóxido é capaz de inibir a MMP-2, (MURPHY *et al.*, 1994; XU *et al.*, 2004) entretanto esta capacidade não ocorre em relação a MMP-9 (COLLIER *et al.*, 1992). Em outro estudo, pequenas alterações moleculares de um inibidor sintético de MMP causou mudanças significativas na atividade inibitória das MMPs -2 e -9, com maior inibição da MMP-9 (HANESSION *et al.*, 2001), assim como no presente estudo. A inibição específica da MMP-9 pode ser relacionada ao seu domínio hemopexina, que difere da MMP-2, apresentando região de *hinge* mais longa (BRESCHI *et al.*, 2010). Essas características podem explicar as diferenças de resultados demonstrados pela densitometria óptica do gel de zimografia.

Tanto na zimografia convencional, quanto na análise de inibição de collagenase/gelatinase, a CHX apresentou resultado inibitório não tão satisfatório quanto os outros primers. O colágeno pode competir com as MMPs pela ligação com a CHX, o que requer o uso de concentrações relativamente elevadas (CARRILHO *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2010), justificando os resultados encontrados. Tal comportamento contrasta com achados que creditam à CHX forte inibição de MMPs (BRESCHI *et al.*, 2010; GENDRON *et al.*, 1999; PASHLEY *et al.*, 2004). Segundo Negrelo Newton *et al.* (2004) a CHX é uma molécula anfipática que se liga a várias proteínas por um mecanismo de quelatação. Este mecanismo é responsável por suas excelentes propriedades anti-sépticas. Portanto, através de um

mecanismo parecido, acredita-se que a CHX impeça a ligação de íons, tais como o Zn^{2+} e Ca^{2+} na MMP, inibindo assim sua atividade catalítica (DE MUNCK *et al.*, 2009).

PASHLEY *et al.*, 2004, seguindo metodologia de ensaio de inibidores, demonstraram que a CHX foi capaz de inibir quase 100% das MMPs. Entretanto, as MMPs estudadas eram originadas do pó de dentina, não sendo, portanto, dados específicos de inibição (LIU *et al.*, 2011). Como o objetivo geral do presente estudo era avaliar o efeito do uso dos primers bioativos na interface adesiva, utilizou-se MMPs isoladas e definidas, o que permitiu conhecimento mais específico sobre a ação dos primers.

É conhecido que a proantocianidina é um inibidor potencial de MMP-2 e MMP-9 (MATCHETT *et al.*, 2005). Compostos a base de proantocianidinas, como o GSE, são capazes de biomodificar a dentina através da estabilização das fibrilas de colágeno expostas na camada híbrida e pelo reforço da matriz dentinárias contra degradação, além das vantagens de um agente de ligação cruzada sobre os sintéticos (FANG *et al.*, 2012).

A literatura sugere, que a capacidade de inibição das MMPs pelos agentes de ligação cruzada pode ser atribuída a mecanismo de silenciamento alternativo através de mudanças na estrutura 3-D da enzima (BUSENLEHNER, ARMSTRONG, 2005, CASTELLAN *et al.*, 2013). Teoricamente, isto poderia ser conseguido por meio de alterações irreversíveis induzidas dentro do domínio catalítico ou por meio de inibição alostérica de outros domínios modulares que também participam na degradação do colágeno (SELA-PASSWELL *et al.*, 2010). Dessa forma, as ligações cruzadas podem causar mudanças conformacionais no local ativo, domínio catalítico e/ou no local de ligação de MMPs, eliminando a capacidade das enzimas de degradar o substrato (LIU *et al.*, 2011; O'Farrell *et al.*, 2006).

Os ensaios nesta parte do presente estudo foram realizados com concentrações de GSE abaixo de 15%, porque em concentrações elevadas ocorre precipitação do extrato na gelatina, dificultando a realização do teste. Assim, baseados em estudos pilotos, foram definidas as concentrações utilizadas. De modo geral, os resultados obtidos sugerem que o GSE é um material favorável para a dentina, sendo um candidato ao desenvolvimento de um material de intervenção clínica (PHANSALKAR *et al.*, 2015).

O efeito inibidor da doxíciclina sobre as collagenases pode estar envolvido com sua capacidade de se ligar aos íons metálicos, como o Zn^{2+} e Ca^{2+} , que são requeridos pela enzima para manter a sua conformação apropriada e atividade hidrolítica. De acordo com Golub *et al.* (1990), a doxíciclina exerce sua ação anti proteolítica agindo tanto por inibição direta das MMPs e através da inibição da sua expressão (KUDALKAR *et al.*, 2014). Além disso, doxíciclina pode inibir a ativação das MMPs como um resultado das suas propriedades antioxidantes (BARTOLI *et al.*, 2006; PRALL *et al.*, 2002).

A inibição das MMPs pela doxíciclina foi confirmada pelos resultados apresentados no presente estudo, semelhantes a outros estudos que apresentaram resultados positivos de inibição da atividade proteolítica das MMPs -2 e -9 (ANTONIO *et al.*, 2014; KUDALKAR *et al.*, 2014; MATA *et al.*, 2015).

A análise dos dados gerados pela zimografia *in situ* indica que os primers bioativos foram capazes de diminuir a atividade das MMPs localizadas na interface adesiva, não apresentando diferenças estatisticamente significantes entre eles ($p > 0,05$). Assim, a hipótese nula proposta de que não haveria diferença entre a ação proteolítica destes primers sobre as MMPs estudadas pode ser aceita. Comparando os grupos controle, a atividade gelatinolítica foi mais intensa para o grupo Controle, submetido à ciclagem

mecânica ($p<0,05$) com diferença estatisticamente significativa em relação ao mesmo grupo sem ciclagem, indicando que o método de envelhecimento produziu aumento da degradação da interface adesiva, tornando-a mais susceptível à ação das MMPs. Tal resultado contrasta com os achados de Toledano *et al.* (2013), em que a ciclagem mecânica inibiu a degradação do colágeno mediada pelas MMPs, resultando em uma diminuição da proteólise colagenolítica. A ciclagem mecânica também fez com que o nível de atividade proteolítica nos grupos tratados com os primers bioativos aumentasse; entretanto não houve diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos não ciclados ($p>0,05$).

A aplicação da técnica de zimografia *in situ* na investigação das características da interface adesiva é ainda recente; de forma que poucos estudos estão disponíveis para comparação. De modo geral, o presente estudo reforça a reprodutibilidade da técnica demonstrada por Mazzoni *et al.* (2012).

No mais, a união dentina-compósito resinoso é uma forma única de engenharia de tecidos, na qual uma matriz de colágeno desmineralizada é utilizada como suporte para a infiltração de resina para criação da camada híbrida que deve ser relativamente hidrofóbica, orgânica e resistente à degradação (TJÄDERHANE *et al.*, 2013). Estas propriedades físico-químicas são completamente diferentes das da dentina ou do esmalte mineralizado. Na maioria das formas de engenharia de tecidos, a base de desenvolvimento é concebida para ser reabsorvida pelas células hospedeiras e substituída por um tecido natural dentro de semanas a meses. Em camadas híbridas criadas com resina, a base de colágeno deve durar por décadas. Ela deve ser o mais estável possível, embora existam proteases endógenas que podem destruí-la (BRESCHI *et al.*, 2010; PERDIGÃO, LOPES, GOMES, 2008; PERDIGÃO *et al.*, 2013). Mesmo que ainda existam problemas não resolvidos em relação à durabilidade das

restaurações com compósito resinoso, é notável ver quão longe a união adesiva avançou nas últimas seis décadas (TJÄDERHANE *et al.*, 2013). Logo, é irrefutável a busca por novas técnicas e materiais utilizados no procedimento restaurador.

Por fim, não se deve desconsiderar que clinicamente, além das tensões mecânicas, simuladas no presente estudo, as restaurações sofrem outros desafios como alterações no pH, ataque por substâncias químicas e/ou bactérias, que também podem comprometer a longevidade dos tratamentos restauradores. Sendo assim, idealmente, estudos clínicos devem ser conduzidos para avaliar o desempenho da utilização desses primers bioativos em função.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no estudo, pode-se concluir que:

- Os primers bioativos não exerceram influência significativa sobre a resistência de união dentina-adesivo, independente da ação da ciclagem mecânica;
- A clorexidina foi menos eficiente na inibição de colagenase/gelatinase que os demais primers bioativos testados, apresentando efeito inibitório apenas nas duas primeiras horas após a incubação, enquanto os demais apresentaram inibição da atividade gelatinolítica da MMP-2 em todos os tempos testados;
- Na análise de zimografia convencional, os primers bioativos inibiram as atividades proteolíticas das MMPs - 2 e -9;
- Na análise de zimografia in situ, os primers bioativos diminuíram a atividade das MMPs localizadas na interface adesiva, sem diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$) entre eles;
- Houve aumento da atividade gelatinolítica na interface adesiva das amostras do grupo Controle, sendo maior quando submetidos à ciclagem mecânica, efeitos não encontrados nos grupos tratados com primers bioativos.

Assim, dentro das limitações deste estudo, pode-se concluir que apesar de o uso dos primers bioativos não ter influenciado os valores de resistência de união dentina-adesivo, eles demonstraram resultados positivos na estabilidade da camada híbrida. Dessa forma, os primers bioativos estudados neste trabalho poderiam ser utilizados nos procedimentos restauradores odontológicos.

Referências

7. REFERÊNCIAS

ACHARYA, M.R.; VENITZ, J.; FIGG, W.D.; SPARREBOOM, A. **Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix Metalloproteinases.** Drug Resist Updat 2004;7:195–208.

AGUIAR, T.R.; VIDAL, C.M.P.; PHANSALKAR, R.S.; TODOROVA, I.; NAPOLITANO, J.G.; MCALPINE, J.B.; CHEN, S.N.; PAULI, G.F.; BEDRAN-RUSSO, A.K. **Dentin Biomodification Potential Depends on Polyphenol Source.** J Dent Res 2014;93(4):417-422.

AL-AMMAR A.; DRUMMOND, J.L.; BEDRAN-RUSSO, A.K. **The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength.** J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2009;91(1):419–424.

ALMAHDY, A.; KOLLER, G.; FESTY, F.; BARTSCHA, J.W.; WATSONA, T.F.; BANERJEE, A. **An MMP-inhibitor modified adhesive primer enhances bond durability to carious dentin.** Dental Materials 2015;31:594–602.

ANDERSON, D.J. **Measurement of stress in mastication II.** Journal of Dental Research 1956;35(5):671-673.

ANTONIO, R.C.; CERON, C.S.; RIZZI, E.; COELHO, E.B.; TANUS-SANTOS, J.E.; GERLACH, R.F. **Antioxidant effect of doxycycline decreases MMP activity and blood pressure in SHR.** Mol Cell Biochem 2014;386:99–105.

ARMSTRONG, S.R., VARGAS, M.A., CHUNG, I., et al. **Resin-dentin interfacial ultrastructure and microtensile dentin bond strength after five-year water storage.** Oper Dent 2004;29:705–12.

ARMSTRONG, S.; GERALDELI, S.; MAIA, R.; RAPOSO, L.H.; SOARES C.J.; YAMAGAWA, J. **Adhesion to tooth structure: a critical review of "micro" bond strength test methods.** Dental Materials 2010;26(2):50-62.

BEDRAN-DE-CASTRO, A.K.; CARDOSO, P.E.; AMBROSANO, G.M.; PIMENTA, L.A. **Thermal and mechanical load cycling on microleakage and shear bond strength to dentin.** Operative Dentistry 2004;29(1):42-48.

BEDRAN-DE-CASTRO, A.K.; PEREIRA, P.N.; THOMPSON, J.Y. **Influence of load cycling and tubule orientation on ultimate tensile strength of dentin.** J Adhes Dent 2004;6(3):191-194.

BEDRAN-RUSSO, A.K.; PEREIRA, P.N.; DUARTE, W.R.; DRUMMOND, J.L.; YAMAUCHI, M. **Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength.** J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2007;80:268–72.

BEDRAN-RUSSO, A.K.; PASHLEY, D.H.; AGEE, K.; DRUMMOND, J.L.; MIESCKE, K.J. **Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen crosslinkers.** J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2008;86:330–4.

BEDRAN-RUSSO, A.K.; CASTELLAN, C.S.; SHINOHARA, M.S.; HASSAN, L.; ANTUNES, A. **Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative therapies.** Acta Biomater 2011;7:1735- 1741.

BEART, J.E.; LILLEY, T.H.; HASLAM, E. **Polyphenol interactions. Part 2. Covalent binding of procyanidins to proteins during acid-catalysed decomposition; observations on some polymeric proanthocyanidins.** J Chem Soc Perkin Trans 1985;2(9):1439–43.

BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; RUGGERI, A.; CADENARO, M.; DI LENARDA, R.; DE STEFANO, D.E. **Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface.** Dent Mater 2008;24:90–101.

BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; NATO, F.; CARRILHO, M.; VISINTINI, E.; TJÄDERHANE, L.; RUGGERI, A. JR.; TAY, F.R.; DORIGO, E.; PASHLEY, D. **Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: A 2-year in vitro study.** Dental Materials 2010;26(4):320-325.

BRESCHI, L.; MARTIN, P.; MAZZONI, A.; NATO, F.; CARRILHO, M.; TJÄDERHANE, L.; VISINTINI, E.; CADENARO, M.; TAY, F.R.; DE STEFANO, DORIGO E.; PASHLEY, D.H. **Use of a specific MMP-inhibitor (Galardin) for preservation of hybrid layer.** Dent Mater 2010;26:571–8.

BUONOCORE, MG. **A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces.** J Dent Rest 1955;34(6):849-53.

BUSENLEHNER, L.S.; ARMSTRONG, R.N. **Insights into enzyme structure and dynamics elucidated by amide H/D exchange mass spectrometry.** Arch Biochem Biophys 2005; 433:34-46.

CARRILHO, M.R.; CARVALHO, R.M.; TAY, FRANKLIN, R.; YIU, C.; PASHLEY, D.H. **Durability of resin-dentin bonds related to water and oil storage.** Am J Dent 2005;18(6):315-319.

CARRILHO, M.R.; CARVALHO, R.M.; DE GOES, M.F.; DI HIPÓLITO, V.; GERALDELI, S.; TAY, F.R.; et al. **Chlorhexidine preserves dentin bond *in vitro*.** Journal of Dental Research 2007a;86:90–94.

CARRILHO, M.R.; GERALDELI, S.; TAY, F.; DE GOES, M.F.; CARVALHO, R.M.; TJÄDERHANE, L.; REIS, A.F.; HEBLING, J.; MAZZONI, A.; BRESCHI, L.; PASHLEY, D. **In Vivo Preservation of hybrid layer by chlorhexidine.** J Dent Res 2007b;86:529–533.

CARRILHO, M.R.; CARVALHO, R.M.; SOUSA, E.N.; NICOLAU, J.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; TJÄDERHANE, L.; TAY, F. R.; AGEE, K.; PASHLEY, D.H. **Substantivity of Chlorhexidine to Human Dentin.** Dent Mater 2010;26(8):779–785.

CASTELLAN, C.S.; PEREIRA, P.N.; GRANDE, R.H.; BEDRAN-RUSSO, AK. **Mechanical characterization of proanthocyanidin dentin matrix interaction.** Dent Mater 2010;26:968–73.

CASTELLAN, C.S.; BEDRAN-RUSSO, A.K.; KAROL, S.; PEREIRA, PN. **Long-term stability of dentin matrix following treatment with various natural collagen cross-linkers.** J Mech Behav Biomed Mater 2011;4:1343-1350.

CASTELLAN, C.S.; BEDRAN-RUSSO, A.K.; ANTUNES, A.; PERIRA, P.N. **Effect of dentin biomodification using naturally derived collagen cross-linkers: one-year bond strength study.** International Journal of Dentistry 2013;918010.

CATON, J.; RYAN, M.E. **Clinical studies on the management of periodontal diseases utilizing subantimicrobial dose doxycycline (SDD).** Pharmacol Res 2011;63:114–20.

CHANG, Y.C.; HUANG, F.M.; TAI, K.W.; CHOU, M.Y. **The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells.** Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics 2001;92(4):446-450.

CHAUSSAIN-MILLER, C.; FIORETTI, F.; GOLDBERG, M.; MENASHI, S. **The role of matrix metallo-proteinases (MMPs) in human caries.** J Dent Res 2006;85:22–32.

COLLIER, I.E.; KRASNOV, P.A.; STRONGIN, A.Y.; BIRKEDAL-HANSEN, H.; GOLDBERG, G.I. **Alanine scanning mutagenesis and functional analysis of the fibronectin-like collagen-binding domain from human 92-kDa type IV collagenase.** J Biol Chem 1992;267:6776–6781.

DEMEULE, M.; BROSSARD, M.; PAGÉ, M.; GINGRAS, D.; BÉLIVEAU, R. **Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins.** Biochim Biophys Acta 2000;1478:51–60.

DE MUNCK, J.; VAN MEERBEEK, B.; YOSHIDA, Y.; INOUE, S.; VARGAS, M.; SUZUKI, K.; LAMBRECHTS, P.; VANHERLE, G. **Four-year of water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin.** Journal of Dental Research 2003;82(2):136-140.

DE MUNCK, J.; VAN LANDUYT, K.; PEUMANS, M.; POITEVIN, A.; LAMBRECHTS, P.; BRAEM, M.; VAN MEERBEEK, B. **A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results.** J Dent Res 2005;84:118–32.

DE MUNCK, J.; VAN DEN STEEN, P.E.; MINE, A.; VAN LANDUYT, K.L.; POITEVIN, A.; OPDENAKKER, G.; VAN MEERBEEK, B. **Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces.** J Dent Res 2009;88:1101–6.

DE SOUZA, L.B.; DE AQUINO, S.G.; DE SOUZA, P.P.; HEBLING, J.; COSTA, C.A. **Cytotoxic effects of different concentrations of chlorhexidine.** American Journal of Dentistry 2007;20(6):400-404.

DOS SANTOS, P.H.; KAROL, S.; BEDRAN-RUSSO, A.K. **Long-term nanomechanical properties of biomodified dentin–resin interface components.** J Biomech 2011;44:1691-1694.

DURSUN, E.; LE GOFF, S.; RUSE, D.N. **Effect of Chlorhexidine Application on the Longterm Shear Bond Strength to Dentin of a Resinmodified Glass Ionomer.** Operative Dentistry 2013;38(3):275-281.

DUTRA-CORREA, M.; SARACONI, C.H.; CIARAMICOLI, M.T.; KIYAN, V.H.; QUEIROZ, C.S. **Effect of chlorhexidine on the 18-month clinical performances of two adhesives.** Journal of Adhesive Dentistry 2013;15(3):287-292.

ELKASSAS, D.W.K.; FAWZI, E.M.F.; ZOHAIRY, A.E. **The effect of cavity disinfectants on the micro-shear bond strength of dentin adhesives.** European Journal of Dentistry 2014;8(2).

EMILSON, C.G. **Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine.** Scand J Dent Res 1977;85:255–265.

FANG, M.; LIU, R.; XIAO, Y.; LI, F.; WANG, D.; HOU, R.; CHEN, J. **Biomodification to dentin by a natural crosslinker improved the resin–dentin bonds.** Journal of Dentistry 2012;40:458–466.

FEITOSA, S.A.; PALASUK, J.; KAMOCKI, K.; GERALDELI, S.; GREGORY R.L.; PLATT, J.A.; WINDSOR, L.J.; BOTTINO, M.C. **Doxycycline-Encapsulated Nanotube-Modified Dentin Adhesives.** J Dent Res 2014;93(12):1270-1276.

FIFE, RS; ROUGRAFF, B; PROCTOR, C; SLEDGE, G. **Induction of apoptosis by doxycycline in cultured human osteosarcoma cells.** J Lab Clin Med 1997;130:530-4.

FRANKENBERGER, R.; PASHLEY, D.H.; REICH, S. M.; LOHBAUER, U.; PETSCHLT, A.; TAY, F.R. **Characterisation of resin–dentine interfaces by compressive cyclic loading.** Biomaterials 2005; 26:2043–2052.

FREDERIKS, W.M.; MOOK, O.R. **Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on in situ zymography of gelatinases: review and protocols.** J Histochem Cytochem 2004;52:711-722.

FUSAYAMA, T. **New adhesive resin restoration.** In: **New Concepts in Operative Dentistry.** Quintessence Publishing, Chicago 1980;61-156.

GENDRON, R.; GREINER, D.; SORSA, T.; MAYRAND, D. **Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine.** Clin Diagn Lab Immunol 1999; 6:437–439.

GILBERTSON-BEADLING, S.; POWERS, E.A.; STAMP-COLE, M.; SCOTT, P.S.; WALLACE, T.L.; COPELAND, J.; PETZOLD, G.; MITCHELL, M.; LEDBETTER, S.; POORMAN, R. **The tetracycline analogs minocycline and doxycycline inhibit angiogenesis in vitro by a non-metalloproteinase-dependent mechanism.** Cancer Chemother Pharmacol 1995;36:418–24.

GOLUB, L.M.; GOODSON, J.M.; LEE, H.M.; VIDAL, A.M.; MCNAMARA, T.F.; RAMAMURTHY, N.S. **Tetracyclines inhibit tissue collagenases.** Effects of ingested low-dose and local delivery systems. J Periodontol 1985;56:93–7.

GOLUB, L.M.; CIANCIO, S.; RAMAMURTHY, N.S.; LEUNG, M.; MCNAMARA, T.F. **Low-dose doxycycline therapy: effect on gingival and crevicular fluid collagenase activity in humans.** J Periodontal Res 1990;25:321–30.

GOLUB, L.M.; RAMAMURTHY, N.S.; MCNAMARA, T.F.; GREENWALD, R.A.; RIFKIN, B.R. **Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs.** Crit Rev Oral Biol Med 1991;2(3):297-321.

GOLUB, L.M.; LEE, H.M.; RYAN, M.E.; GIANNOBILE, W.V.; PAYNE, J.; SORSA, T. **Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms.** Adv Dent Res 1998;12(2):12-26.

GUIMARÃES, D.A.; RIZZI, E.; CERON, C.S.; MARTINS-OLIVEIRA, A.; GERLACH, R.F.; TANUS DOS SANTOS, J.E. **Inibição de metaloproteinases da matriz extracelular: uma possível estratégia terapêutica na hipertensão arterial?** Rev Bras Hipertens 2010;17(4):226-230.

HAGERMAN, A.E.; KLUCHER, K.M. **Tannin–protein interactions.** Progress in Clinical Biological Research 1986;213:67–76.

HANESSIAN, S.; MOITESSIER, N.; GAUCHET, C.; VIAU, M. **N-aryl sulfonyl homocysteine hydroxamate inhibitors of matrix metalloproteinases: further probing of the S1, S1', and S2'pockets.** J Med Chem 2001; 44:3066–3073.

HASHIMOTO, M.; OHNO, H.; ENDO, K.; KAGA, M.; SANO, H.; OGUCHI, H. **The effect of hybrid layer thickness on bond strength: demineralized dentin zone of the hybrid layer.** Dent Mater 2000;16:406–411.

HASHIMOTO, M. **A review—micromorphological evidence of degradation in resin-dentin bonds and potential preventional solutions.** J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2010;92:268–80.

HEBLING, J.; PASHLEY, D.H.; TJÄDERHANE, L.; TAY, F.R. **Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers *in vivo*.** J Dent Res 2005;84:741–746.

HU, J.; VAN DEN STEEN, P.E.; SANG, Q.X.; OPDENAKKER, G. **Matrix metallo-proteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases.** Nat Rev Drug Discov 2007;6:480-498.

ISHIKAWA, A.; SHIMADA, Y.; FOXTON, R.M.; TAGAMI, J. **Micro- tensile and micro-shear bond strengths of current self-etch adhesives to enamel and dentin.** Am J Dent 2007;20:161-6.

ISKANDER, M.; ELKASSAS, D.; MOHSEN, M.A. **Effect of Two Matrix Metalloproteinase Inhibitors on the Color Stability of a Nanofilled Resin Composite.** Operative Dentistry 2015;40(1):E11-E20.

JOSHI, S.S.; KUSZYNSKI, C.A.; BAGCHI, D. **The cellular and molecular basis of health benefits of grape seed proanthocyanidin extract.** Curr Pharm Biotechnol 2001;2:187–200.

LIU, Y.; TJÄDERHANE, L.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; LI, N.; MAO, J.; PASHLEY, D.H.; TAY, F.R. **Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation.** Dent Res 90(8):953-968, 2011.

KASREI ,S.H.; KHAMVERDI, Z. **Effect of mechanical load cycling on microtensile bond strength of self-etch systems to dentin.** Journal of Dentistry 2008;5(4)173-178.

KIM, J.; UCHIYAMA, T.; CARRILHO, M.; AGEE, K.A.; MAZZONI, A.; BRESCHI, L.; CARVALHO, R.M.; TJÄDERHANE, L.; LOONEY, S.; WIMMER, C.; TEZVERGIL-MUTLUAY, A.; TAY, F.R.; PASHLEY, D.H. **Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin.** Dental Materials 2010;26:771–8.

KU, C.S.; SATHISHKUMAR, M.; MUN, S.P. **Binding affinity of proanthocyanidin from waste Pinus radiata bark onto proline-rich bovine achilles tendon collagen type I.** Chemosphere 2007;67:1618–27.

KUDALKAR, M.D.; NAYAK, A.; BHAT, K.S.; NAYAK, R.N. **Effect of *Azadirachta indica* (Neem) and Aloe vera as compared to subantimicrobial dose doxycycline on matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9: An *in-vitro* study.** Ayu 2014 Jan-Mar; 35(1): 85–89.

LAUER-FIELDS, J.L.; CHALMERS, M.J.; BUSBY, S.A.; MINOND, D.; GRIFFIN, P.R.; FIELDS, G.B. **Identification of specific hemopexin-like domain residues that facilitate matrix metalloproteinase collagenolytic activity.** J Biol Chem 2009;284:24017-24024.

LOGUERCIO, A.D.; STANISLAWCZUK, R.; POLLI, L.G.; COSTA, J.A.; MICHEL, M.D.; REIS, A. **Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin bond strength durability.** Eur J Oral Sci 2009;117:587–96.

MACEDO, G.V.; YAMAUCHI, M.; BEDRAN-RUSSO, A.K. **Effects of chemical cross-linkers on caries-affected dentin bonding.** J Dental Res 2009;88:1096-1100.

MACHNICK, T.K.; TORABINEJAD, M.; MUNOZ, C.A.; SHABAHANG, S. **Effect of MTAD on the Bond Strength to Enamel and Dentin.** Journal of Endodontics 2003;29(12):818-821

MANELLO, F.; SEBASTIANI, M. **Zymographic Analyses and Measurement of Matrix Metalloproteinase-2 and -9 in Nipple Aspirate Fluids.** Clin Chem 2003;49(10):1546- 1550.

MARTIN-DE LAS HERAS, S.; VALENZUELA, A.; OVERALL, C.M. **The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine.** Arch Oral Biol 2000;45:757–765.

MATA, K.M.; TEFÉ-SILVA, C.; FLORIANO, E.M.; FERNANDES, C.R.; RIZZI, E.; GERLACH, R.F.; MAZZUCA, M.Q.; RAMOS, S.G. **Interference of doxycycline pretreatment in a model of abdominal aortic aneurysms.** Cardiovascular Pathology 2015;24:110–120.

MATCHETT, M.D.; MACKINNON, S.L.; SWEENEY, M.I.; GOTT-SCHALL-PASS, K.T.; HURTA, R.A.R. **Blueberry flavonoids inhibit matrix metalloproteinase activity in DU145 human prostate cancer cells.** Biochemistry and Cell Biology 2005;83(5):637–643, 2005.

MAZZONI, A.; MANNELLO, F.; TAY, F.R.; TONTI, G.A.; PAPA, S.; MAZZOTTI, G.; DI LENARDA, R.; PASHLEY, D.H.; BRESCHI, L. **Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 isoforms in human sound dentin.** J Dent Res 2007;86:436–440.

MAZZONI, A.; NASCIMENTO, F.D.; CARRILHO, M.; TERSARIOL, I.; PAPA, V.; TJÄDERHANE, L.; DI LENARDA, R.; TAY, F.R.; PASHLEY, D.H.; BRESCHI, L. **MMP Activity in the hybrid layer detected with *in situ* zymography.** J Dent Res 2012;91(5):467-472.

MAZZONI, A.; APOLONIO, F.M.; SABOIA, V.P.A.; SANTI, S.; ANGELONI, V.; CHECCHI, V.; CURCI, R.; DI LENARDA, R.; TAY, F.R.; PASHLEY, D.H.; BRESCHI, L. **Carbodiimide inactivation of MMPs and effect on dentin bonding.** J Dent Res 2014;93(3):263-268.

MOBARAK, EH. **Effect of chlorhexidine pretreatment on bond strength durability of caries-affected dentin over 2-year aging in artificial saliva and under simulated intrapulpal pressure.** Operative Dentistry 2011;36(6):649-660.

MURPHY, G.; NGUYEN, Q.; COCKETT, M.I.; ATKINSON, S.J.; ALLAN, J.A.; KNIGHT, C.G.; WILLENBROCK, F.; DOCHERTY, A.J. **Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant.** J Biol Chem 1994; 269:6632–6636.

NAKABAYASHI, N.; PASHLEY, D.H. **Evolution of dentin-resin bonding In: Hybridization of Dental Hard Tissues.** Quintessence Publishing, Chicago 1998;1-20.

NAPOLITANO, J.G.; GODECKE, T.; LANKIN, D.C.; BU, J.; MCALPINE, J.B.; CHEN, S.N.; PAULI, G.F. **Orthogonal analytical methods for botanical standardization: determination of green tea catechins by qNMR and LC–MS/MS.** J Pharm Biomed Anal 2014;93:59–67.

NAPOLITANO, J.G.; LANKIN, D.C.; GRAF, T.N.; FRIESEN, J.B.; CHEN, S.N.; MCALPINE, J.B.; OBERLIES, N.H.; PAULI, G.F. **HiFSA fingerprinting applied to isomers with near-identical NMR spectra: the silybin/isosilybin case.** J Org Chem 2013;78(7):2827–39.

NAROTZKI, B.; REZNICK, A.Z.; AIZENBUD, D.; LEVY, Y. **Green tea: a promising natural product in oral health.** Arch Oral Biol 2012;57:429-435.

NEGRELO NEWTON, A.P.; CADENA, S.M.; MERLIN ROCHA, M.E.; SKÄRE CARNIERI, E.G.; MARTINELLI DE OLIVEIRA, M.B. **New data on biological effects of chlorhexidine: Fe²⁺ induced lipid peroxidation and mitochondrial permeability transition.** Toxicol Lett 2004;151:407-416.

NORDBO, H. **The affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and tooth surfaces.** Scand J Dent 1972;80:465-473.

O'FARRELL, T.J.; GUO, R.; HASEGAWA, H.; POURMOTABBED, T. **Matrix metalloproteinase-1 takes advantage of the induced fit mechanism to cleave the triple-helical type I collagen molecule.** Biochemistry 2006;45:15411-15418.

OSORIO, R.; TOLEDANO, M.; OSORIO, E.; AGUILERA, F.S.; TAY, F.R. **Effect of load cycling and *in vitro* degradation on resin-dentin bonds using a self-etching primer.** J Biomed Mater Res A 2005;72(4):399-408.

OZDAL, T.; CAPANOGLU, E.; ALTAY, F. **A review on protein–phenolic interactions and associated changes.** Food Res Int 2013;51(2):954–70.

PASHLEY, D.H.; SANO, H.; CIUCCHI, B.; YOSHIYAMA, M.; CARVALHO, R.M. **Adhesion testing of dentin bonding agents: a review.** Dental Materials 1995;11(2):117-25.

PASHLEY, D.H.; CARVALHO, R.M.; SANO, H.; NAKAJIMA, M.; YOSHIJAMA, M.; SHONO, Y.; FERNANDES, C.A.; TAY, F.R. **The microtensile bond test: a review.** J Adhes Dent 1999;1:299-309.

PASHLEY, DH; TAY, FR; YIU, C; HASHIMOTO, M; BRESCHI, L; CARVALHO, RM; ITO, S. **Collagen degradation by host-derived enzymes during aging.** J Dent Res 2004;83(3):216-21.

PASHLEY, D.H.; TAY, F.R.; BRESCHI, L.; TJÄDERHAN, L.; CARVALHO, R.M.; CARRILHO, M.; TEZVERGIL-MUTLUAY, A. **State of the art etch-and-rinse adhesive.** Dental Materials 2011;27:1-16.

PAVAN, S.; XIE, Q.; HARA, A.T.; BEDRAN-RUSSO, A.K. **Biomimetic approach for root caries prevention using a proanthocyanidin-rich agent.** Caries Res 2011;45:443-447.

PERDIGÃO, J.; REIS, A.; LOGUERCIO, A.D. **Dentin Adhesion and MMPs: A Comprehensive Review.** Journal of Esthetic and Restorative Dentistry 2013;25(4):219-241.

PESSOA, J.I.C.; GUIMARÃES, G.N.; VIOLA, N.V.; SILVA, W.J.; SOUZA, A.P.; TJÄDERHANE, L.; LINE, S.R.; MARQUES, M.R. **In situ study of the gelatinase activity in demineralized dentin from rat molar teeth.** Acta Histochemica 2013; 115(3),245–251.

REIS, A.F.; GIANNINI, M.; PEREIRA, P.N.R. **Effects of a peripheral enamel bond on the long term effectiveness of dentin bonding agents exposed to water *in vitro*.** Journal Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterial 2008;85(1):10-17.

SAMPAIO DE-MELO, MA; GOES, D DA C; RODRIGUES-DE-MORAES, MD; SANTIAGO, SL; RODRIGUEZ, LKA. **Effect of chlorhexidine on the bond strength of a self-etch adhesive system to sound and demineralized dentin.** Braz Oral Res 2013;27(3):218-24.

SANO, H.; SHONO, T.; SONODA, H.; TAKATSU, T.; CIUCCHI, B.; CARVALHO, R.M. **Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength--evaluation of a micro-tensile bond test.** Dent Mater 1994;10:236-240.

SANO, H.; YOSHIKAWA, T.; PEREIRA, P.N.; KANEMURA, N.; MORIGAMI, M.; TAGAMI, J.; PASHLEY, D.H. **Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer *in vivo*.** J Dent Res 1999;78:906–11.

SAPADIN, A.N.; FLEISCHMAJER, R. **Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications.** J Am Acad Dermatol 2006;54:258–65.

SAY, E.C.; KORAY, F.; TARIM, B.; SOYMAN, M.; GULMEZ, T. **In vitro effect of cavity disinfectants on the bond strength of dentin bonding systems.** Quintessence Int 2004;35:56–60.

SELA-PASSWELL, N.; ROSENBLUM, G.; SHOHAM, T.; SAGI, I. **Structural and functional bases for allosteric control of MMP activities: Can it pave the path for selective inhibition?** Biochim Biophys Acta 2010;1803:29-38.

SHINADA, K.; TAGASHIRA, M.; WATANABE, H.; SOPAPORNAMORN, P.; KANAYAMA, A.; KANDA, T.; IKEDA, M.; KAWAGUCHI, Y. **Hop bract polyphenols reduced three-day dental plaque regrowth.** J Dent Res 2007;86:848-851.

SHONO, Y.; TERASHITA, M.; SHIMADA, J.; KOZONO, Y.; CARVALHO, R.M.; RUSSELL, C.M.; PASHLEY, D.H. **Durability of resin–dentin bonds.** J Adhes Dent 1999;1:211–8.

SPENCER, P.; YE, Q.; PARK, J.; TOPP, E.M.; MISRA, A.; MARANGOS, O.; WANG, Y.; BOHATY, B.S.; SINGH, V.; SENE, F.; ESLICK, J.; CAMARDA, K.; KATZ, J.L. **Adhesive/Dentin interface: the weak link in the composite restoration.** Ann Biomed Eng 2010;38:1989–2003.

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;52:121–127.

TAKAHASHI, A.; INOUE, S.; KAWAMOTO, C.; OMINATO, R.; TANAKA, T.; SATO, Y.; PEREIRA, P.N.; SANO, H. ***In vivo* long-term durability of the bond to dentin using two adhesive systems.** J Adhes Dent 2002;4:151–9.

TAY, F.R.; PASHLEY, D.H.; LOUSHINE, R.J.; NORMAN WELLER, R.; MONTICELLI, F.; OSORIO, R. **Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin.** Journal of Endodontics 2006;32(9):862-8.

TJÄDERHANE, L.; NASCIMENTO, F.D.; BRESCHIE, L.; MAZZONI, A.; TERSARIOL, I.L.S.; GERALDELI, S.; TEZVERGIL-MUTLUAY, A.; CARRILHO, M.; CARVALHO, R.M.; TAY, F.R.; PASHLEY, D.H. **Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer - A review.** Dent Mater. 2013;29(10):999-1011.

TJÄDERHANE, L.; NASCIMENTO, F.D.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; TERSARIOL, I.L.S.; GERALDELI, S.; TEZVERGIL-MUTLUAY, A.; CARRILHO, M.R.; CARVALHO, R.M.; TAY, F.R.; PASHLEY, D.H. **Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins.** Dent Mater. 2013;29(1):116-135.

TJÄDERHANE, L. **Dentin Bonding: Can We Make it Last?** Operative Dentistry. 2015;40(1):4-18.

TOLEDANO, M.; OSORIO, R.; ALBALADEJO, A.; AGUILERA, F.S.; TAY, F.R.; FERRARI, M. **Effect of Cyclic Loading on the Microtensile Bond Strengths of Total-etch and Self-etch Adhesives.** Operative Dentistry 2006;31(1):25-32.

TOLEDANO, M.; AGUILERA, F.S.; YAMAUTI, M.; RUIZ-REQUENA, M.E.; OSORIO, R. **In vitro load-induced dentin collagen-stabilization against MMPs degradation.** Journal of the mechanical behavior of biomedical materials 2013;27:10-8.

TOLEDANO, M.; AGUILERA, F.S.; SAURO, S.; CABELLO, I.; OSORIO, E.; OSORIO, R. **Load cycling enhances bioactivity at the resin-dentin interface.** Dental Materials 2014;30(7):e169-88.

TULUNOGLU, O.; AYHAN, H.; OLMEZ, A.; BODUR, H. **The effect of cavity disinfectants on microleakage in dentin bonding systems.** J Clin Pediatr Dent 1998;22:299-305.

VIDAL, C.M.P.; PAVAN, S.; BRISO, A.L.F.; BEDRAN-RUSSO, A.K. **Effects of three restorative techniques in the bond strength and nanoleakage at gingival wall of Class II restorations subjected to simulated aging.** Clin Oral Invest 2013;17:627-633.

XU, X.; WANG, Y.; LAUER-FIELDS, J.L.; FIELDS, G.B.; STEFFENSEN, B. **Contributions of the MMP-2 collagen binding domain to gelatin cleavage. Substrate binding via the collagen binding domain is required for hydrolysis of gelatin but not short peptides.** Matrix Biol 2004;23:171-181.

XU, X.; CHEN, Z.; WANG, Y.; YAMADA, Y.; STEFFENSEN, B. **Functional basis for the overlap in ligand interactions and substrate specificities of matrix metalloproteinases-9 and -2.** Biochem J 2005;392:127–134.

Anexo

8. ANEXO

A. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito do uso de primers bioativos na resistência de união dentina - adesivo

Pesquisador: Fernanda de Carvalho Panzeri Pires-de-Souza

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 41786715.5.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 967.260

Data da Relatoria: 25/02/2015

Apresentação do Projeto:

O projeto está apresentado de forma correta, cumpre todas as normativas estabelecidas pelo CEP da FORP/USP e CONEP. Os pesquisadores são habilitados para execução do mesmo. Relevante para a área da saúde. Bem embasado cientificamente.

Objetivo da Pesquisa:

As hipóteses testadas são: 1- Os grupos tratados com os primers bioativos testados apresentarão melhor resistência de união do que o grupo não tratado. 2- A ciclagem mecânica produzirá uma diminuição na resistência de união dos grupos tratados e não tratados.

Objetivo Primário:

O estudo tem como objetivo avaliar o efeito do uso de primers bioativos (Cloroxidina, Doxiciclina e Proantocianidinas) em restaurações adesivas classe I submetidas à ciclagem mecânica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Trata-se de um estudo in vitro, com dentes humanos doados pelo Biobanco de Dentes da FORP/USP.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto apresenta orçamento detalhado, cronograma adequado, formulários do Biobanco e

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

Continuação do Parecer: 967.200

autorização de uso - infraestrutura.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo aprovado. Os relatórios (parciais/final) deverão ser encaminhados, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte – canto superior direito do portal www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Situação do Parecer:

Aprovado

<http://www.saude.gov.br/plataformabrasil>

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberado na 177ª Sessão, realizada em 26/02/2015.

RIBEIRÃO PRETO, 27 de Fevereiro de 2015

Assinado por:
Símon Cecílio Hallak Regalo
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br