UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

LARISSA PINCELI CHAVES

Efeito de inibidores da atividade proteolítica na resistência de união de pino de fibra de vidro à dentina radicular após 12 meses

BAURU
2016

LARISSA PINCELI CHAVES

Efeito de inibidores da atividade proteolítica na resistência de união de pino de fibra de vidro à dentina radicular após 12 meses

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

Orientadora: Profª. Drª: Linda Wang

Versão Corrigida

BAURU

2016

Chaves, Larissa Pinceli

C398e Efeito de inibidores da atividade proteolítica na resistência de união de pino de fibra de vidro à dentina radicular após 12 meses / Larissa Pinceli Chaves. – Bauru, 2016.

78 p. : il. ; 31cm.

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

Orientadora: Profª. Drª: Linda Wang

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

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

Assinatura:_____

Data:

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

À Deus

Pela vida, pela força diária que me concedeu em todos os momentos difícies, me dando ainda mais uma benção durante esse curso que foi a minha Carolina.

Aos meus pais, ***Manoel Marcio Chaves e Neusa Maria Pinceli Chaves***

Que se doaram para criar uma família com princípios éticos e dando extrema importância ao estudo. Estou aqui hoje graças a vocês que se importam em ver seus filhos crescendo profissionalmente e também graças ao apoio que deram aos meus filhos enquanto eu estava fora. Por isso hoje vocês defendem junto comigo. Me faltam palavras para expressar tamanha gratidão por tudo que fizeram por mim e por meus filhos. Muito obrigada por tudo.

Ao meu marido, ***Jorny****, meu companheiro. Pelo apoio, compreensão e carinho, Pelo carinho e tempo desprendido ao Eduardo na minha ausência.*

Ao meu filho **Eduardo,** que com apenas 2 aninhos estava longe de mim. Acho que doía mais em mim do que nele. Mas ele nunca se abateu, sempre manteve sua alegria e bom humor. Muito obrigado por ser essa criança amável e alegre. Seu amor fez que eu me dedicasse em cada minuto que estava fora para serem os mais proveitosos, já que eu estava longe de você. E sua alegria em cada dia me abasteceu com seu amor.

À minha filha **Carolina**. Me acompanhou na gestação sem atrapalhar. Obrigada por ter sido minha companheira, ter me ouvido na barriga e com certeza me entendeu. Se você não tivesse me entendido não teria tido forças para eu fazer todas as atividades que fiz. E depois que nasceu foi minha companheira nas medições dos espécimes enquanto ficava no sling e quando eu escrevia estava sempre brincando ao meu redor. Muito obrigada por ser essa menina leve, simpática.

Obrigada por serem tão presentes na minha vida. Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Aos **meus familiares e amigos**, que de perto ou de longe, torcem sempre por mim. Obrigada pelo incentivo e por inúmeras vezes serem o apoio para meus filhos.

À minha orientadora querida, **Linda Wang.** Uma pessoa inteligentíssima, com ótimo caráter e justa com todos a seu redor. Amiga, pois não só me corrigiu academicamente, mas me orientou quando iniciei essa jornada tão ansiosa e preocupada. Ajudou-me a conter a ansiedade mesmo quando num susto descobri estar grávida. Acolheu-me em todos os momentos me trazendo serenidade e confiança. Tenho orgulho de ter tido a sorte de ser sua orientada, permitindo conviver contigo. Além de ter me engrandecido com tanta sabedoria!

À **Bhenya**, amiga querida que fiz nesse período do doutorado. Sua companhia fez os dias em Bauru serem mais leves, sem a tristeza de estar longe da minha família. Foi prestativa e atenciosa em todos os momentos. Sempre lembrarei de você!!

Às **colegas do doutorado**, Diana, Marina Giacomini e Elaine. Pelo companheiro e compartilhamento de aprendizado.

À **Flavia Nahsan,** amiga querida que foi quem me estimulou a iniciar o doutorado.

À **Vera Schmitt** e **Fabiana Naufel**. Graças a seus exemplos de dedicação e amor ao que fazem que estou na dentística. Vocês foram as primeiras que acreditaram em mim. Por isso é de vocês também essa defesa.

À equipe da pesquisa clínica de laminados cerâmicos, **Prof. Dr. Sergio Ishikiriama, Bhenya, Carla, Diana e Rafael**. Trabalhar nessa equipe foi fantástico e me fez crescer imensamente como pesquisadora. Obrigada pela paciência e confiança.

Aos meus colegas de doutorado, **Ana Flávia, Bhenya, Carla, Diana, Elaine, Marina, Raphaela, Rafael Maenosono, Odair** e **Rafael Menezes** pela convivência, companheirismo e aprendizado que tivemos juntos.

A todos os funcionários do departamento de Dentística e Materiais Odontológicos, sempre prestativos e amigos. Em especial agradeço à **Rita, Elizio, Natália, Sandrinha, Alcides, Nelson** e **Telma**. Muito obrigada pela simpatia, generosidade, carinho que sempre demonstraram.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À **Faculdade de Odontologia de Bauru**, que me acolheu de maneira inesquecível. E aos **funcionários** que tão prontamente sempre nos atendem.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior, pelo fundamental apoio financeiro concedido para realização dessa pesquisa.

Aos professores do Departamento de Dentística

Prof. Dr. Adilson Yoshio Furuse

Prof. Dr. Aquira Ishikiriama

Profª. Dr.ª Ana Flávia Sanches Borges

Prof. Dr. Carlos Eduardo Francischone

Prof. Dr. Eduardo Batista Franco

Prof. Dr. José Mondelli

Prof. Dr.ª Juliana Fraga Soares Bombonatti

Profª. Dr.ª Linda Wang

Profª. Drª. Maria Fidela de Lima Navarro

Profª. Drª. Maria Teresa Atta

Prof. Dr. Paulo Afonso Silveira Francisconi

Prof. Dr. Rafael Francisco Lia Mondelli

Prof. Dr. Sérgio Kioshi Ishikiriama

Obrigada pela confiança em me permitir fazer parte desse time.

RESUMO

O estabelecimento de uma camada híbrida adequada no canal radicular representa um dos principais desafios clínicos devido à dificuldade de acesso. Dessa forma, o uso de inibidores proteolíticos poderia tornar-se um recurso favorável. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de inibidores proteolíticos na união de pino de fibra de vidro fixado com cimento adesivo, considerando os terços radiculares e tempos distintos, por meio da resistência de união (RU). Cento e quarenta e quatro raízes bovinas foram selecionadas e divididas em 6 grupos de tratamento, e redivididas em 3 subgrupos de acordo com os tempos de avaliação de 24 horas, 6 e 12 meses (n=8). Após o tratamento endodôntico e desobturação padronizados, as raízes foram cimentadas com pinos de fibra de vidro cônicos (Exacto/Angelus). As raízes foram tratadas com sistema adesivo convencional de três passos, Adper Scotchbond Multipurpose/ 3M ESPE (SBMP) e cimento dual RelyX ARC/ 3M ESPE. Após prévia divisão, foram alocadas em grupos CN (Controle Negativo- sem pré tratamento associado), CP (Controle Positivo- com agentes ativador e catalisador), EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético a 17%), CHX (digluconato de clorexidina a 2%), E-5 (E-64 a 5 μM) e E-10 (E-64 a 10 μM). Após 24 horas, as raízes foram seccionadas perpendicularmente ao longo eixo e identificadas quanto à região, obtendo-se fatias de 1 mm de espessura (cervical, médio e apical), que foram armazenadas em saliva artificial para serem testadas. Todas as fatias foram submetidas ao teste de extrusão (*push-out*) na máquina de teste universal (Instron) com célula de carga de 50 N a 0,5 mm/min. Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA a três critérios e comparações múltiplas com Tukey, ambos com $p<0,05$. Após 24 horas, não se observou diferenças entre os tratamentos. Após 6 meses, a CHX demonstrou melhor desempenho, cujo efeito não se prorrogou até os 12 meses. O uso de inibidores proteolíticos não foram capazes de preservar a resistência de união dos pinos intrarradiculares até o tempo de 12 meses.

Palavras-chaves: Adesividade. Cimentos de resina. Inibidores enzimáticos. Pinos dentários.

ABSTRACT

Effect of proteolytic activity inhibitors on bond strength of glass-fiber post to radicular dentin up to 12 months

The adequate establishment of hybrid layer in the root canal on bonding process is still a clinical challenge due to its hard access. Thus, the use of proteolytic inhibitors could become a favorable tool. The aim of this study was to evaluate the effect of proteolytic inhibitors in the bonding of a glass- fiber post fixed with a luting cement, regarding the root thirds and different times through the bond strength. One hundred and forty four bovine roots were selected and divided into 6 treatment groups, and subdivided according to the time of evaluation of 24 hours, 6 and 12 months (n=8). After endodontic treatment and standardized removal procedure, the roots were cemented with tapered glass fiber posts (Exacto/ Angelus). The roots were treated with three-step etch-and-rinse adhesive system Adper Scotchbond Multipurpose/ 3M ESPE (SBMP) and dual cement RelyX ARC/ 3M ESPE. After previous division, CN (negative- control without pre associated treatment), CP (Control positive- with activator and catalyst agents) EDTA (17% ethylenediaminetetraacetic acid) CHX (2% chlorhexidine digluconate) E-5 (5μM E-64) and E-10 (10μM E-64). After 24h, the roots were sectioned perpendicular to the long axis and identified according to third in 1mm thick slices (cervical, middle and apical), which were stored in artificial saliva to be tested. All slices were subjected to extrusion tests (push-out) in the universal test machine (Instron) at 50 N load cell at 0.5 mm/min. Data were analyzed with three-way ANOVA and multiple comparisons with Tukey test, both with $p < 0.05$. After 24 hours, no differences were observed between treatments. After 6 months, CHX showed better performance, which did not last up 12 months. The proteolytic inhibitors performed differently in the bonding process over time; only CHX promoted inhibition at 6 months. The use of proteolytic inhibitors were not able to maintain the bond strength of intraradicular posts up time of 12 months.

Key-words: Adhesiveness. Resin Cements. Enzyme Inhibitors. Dental Pins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 - Foto em MEV da superfície externa do pino a ser utilizado apresentando superfície rugosa e com ranhuras. 36

Figura 2 e 3 - Manipulação das concentrações de E-64 a partir da solução estoque 38

Figura 4 - Desenho esquemático do posicionamento da fatia durante o teste. 42

Figura 5 - Análise das fraturas no tempo de 24h 49

Figura 6 - Análise das falhas no tempo de 6 meses 49

Figura 7 - Análise das falhas no tempo de 12 meses 52

- QUADROS

Quadro 1 - Distribuição dos grupos experimentais (n=10) 37

Quadro 2 - Comparação entre os inibidores 39

Quadro 3 - Composição dos materiais utilizados 40

Quadro 4 - Protocolo de cimentação para cada grupo 41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11

2 REVISÃO DE LITERATURA 17
2.1 Pinos de fibra de vidro 19
2.2 Cimentação de pinos 20
2.3 Atividade proteolítica de enzimas na dentina 22
2.4 Teste *push-out* ou de extrusão 28

3 PROPOSIÇÃO 29

4 MATERIAL E MÉTODOS 33
4.1 Delineamento experimental 35
4.2 Seleção das raízes 35
4.3 Preparo dos dentes 36
4.4 Distribuição das raízes tratadas nos grupos 37
4.5 Preparo das soluções de E-64 37
4.6 Preparo dos pinos e dos condutos 39
4.7 Teste de resistência de união (*Push-out*) 42
4.8 Conversão de valores 43
4.9 Análise do tipo de fratura 43
4.10 Análise estatística 43

5 RESULTADOS 45

6 DISCUSSÃO 51

7 CONCLUSÕES 61

REFERÊNCIAS 65

ANEXO 75

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os pinos de fibra de vidro se tornaram populares nos últimos anos, devido à capacidade de conciliar estabilidade física e química à estética e redução do tempo clínico na restauração de dentes tratados endodonticamente (FIGUEIREDO et al., 2015). Este desempenho favorável resultou essencialmente do módulo de elasticidade próximo à dentina e propriedades ópticas favoráveis (GERAMIPANAH et al., 2013; PEREIRA b et al., 2013; QUITERO et al., 2014, FIGUEIREDO et al., 2015). Entretanto, há a necessidade de serem fixados por um agente cimentante. Grande parte das falhas clínicas decorre das limitações na preservação da durabilidade da interface adesiva na dentina (BERGOLI et al., 2012). Desta forma, a linha de cimentação se torna um desafio clínico constante, pois sempre estará exposto às características intrínsecas do substrato dentário (CHERSONI et al., 2005; FABRE et al., 2007).

Com o intuito de reter satisfatoriamente estes materiais ao substrato dentário e ao mesmo tempo suprir a exigência estética, os cimentos adesivos resinosos constituem-se em fundamental recurso na clínica odontológica contemporânea (FIGUEIREDO et al., 2015). Porém, perdem sua estabilidade de união à dentina independente do sistema adesivo empregado ao longo do tempo. Nesse propósito, os sistemas adesivos possuem monômeros hidrofílicos para promover maior compatibilidade com o substrato úmido (CHERSONI et al., 2005; PASHLEY et al., 2011, WANG et al., 2013; DE ARAÚJO et al., 2014). Por outro lado, esses monômeros sofrem sorção de água que potencializa a degradação hidrolítica (CHERSONI et al., 2005; BONFANTE et al., 2008). Simultaneamente, ocorre a desestruturação da matriz do colágeno pobremente infiltrada pela ação promovida pelas enzimas proteolíticas intrínsecas da dentina, como as metaloproteinases (MMPs) (NISHITANI et al., 2006; SANTOS et al., 2009; LINDBLAD et al., 2012; SCAFFA et al., 2012; TJÄDERHANE et al., 2013; WANG et al., 2013; DE ARAUJO et al., 2014).

Agindo sinergicamente às MMPS, outra classe de proteases capazes de degradar componentes da matriz extracelular são as enzimas semelhantes à papaína chamadas de císteíno-catepsinas (CCs) (NASCIMENTO et al., 2011;

SCAFFA et al., 2012; VIDAL et al., 2014). As CCs, da mesma forma que as MMPs são ativadas quando a dentina é exposta a um meio ácido, como pela ação das bactérias cariogênicas, pelo condicionamento ácido prévio às restaurações adesivas ou em processos erosivos (HEBLING et al, 2005; CARRILHO et al., 2010; SCAFFA et al., 2012; VIDAL et al., 2014). O meio ácido promove a remoção dos minerais, responsáveis por essa proteção da matriz. Nesta condição, as enzimas são capazes de destruir as fibrilas de colágeno desprotegidas que não foram encapsuladas pelo adesivo (IMBERY et al., 2012). Depois de ativadas, as MMPs e CCs endógenas tem papel fundamental na degradação da camada híbrida (MAZZONI et al., 2012) através de atividade proteolítica cálcio e zinco-dependentes (HEBLING et al., 2005; SCAFFA et al., 2012; Mazzoni et al. 2012, VIDAL et al., 2012), clivando a trama de colágeno pouco infiltrada por resina (HEBLING et al., 2005; MAZZONI et al., 2012).

Apesar das evidências científicas indicarem êxito no uso de sistemas adesivos duais no conduto radicular (THITTHAWEERAT et al., 2012; EBRAHIMI et al., 2014), a utilização de adesivos convencionais de dois ou três passos representa uma condição frequentemente utilizada na clínica, sendo testadas *in vitro* (BERGOLI et al., 2012, LINDBLAD et al., 2010; LINDBLAD et al., 2012; PEREIRA a et al., 2013; WANG et al., 2013; DE ARAUJO et al., 2014). Com estes sistemas, a clorexidina tem sido aplicada após o condicionamento ácido, agindo como inibidor das enzimas proteolíticas (HEBLING et al., 2005; CARRILHO et al., 2010; ZHENG et al., 2014). Além da substantividade da clorexidina,, a propriedade catiônica dos íons cálcio é o que provavelmente mantém a enzima proteolítica inativa (CARRILHO et al., 2010). Neste propósito, o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), que comumente é utilizado como irrigante em procedimentos endodônticos, também tem sido considerado inibidor de MMPs, uma vez que tem o poder de quelar o cálcio. (THOMPSON et al., 2012). O E-64 é considerado um inibidor específico de CCs por utilizar um grupo epóxido para se ligar covalentemente no local ativo do pró peptídeo (TURK; GUNCAR, 2003). Apesar desta propriedade, nenhum trabalho utilizando-o durante um procedimento clínico foi desenvolvido. A utilização deste inibidor no conduto além de testar a manutenção da camada híbrida, pode trazer evidências do real papel dessa família proteolítica nessa região. Esse conhecimento poderá contribuir à era degradômica, em que se ressalta a importância do entendimento do

papel das diferentes enzimas proteolíticas para possíveis novos tratamentos conservadores e efetivos (TJÄDERHANE b et al., 2015).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi investigar a utilização de diferentes inibidores enzimáticos na resistência de união de pino de fibra de vidro ao conduto radicular, utilizando um sistema adesivo associado a cimento resinoso dual, em relação aos terços radiculares e ao tempo.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pinos de fibra de vidro

Os pinos de fibra foram introduzidos como alternativa aos pinos metálicos pré-fabricados (ASMUSSEM et al., 1999). Inicialmente, os pinos de fibra de carbono de coloração escura foram os primeiros pinos de fibra a serem desenvolvidos (GORACCI; FERRARI, 2011; LAMICHHANE et al., 2014). Na sequencia, estes recursos se apresentaram mais translúcidos à base de fibra de quartzo, vidro ou sílica-zirconia, embebidos em resina epóxi; e são preferidos por transmitirem a luz até a região apical o que facilita a fotopolimerização em toda a extensão do canal (CHELEUX; SHARROCK, 2009). Esses pinos representam uma boa opção clínica, com resultados favoráveis, apesar de ainda encontrar algumas limitações (GRANDINI et al., 2005).

A espessura das paredes radiculares pode se torna mais fina após o tratamento endodôntico. Em casos de uma restauração intracanal caso ocorra uma fratura no terço apical, devido ao difícil acesso, essa fratura pode ser considerada catastrófica condenando o dente. Quando pinos metálicos ou núcleos fundidos são utilizados a chance de acontecer esse tipo de fratura é maior do que quando se utiliza um material que tenha um módulo de elasticidade mais parecido com a dentina como os pinos de fibra de vidro (MARTELLI et al., 2008; GERAMIPANAH et al., 2013; PEREIRA b et al., 2013; QUITERO et al., 2014; FIGUEIREDO et al. 2015).

Além das propriedades ópticas mais interessantes dos pinos de fibra de vidro e seu módulo de elasticidade mais próximo ao da dentina, sua indicação se ampliou por sua utilização estar associada aos sistemas adesivos que passavam por uma evolução significativa (BRESCHI et al., 2008; PAPADIOCHOU et al., 2015).

A cimentação permite uma ação conjunta pino e raíz, com o intuito de funcionar como um sistema. Apesar deste conceito, trabalhos ainda demonstram falta de consenso. Cheleux e Sharrock em 2009 por exemplo, observaram espaços vazios na matriz de resina de vários pinos. Estes autores destacaram que os defeitos interfaciais são difíceis de quantificar, mas facilmente detectado em secções

longitudinais, contribuindo drasticamente para o aumento de fraturas coesivas. Contudo, na prática clínica, o desempenho será também dependente de outros fatores, tais como vedação adequada e adaptação à geometria do canal radicular do paciente, bem como conformidade com a distribuição de tensão uniforme de forças oclusais na estrutura dental remanescente.

Trabalhos como de Figueiredo et al. em 2014 também demonstraram que apesar do avanço do sistema resinoso, este não pode ser unicamente responsável pelo sucesso da fixação e desempenho do pino. Estes autores não verificaram maior resistência dos pinos de fibra de vidro em incidências de fraturas quando comparados com núcleo metálico fundido. Os autores atribuíram as observações pelo fato da cimentação intracanal ser mais sensível às falhas devido à fatores como um grau de umidade com maior variação durante procedimentos adesivos, configuração cavitária e fator C desfavoráveis e dificuldade de acesso ao procedimento adesivo (MAZZITELI et al., 2008).

Por este motivo, os autores destacam a relevância da escolha de um sistema resinoso menos sensível e a necessidade da tentativa de melhorar a adesão intracanal para obter longevidade adequada dessas restaurações.

2.2 Cimentação de pinos

Para a cimentação tanto de pinos ou de outras restaurações indiretas há no mercado odontológico inúmeras opções disponíveis (CHAVES, 2008; CHAVES et al., 2012; PEREIRA a et al., 2013; PEREIRA b et al., 2013; PEIXOTO et al., 2015). Os cimentos de fosfato de zinco foram considerados os mais populares durante muitos anos (FERRARI et al., 2004), mesmo com suas desvantagens de falta de adesão (PEGORARO; SILVA; CARVALHO, 2007) e degradação progressiva das fibrilas de colágeno, que no entanto ainda se apresentam como uma opção simples e viável (FERRARI et al., 2004).

Cimentos de ionômero de vidro também podem ser utilizados como recurso cimentante, uma vez que são autoadesivos através de união química com a estrutura dentária (THEAN; MOK; CHEW, 2000; PEREIRA a et al., 2013). A

reconhecida capacidade de liberação e recarga de flúor torna sua utilização interessante podendo adicionalmente minimizar a reincidência de cárie. (PALMA-DIBB et al., 2003) Em contrapartida, esse material apresenta acentuada expansão hidroscópica (CHAVES, 2008; CHAVES et al., 2012; CURY et al., 2006) que o solubiliza e diminui sua resistência friccional (CURY et al., 2006)

Os cimentos resinosos atualmente são os mais populares, pois além da promoção da adesão, oferece uma variedade de cores e menor solubilidade (FERRACANE; STANSBURY; BURKE, 2011). Comumente, os cimentos resinosos são baseados no uso de condicionamento ácido/lavagem e aplicação de adesivos seguido de um compósito resinoso de baixa viscosidade (DE MUNK et al., 2004). Esta propriedade permitiria melhor escoamento do material de fixação, preenchendo melhor os espaços e reduzindo a interferência do assentamento de pinos ou restaurações indiretas (GORACCI et al., 2004).

Entre todas as classificações de cimentos que podem ser utilizados, quando o cimento resinoso dual é escolhido, se faz necessária a utilização de sistemas adesivos anteriormente à cimentação. Diferentes sistemas, de acordo com a forma de polimerização, podem ser usados neste propósito: fotoativados, autoativados e de presa dual.

Quando adesivos fotopolimerizáveis são utilizados, estes seguem o protocolo similar às restaurações coronárias: após o condicionamento ácido, é realizada a lavagem, remoção de excesso de umidade, aplica-se primer, adesivo seguido da fotopolimerização (PERDIGÃO; LOPES, 1999). Adesivos autocondionantes também são utilizados suprimindo-se o condicionamento ácido, seguindo com a aplicação e a fotopolimerização do sistema adesivo (VAN MEERBEECK et al., 2005). Além das várias etapas operacionais do processo adesivo, outro fator preocupante diz respeito à promoção de adequada polimerização do adesivo e do cimento resinoso (ABOU-ID et al., 2012; YOSHIKAWA et al., 2016;). Quanto mais distante da fonte de luz, maiores as chances de polimerização incompleta, com áreas de fibrilas de colágeno não encapsuladas pelo sistema adesivo, o que facilita a ação das enzimas proteolíticas (TJÄDERHANE et al., 2013). O baixo grau de conversão consequente a essa inadequada fotopolimerização disponibiliza monômeros não convertidos (EBRAHIMI et al., 2014).

A propagação de luz ao longo do canal, mesmo quando utiliza-se pinos translúcidos, não acontece de maneira uniforme da região cervical à apical (QUITERO et al., 2014). Por isso sistemas de presa duais foram desenvolvidos para minimizar este impacto negativo, incluindo também a formulação de sistemas adesivos com esta forma de presa (LEME et al., 2011; ABOU-ID et al., 2012; PEREIRA a et al., 2015). Neste direcionamento, geralmente o fabricante disponibiliza um frasco a parte com iniciadores para ser aplicado em conjunto com o respectivo adesivo. Os sistemas possuem um frasco de ativador e outro de catalisador para opção de cimentações duais. Quando utilizados os adesivos duais, o intuito é de promover maior resistência de união na região apical, quando comparados com os adesivos fotoativados, devido à baixa intensidade de luz que chega nessa região (BALBOSH et al., 2006; OHLMANN et al., 2008; ABOU-ID et al., 2012; THITTHAWEERAT et al., 2012; EBRAHIMI et al., 2014).

Independente da classificação do adesivo utilizado, a força de união diminui da região coronal à apical, em parte devido à diminuição da densidade e do diâmetro dos túbulos dentinários na região apical (SOARES et al., 2008, LEME et al., 2011; EBRAHIMI et al., 2014). Ao se tratar de restaurações radiculares, as limitações da adesão se tornam mais críticas, devido à maior variação do grau de umidade com maior variável durante procedimentos adesivos, configuração cavitária e fator C desfavoráveis, além de dificuldade de acesso ao procedimento adesivo (MAZZITELI et al., 2008). Esses fatores potencializam os problemas no processo adesivo.

2.3 Atividade proteolítica de enzimas na dentina

As metaloproteinases (MMPs) são enzimas Zn^{+2} e Ca^{+2} dependentes com atividade proteolítica importante para o funcionamento normal de qualquer organismo e deve ser rigorosamente controlado para evitar o excesso de degradação proteolítica (TURK; GUNCAR, 2003), porque coletivamente são capazes de degradar praticamente todos os componentes da matriz extracelular. A falência do controle das atividades proteolíticas causa um grande espectro de doenças, entre elas câncer, doença de Alzheimer, distrofia esclerótica muscular múltipla e artrite (TURK; GUNCAR, 2003). Nos humanos se apresentam como uma

família de 23 enzimas *mammalian* (TURK; GUNCAR, 2003) divididas em seis grupos baseado na sua especificidade: colagenases, gelatinases, estromelisinas, matrilisinas, MMPs tipo membrana e outras MMPs, mas podem apresentar duas funções combinadas (TJÄDERHANE b et al., 2015). Na Odontologia, as enzimas proteolíticas tem papel fundamental no desenvolvimento do complexo dentina-polpa e remodelação (TJÄDERHANE et al., 1998; HANNAS et al., 2007; TERSARIOL et al. 2010), formando a matriz orgânica dentinária que consiste principalmente de colágeno tipo I, juntamente com proteínas não colágenas, tais como glicoproteínas, proteoglicanos e fosfoproteínas. (TJÄDERHANE et al. 1998).

As MMPs também estão envolvidas na progressão de lesões de cárie, potencializando a ação bacteriana que degrada a matriz orgânica de dentina cariada (TJÄDERHANE a 2015, TJÄDERHANE b et al., 2015). Recentemente, evidências apontam que essa progressão é mediada principalmente por MMPs (TJÄDERHANE b et al., 2015). Na dentina, embora as enzimas proteolíticas identificadas e estudadas mais intensamente correspondam ao papel das MMPs, as cisteíno-catepsinas (CCs) também vêm sendo evidenciadas pela sua atividade de degradação do colágeno, contribuindo para progressão de lesões cariosas (NASCIMENTO et al., 2011). São encontradas em dentina sadia (VIDAL, 2012; VIDAL et al., 2014) e sua atividade na dentina cariada aumenta quanto mais profunda sua localização (NASCIMENTO et al., 2011) e próxima da polpa (TERSARIOL et al, 2010; NASCIMENTO et al., 2011), indicando sua importância nas lesões cariosas.

Dentre inúmeras MMPs e CCs identificadas, as que se apresentam em tecido dentário sadio e cariado são MMP -1, -2, -3, -8, -9 e -20. Entre as CCs CC-B e CC-K (VIDAL, 2012). As CCs tem peso molecular entre 22 e 28 kDa, com exceção da CC-C que tem peso molecular de 200 kDa. Todas apresentam estrutura básica similar (TURK; GUNCAR, 2003). Acredita-se que as MMPs e CCs apresentam atividade sinérgica e adicional, (NASCIMENTO et al., 2011; VIDAL et al., 2014), porém com papéis distintos na atividade proteolítica (TERSARIOL et al., 2010), uma vez que, por exemplo, atuam em diferentes pHs. Após ativadas em pH ácido em torno de 2,5 – 4,5, o pH ótimo para a CC-K atuar é em torno de 5 e para as MMPs o pH ótimo é de aproximadamente 7 (MAZZONI et al., 2015). Nas lesões cariosas, a expressão das CCs pode ser favorecida, uma vez que constantemente o pH se torna ácido,

intercalando com a atividade proteolítica das MMPs quando a remineralização ocorre (MAZZONI et al., 2015). A CC K é a única catepsina capaz de quebrar a tripla hélice de colágeno pela atividade colagenolítica. Mesmo que o mecanismo de remodelação óssea não esteja ainda totalmente elucidado, acredita-se que, no pH ácido, a CC K inicie a atividade colagenolítica degradando a tripla hélice e depois, quando o pH se neutraliza, as MMPs continuam a atividade colagenolítica (EVERTS et al., 1998). Essa ideia é hipotetizada que se acontece também em dentina, pois através de diferentes mecanismos de extração foi comprovada a presença de ambas as classes de enzimas proteolíticas com atividade (VIDAL et al., 2014).

MMPs são sintetizadas e secretadas como proenzimas inativas (Zimogênios), os quais o prodomínio previne a atividade do domínio catalítico. A ativação ocorre quando a ponte de zinco com o prodomínio é quebrada por outras MMPs, cisteína catepsinas ou outras proteinases, ou por mudanças do pH (TJÄDERHANE b et al., 2015). As CCs também são sintetizadas como proenzimas inativas, e, de forma similar às MMPs, são ativadas quando a dentina experimenta um meio ácido, como pela ação das bactérias cariogênicas, pelo condicionamento ácido prévio às restaurações adesivas ou ainda quando há erosão dental (IMBERY et al., 2012; MAZZONI et al., 2012; TJÄDERHANE a, 2015; TJÄDERHANE b et al., 2015). O meio ácido promove a remoção dos minerais, responsáveis por essa proteção da matriz, facilitado a destruição das fibrilas de colágeno desprotegidas que não foram encapsuladas pelo adesivo (IMBERY et al., 2012). Depois de liberadas, as MMPs e CCs endógenas tem papel fundamental na degradação da camada híbrida criada pelos adesivos (MAZZONI et al., 2012) ou na progressão da lesão cariosa (TJÄDERHANE b et al., 2015) através de atividade proteolítica podendo esta ser, gelatinolítica, colagenolítica ou ambas (HEBLING et al., 2005; SCAFFA et al., 2012; VIDAL, 2012) clivando a trama de colágeno pouco infiltrada por resina (HEBLING et al., 2005). As MMPs identificadas na degradação da camada híbrida são -2 e -9 (MAZZONI et al., 2012) e na progressão da lesão da cárie -2, -8, -9.

Muitos trabalhos em andamento tem investigado a preservação da integridade da matriz de colágeno com a finalidade de preservar a durabilidade da adesão em dentina (CARRILHO, 2010; TJÄDERHANE et al., 2013; TJÄDERHANE a, 2015; TJÄDERHANE b et.al, 2015). O entendimento da natureza da degradação da interface dentina-adesivo já promoveu uma melhora significativa no desempenho

dos adesivos, direcionando ao uso de agentes mais resistentes e/ou que inibam as atividades proteolíticas (TJÄDERHANE et al., 2013).

A atividade de MMP na dentina pode ser reduzida por inibidores endógenos e exógenos. Inibidores endógenos são originários à partir de diferentes células humanas, enquanto os inibidores exógenos são sintetizados como agentes terapêuticos (MAZZONI et al., 2015). A maioria destes inibidores age por quelação com cálcio ou substituem os íons zinco no sítio ativo e/ou interagem com o fragmento de propeptídio da MMP, enquanto outros podem impedir o acesso e inibir a atividade de MMP pelo revestimento do substrato (MAZZONI et al., 2012; TJÄDERHANE et al., 2013). Os inibidores estudados são vários, entre eles clorexidina, EDTA, tetraciclina, galardina, cloreto de benzalcônio, dimetilsulfóxido e flúor (KATO et al., 2014; MAZZONI et al., 2015; TJÄDERHANE a 2015; TJÄDERHANE b et.al, 2015).

O inibidor proteolítico mais utilizado é a clorexidina (HEBLING et al., 2005; CARRILHO et al., 2010; LINDBLAD et al., 2010; CECHIN et al., 2011; DI HIPÓLITO et al., 2012; LINDBLAD et al., 2012; WANG et al., 2013; DE ARAUJO et al., 2014; MONTAGNER et al., 2014; TJÄDERHANE 2015). Sua principal propriedade é caracterizada pelo potencial antibacteriano de largo espectro, além dos efeitos benéficos na preservação da união adesiva, tendo inibição significante da atividade de MMPs e cisteíno-catepsina (SCAFFA et al., 2012). A efetividade da clorexidina como um agente antibacteriano e antiproteolítico tem sido relacionada em parte com sua substantividade às estruturas bucais (CARRILHO et al., 2010). A substantividade, ou sua habilidade de ficar retida na matriz dentinária permitiria sua ação prolongada de inibição, liberando este agente em um intervalo de tempo maior, permitindo manter a camada híbrida de forma favorável, apesar de sua inespecificidade (CARRILHO et al., 2010; SCAFFA et al., 2012). Além da substantividade, a propriedade catiônica dos íons cálcio é o que provavelmente mantém a enzima proteolítica inativada (CARRILHO et al., 2010).

Neste sentido, a atuação da clorexidina na dentina radicular também tem sido alvo de investigação para verificar se também contribui para a manutenção da integridade da união nesta região (LINDBLAD et al., 2010; DI HIPÓLITO et al., 2012; ARAÚJO et al. 2014; WANG et al., 2013), mas esse conhecimento ainda recai

essencialmente sobre a ação de MMPs. O papel das CCs nesta condição ainda é pouco conhecida, apesar de sugerir sua atividade proteolítica em dentina por diversos estudos (TERSARIOL et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2011; VIDAL, 2012).

A clorexidina corresponde a uma molécula simétrica que apresenta duas moléculas ionizáveis que age como cátion em pH fisiológico (CARRILHO et al. 2010). Na Odontologia, seu emprego como inibidor não específico de MMPs e CCs tem sido efetivo (SCAFFA et al. 2012; VIDAL et al.2014; TJÄDERHANE b et al. 2015). Além da sua indicação como agente de limpeza, tais evidências tem estimulado seu uso como inibidor nos procedimentos clínicos, conciliando também sua facilidade técnica de uso e baixo custo (BRESCHI et al. 2009; SCAFFA et al. 2012). A utilização de um inibidor não específico atua através de efeitos acumulativos (CARRILHO et al., 2010). Inibidores podem, através de ligações covalentes, se ligar com o sítio ativo ou através de interações eletrostáticas com grupos carboxílicos carregados negativamente ou positivamente (TURK; GUNCAR, 2003). Quando um inibidor específico é utilizado, ele interage com a região em ambos os lados do local reativo, sendo vantajoso (TURK; GUNCAR, 2003).

O EDTA foi utilizado nesse estudo como inibidor porque rotineiramente é utilizado na irrigação de canais durante o tratamento endodôntico para remoção da *smear layer* (ZIA et al., 2014; EKIN; EDERMIR, 2015; IRIBOZ et al., 2015) e possui atividade inibitória das MMPs, pois, ao desmineralizar, o EDTA quela Ca^{++} e Zn^{++} da dentina mineralizada, e desta forma, exerce a inativação dessas enzimas (THOMPSON et al., 2012). Mesmo não sendo o inibidor específico das MMPs, vários estudos tem utilizado esse quelante como seu inibidor (NASCIMENTO et al., 2011, OZCAN et al., 2015; CHANDRASE; KARAN et al., 2016).

O E-64 é um agente inibidor retirado de complexas estruturas como as enzimas cisteíno-catepsina K e papaína (TURK; GUNCAR, 2003). Este agente foi previamente relatado em pesquisas na medicina na tentativa de controlar doenças degenerativas, sendo sugerido em várias pesquisas para controle de doenças (TOLDE et al., 2010; QU et al., 2015; ARZANLOU, 2016). Com base no princípio da inibição da ação proteolítica, este agente também foi introduzido no tratamento da dentina (NASCIMENTO et al., 2011; SCAFFA et al., 2012). Com perspectivas

interessantes, Scaffa et al., 2012 sugeriram capacidade semelhante a CHX, podendo ser utilizado em conjunto com os procedimentos de adesão. Os trabalhos já conduzidos (NASCIMENTO et al., 2011; SCAFFA et al., 2012; GIACOMINI, 2015) e outros em andamento tem sido utilizados para testar as hipóteses da atuação das CCs e sua inativação, sendo que a resistência de união poderia contribuir nesta análise de forma aplicada.

As CCs são sintetizadas como pré-pró-peptídeos, sendo que o pré-petídeo é removido quando essas enzimas são enviadas ao retículo endoplasmático. Já a ativação da enzima ocorre quando o pró-peptídeo é removido, o que pode acontecer pela ação de outras proteases ou por um mecanismo de autoativação em pH ácido. O mecanismo de ação do seu inibidor, o E-64, é através de um grupo epóxido que interage covalentemente com a cisteína no sítio ativo, o pró-peptídeo. (TURK; GUNCAR, 2003).

A ideia de uso de um inibidor específico para as CCs neste caso pode contribuir com informações relevantes de sua participação nos processos da degradação (TURK; GUNCAR, 2013). Neste intuito, Giacomini em 2015 se propôs a verificar a ação de um inibidor especifico da CC, o E-64 na resistência de união em restaurações adesivas à dentina normal, erodida e cariada. Essas duas últimas situações foram simuladas para favorecer a desmineralização e oportunizar a ação da atividade proteolítica. Por meio desta análise, apenas a dentina cariada demonstrou resistência de união reduzida, o que sugere que este substrato, mesmo simulado artificialmente possa ter produzido alterações mais significativas e podendo ter estimulado maior ação enzimática, uma vez que nem mesmo a clorexidina e/ou E-64 puderam conter a redução da resistência.

De acordo com o fabricante Sigma Aldrich®, as concentrações de E-64 seguras e efetivas a serem utilizadas variam de 1 a 10 μM. Porém, a menor concentração relatada na literatura como eficaz no propósito é de 5 μM, baseado em estudos realizados por Tersariol et al. 2010 e Nascimento et al. 2011 ao avaliar a atividade proteolítica dessas enzimas. Há poucos estudos indicando a concentração utilizada especificamente, tampouco na concentração a ser utilizada durante procedimentos adesivos à dentina.

A descoberta da presença, identificação e atividade das enzimas colagenolíticas endógenas marcou o início da era da dentina degradômica. A evidência do papel dessas enzimas na degradação do colágeno da dentina ainda está em crescimento. Há necessidade de melhor entendimento do processo em que ocorre para o processo restaurador ter maior benefício com sua inibição (TJÄDERHANE b et al. 2015).

2.4 Teste *push-out* ou de extrusão

Com a intenção de diminuir as falhas de deslocamentos de pinos na região intrarradicular e prolongar a longevidade dos dentes restaurados com esse artifício, estudos são conduzidos para investigar quais tratamentos da superfície do pino e do substrato dentário providenciam maior durabilidade clínica (SOARES et al., 2008; ZICARE et al., 2012).

A efetividade de diferentes cimentos resinosos disponíveis no mercado e a interação com estratégias clínicas nos procedimentos radiculares também são alvo de investigação (SILVA, 2009; BERGOLI et al., 2012). A influência do desempenho considerando o terço radicular, também é um fator relevante na análise, sendo geralmente maior no terço cervical e menor no terço apical (SILVA, 2009). Este comportamento decorre essencialmente da maior facilidade de controle dos aspectos do processo de adesão somado a menor distancia da fonte polimerizadora na região cervical. Desta forma, os fatores que podem interferir no processo adesivo do pino no interior do conduto radicular são comumente testados com o teste *push-out*, com resultados comparativos confiáveis (GORACCI et al., 2004; SOARES et al., 2008). Por este teste, promove-se a indução de estresse entre a dentina-cimento e também na interface pino-cimento, comparável com as condições clínicas, e ao utilizar teste de microtração no caso da dentina radicular, pode-se promover mais faclmente falhas prematuras (GORACCI et al., 2004).

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo *in vitro* teve como objetivo avaliar comparativamente diferentes estratégias no procedimento adesivo, sobretudo visando o efeito inibitório de atividades de enzimas proteolíticas da dentina radicular.

As hipóteses nulas propostas foram de que:

1- Não há diferença de resistência de união com o uso de inibidores de atividade proteolítica em dentina radicular;
2- Não há diferença de resistência de união considerando os terços radiculares cervical, médio e apical;
3- Não há diferença de resistência de união considerando os diferentes tempos de armazenagem.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental deste trabalho *in vitro* envolveu 3 fatores: 1- tratamento em 6 níveis: CP- controle positivo (associado aos componentes ativador e catalisador), CN- controle negativo (associado ao primer e adesivo apenas), CHX – ARC associado a solução de digluconato de clorexidina a 2%, EDTA- ARC associado a solução de EDTA a 17%, E5 - E-64 na concentração de 5 µM, E10 – E-64 na concentração de 10 µM; 2- terço radicular (3 níveis – cervical, médio e apical) e 3- tempo de armazenagem (3 níveis – 24 horas, 6 meses e 12 meses). A variável de resposta foi o teste de resistência de união por extrusão (*push-out*).

4.2 Seleção das raízes

Cento e quarenta e quatro raízes bovinas foram selecionadas, mantidas e renovadas em timol a 0,1%. Uma análise prévia das dimensões mésio-distal e de comprimento original foi realizada, permitindo a seleção de unidades similares, que apresentaram condutos cilíndricos e de diâmetro compatível com o pino utilizado. As porções coronárias foram descartadas com corte na região cervical de forma perpendicular ao longo eixo do dente, utilizando um disco diamantado dupla face sob irrigação constante, em aparelho de corte de precisão Isomet Low Speed Saw (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). Ao final desta secção, as raízes apresentaram comprimento radicular padronizado de 17 mm. Em seguida, estas foram limpas com curetas de raspagem periodontal e pasta de pedra pomes com escova de Robinson e então armazenadas em água deionizada.

4.3 Preparo dos dentes

O tratamento endodôntico das raízes foi realizado com limas tipo Kerr (Maillefer-Dentsply, Ballaigues, Switzerland) até o instrumento memória 45 com padronização do comprimento de trabalho em 16 mm. Os canais foram irrigados com água deionizada e secos com cones de papel absorvente (Tanari, Manacapuru, AM, Brasil). Posteriormente, foram obturados com cones de guta-percha (Tanari, Manacapuru, AM, Brasil) e cimento à base de hidróxido de cálcio (Sealer 26 – Dentsply, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), pela técnica de condensação lateral.

Após 24 horas, os condutos foram desobturados para preparação do espaço necessário para a cimentação do pino, que consistiu em um pino nº 2 de formato cônico, com superfíce rugosa e com ranhuras (Exacto, Angelus, Londrina, PR, Brasil) (Figura 1).

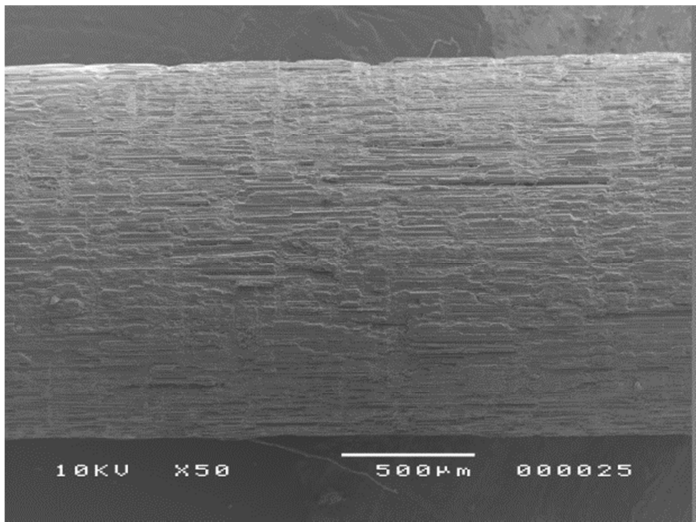


Figura 1: Foto em MEV da superfície externa do pino a ser utilizado apresentando superfície rugosa e com ranhuras

O processo de desobturação foi realizado com a broca de 1,5 mm de diâmetro, que acompanha o kit de pinos e corresponde ao diâmetro do pino utilizado, a um comprimento de 13 mm deixando 3 mm de selamento apical.

4.4 Distribuição das raízes tratadas nos grupos

Em seguida, as raízes foram aleatoriamente distribuídas em grupos de acordo com o tratamento do conduto e tempo de armazenamento, conforme descrito no quadro 1.

Quadro 1: Distribuição dos grupos experimentais (n=10)

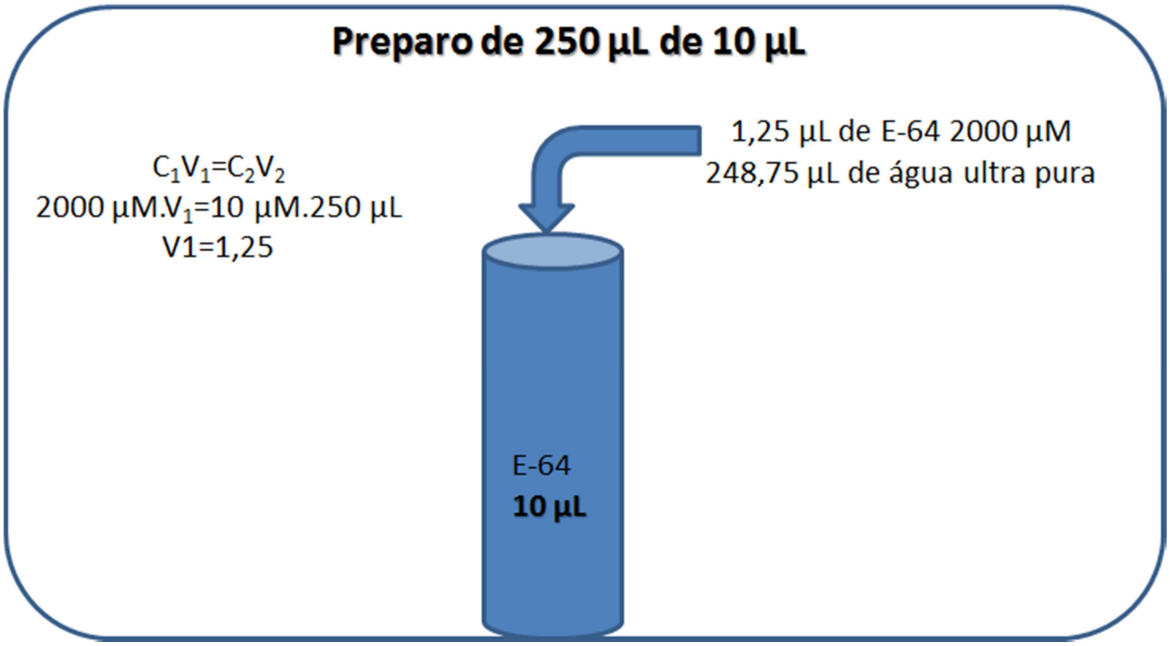
Material	Tratamento com inibidores	Tempo
RelyX ARC(ARC) + Adper Scotchbond Multipurpose (MP)	(CP) Controle positivo–com ativador + catalisador	24 horas
		6 meses
		12 meses
	(CN) Controle negativo–primer e adesivo	24 horas
		6 meses
		12 meses
	(CHX) Clorexidina 2%	24 horas
		6 meses
		12 meses
	(EDTA) EDTA	24 horas
		6 meses
		12 meses
	(E-5) E-64 5μM	24 horas
		6 meses
		12 meses
	(E-10) E-64 10μM	24 horas
		6 meses
		12 meses

4.5 Preparo das soluções de E-64

A partir do reagente E-64 (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) foi preparada uma solução estoque de 2 mM para um volume de 500 μL final. Para determinar a quantidade de massa utilizada, foi utilizada a fórmula C= m/PM.V; sendo, C= concentração, m= massa, PM= peso molecular e V= volume em litro.

A partir dessa solução estoque, foram realizados os cálculos para atingir as concentrações de 5 μM e 10 μM (Figuras 2 e 3). Para evitar vários descongelamentos e garantir a conservação da solução, foram divididos em vários frascos do tipo *eppendorf* com 1,25 μL de E-64 a 2000 μM e em outros frascos de

125 µL de E-64 a 10 µM. Assim, em cada utilização dessas concentrações, um *eppendorf* de cada concentração foi retirado do congelador e acrescentado 248,75µL de água ultrapura no frasco a ser manipulado E-64 a 10 µM e 125 µL no frasco a ser manipulado E-64 5µM.



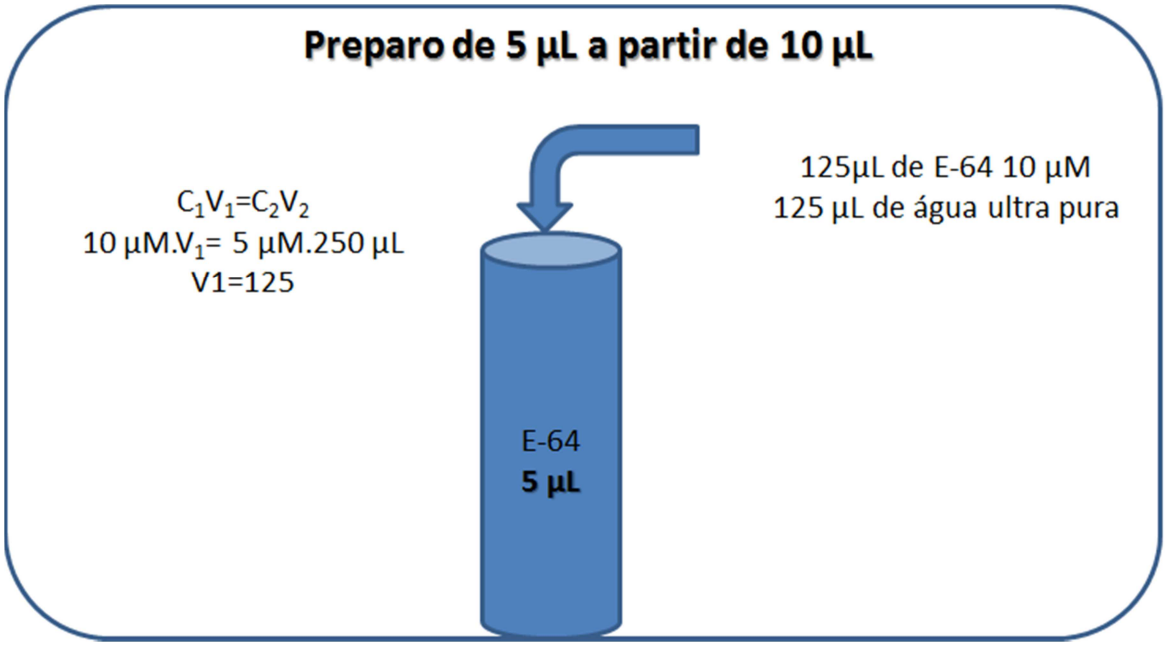


Figura 2 e 3 – Manipulação das concentrações de E-64 a partir da solução estoque.

4.6 Preparo dos pinos e dos condutos

Os pinos de fibra de vidro foram limpos com ácido fosfórico e posteriormente silanizados (Primer silano – Angelus, Londrina, PR, Brasil), deixando secar por um minuto e posterior aplicação do adesivo e fotopolimerização.

As características dos inibidores estão descritas no quadro 2 e as características do cimento utilizado e os protocolos de cimentação utilizados estão descritos nos quadro 3 e 4, respectivamente.

Quadro 2 – Comparação entre os inibidores

Características	**Digluconato de clorexidina**	**E-64**	**EDTA**
Fabricante	FGM, Joinville, SC, Brazil	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	Biodinâmica, Londrina, PR, Brazil
Fonte inicial	Líquido	Pó	Líquido
Aparência	Líquido claro, amarelado	Pó branco	Líquido claro
Fórmula Molecular	$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$-$2C_5H_{12}O_7$	$C_{15}H_{27}N_5O_5$	$C_{10}H_{16}N_2O_8$
Peso Molecular	897,8	357,4	292,24
Solúvel em água	Sim	Sim	Sim
Lote	643213 02-2015	081 12- 2015	1219/12 10- 2015
pH	5,5	5,5	7,5

* Grupos do E-64 foram manipulados em laboratório. EDTA e CHX foram disponibilizadas comercialmente.

Quadro 3: Composição dos materiais utilizados

Material	Fabricante	Composição	Classificação
RelyX ARC (ARC)	3M ESPE, St Paul, MN, EUA	Sílica tratada com silício, dimetacrilato de 2,2 etilenodioxidietilo, metacrilato de bisfenol diglicidil, éter, polímero dimetacrilato funcionalizado	Cimento resinoso dual
Adper Scotchbond Multipurpose (MP)	3M ESPE, St Paul, MN, EUA	2- hidroxietilmetacrilato (HEMA), ácido polialcenóico	Primer
		Bisglicidilmetacrilato (Bis - GMA), 2- hidroxiethilmethacrilato (HEMA), aminas, peroxido	Adesivo
		Solução etílica de um sal de ácido sulfínico e um componente fotoiniciador	Ativador
		Bis-GMA, HEMA e peróxido de benzoíla	Catalisador

Fonte: Informações do fabricante

Quadro 4: Protocolo de cimentação para cada grupo

Tratamento da dentina	**Protocolo de cimentação**
CP:ácido fosfórico 37% por 15s; sistema adesivo (Adper ScotchBond Multipurpose) – ativador, primer , catalisador	Manipulação do cimento resinoso RelyX ARC por 10s; cimento foi levado ao conduto manualmente com uma broca lentulo e colocado no pino em excesso; remoção do excesso; fotoativação por 40s com o fotopolimerizador Radii cal (SDI – Bayswater, Victoria, Austrlia) com 1200mW/cm^2.
CN: ácido fosfórico 37% por 15s; sistema adesivo (Adper ScotchBond Multipurpose) – primer + adesivo (fotoativação por 20s)	
CHX: aplicação de digluconato de clorexidina 2% (Maquira Dental Produts, Maringá, PR, Brasil) por 30s após aplicação do ácido; secagem com cones de papel absorvente; sistema adesivo conforme CN.	
EDTA: aplicação de EDTA (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil) por 30s após aplicação do ácido; secagem com cones de papel absorvente; sistema adesivo conforme CN.	
E-5: aplicação E-64 a 5µM por 30s após aplicação do ácido; secagem com cones de papel absorvente; sistema adesivo conforme CN.	
E-10: aplicação de E-64 a 10µM por 30s após aplicação do ácido; secagem com cones de papel absorvente; sistema adesivo conforme CN.	

Após 24 horas da cimentação, os espécimes tratados foram mantidos em água deionizada e as raízes foram seccionadas perpendicularmente ao longo eixo, com disco diamantado na máquina de corte Isomet 1000 Precision Saw (South Bay Techonology Inc., Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), sob refrigeração constante. Para cada raiz, obtém-se 9 fatias de 1 mm de espessura . Estas fatias obtidas foram individualmente identificadas e armazenadas em saliva artificial em estufa (Estufa

502, Fanem, São Paulo, SP, Brasil) a 37°C por 24 horas, 6 meses e 12 meses, de acordo com o período de avaliação de cada grupo, sendo realizada a renovação da saliva a cada três semanas.

4.7 Teste de resistência de união (*Push-out*)

Passado o período de armazenamento, os espécimes foram submetidos ao teste de extrusão (*push-out*). Os espécimes foram posicionados em um suporte metálico de aço inoxidável contendo uma perfuração central com 2 mm de diâmetro. Devido ao formato cônico dos pinos, a carga foi aplicada no sentido apico-coronal a partir da superfície apical, de forma que o pino fosse empurrado em direção à porção mais larga do conduto (Figura 4).

Figura 4: Desenho esquemático do posicionamento da fatia durante o teste.

A carga foi aplicada apenas sobre a superfície do pino por meio de uma ponta, com variação de 1,3 mm a 0,8 mm de diâmetro, acoplada a máquina de ensaio universal Instron 3342 (Instron Co., Canton, MA, USA) com célula de carga de 500 kgF (50N), a velocidade de 0,5 mm/min de forma que não entrasse em contato com a interface adesiva. Os valores foram registrados em KgF e posteriormente convertidos em MPa.

4.8 Conversão de valores

Os valores obtidos durante o teste de resistência de união foram registrados em Kgf e posteriormente convertidos em MPa. utilizando a fórmula: $\alpha = F/A$, na qual F, em MPa, é a força presente no momento do deslocamento do pino.

Como a interface adesiva dos corpos-de-prova utilizados apresentavam formato cônico, os diâmetros dos segmentos de cimentação do pino (coronal e apical) e suas espessuras foram verificados com auxílio de um paquímetro digital (Messen Sensor Technology Co, Guangdong China), e a área total, em mm^2, foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula: $A = \pi (R2+R1) [h^2 + (R2-R1)^2]^{0,5}$, na qual $\pi = 3,14$; R2= raio coronal da área de cimentação; R1= raio apical da área de cimentação; h= altura da fatia.

4.9 Análise do tipo de fratura

Após o teste de resistência de união, a análise microscópica do tipo de fratura foi realizada. As fatias foram analisadas através de microscopia óptica (DINO-LITEplus digital microscope, AnMo Eletronics Corporation, Hsinchu, China), com 200 vezes de aumento, sendo classificadas em: 1- A C/D (falha adesiva entre cimento e dentina); 2- A C/P (falha adesiva entre cimento e pino); 3- CP (falha coesiva do pino); 4- CC (falha coesiva do cimento); 5- M (falha mista).

4.10 Análise estatística

Os dados foram tabelados considerando-se as variáveis tratamento, terços radiculares e tempo de armazenagem. As análises foram realizadas utilizando o software Statistica (Statsoft®, Tulsa, OK, USA). A distribuição normal e a homogeneidade das variâncias foram verificadas por meio das análises de Kolmogorov-Smirnov e teste de Levene, respectivamente. Desta forma, os dados foram processados pelo teste de ANOVA a três critérios e comparações múltiplas com Tukey, ambos com $p<0,05$.

5 Resultados

5 RESULTADOS

Avaliação de 12 meses

Os fatores tempo (p=0,0031) e terço (p<0,001) foram estatisticamente significativos, bem como a interação entre tratamento e tempo (p<0,005).

Tratamento	Tempo	Terço	Resistência de união
CP	24 horas	C	7,77 ± 4,75 ABa*
		M	6,25 ± 2,34 ABa#
		A	4,15 ± 2,34 ABa#
	6 meses	C	7,98 ± 4,42 ABb*
		M	4,43 ± 2,06 ABb#
		A	2,75 ± 1,76 ABb#
	12 meses	C	7,059 ± 4,15 ABab*
		M	4,42 ± 2,85 ABab#
		A	3,95 ± 2,06 ABab#
CN	24 horas	C	3,56 ± 1,84 Aa*
		M	3,47 ± 2,27 Aa#
		A	3,01 ± 2,33 Aa#
	6 meses	C	4,62 ± 2,84 Ab*
		M	3,91 ± 3,37 Ab#
		A	2,84 ± 2,30 Ab#
	12 meses	C	5,83 ± 4,86 ABab*
		M	4,84 ±3,07 ABab#
		A	6,16 ±2,76 ABab#
EDTA	24 horas	C	4,78 ± 6,19 Aa*
		M	4,79 ± 3,39 Aa#
		A	2,09 ± 2,09 Aa#
	6 meses	C	4,96 ± 2,35 Ab*
		M	3,31 ± 2,12 Ab#
		A	4,03 ± 2,45 Ab#
	12 meses	C	8,10 ±7,54 ABab*
		M	3,31 ± 1,73 ABab#
		A	4,67 ± 2,43 ABab#
CHX	24 horas	C	4,45 ± 1,85 Aa*
		M	3,13 ± 1,93 Aa#
		A	2,05 ± 1,61 Aa#
	6 meses	C	6,59 ± 4,56 Bb*
		M	11,58 ± 8,89 Bb#
		A	7,26 ± 4,65 Bb#
	12 meses	C	6,10 ± 2,99 ABab*
		M	4,68 ± 3,86 ABab#
		A	5,57 ± 2,17 ABab#

...continua

Continuação...

E64-5µM	24 horas	C	4,32 ± 2,76 Aa*
		M	3,49 ± 2,96 Aa#
		A	4,63 ± 2,79 Aa#
	6 meses	C	6,68 ± 2,92 Ab*
		M	3,65 ± 2,34 Ab#
		A	3,79 ± 2,27 Ab#
	12 meses	C	4,74 ± 3,59 Aab*
		M	3,75 ± 2,90 Aab#
		A	6,00 ± 5,34 Aab#
E64-10µM	24 horas	C	7,26 ± 2,36 Aa*
		M	3,14 ± 0,96 Aa#
		A	1,95 ± 1,29 Aa#
	6 meses	C	6,03 ± 4,24 ABb*
		M	5,92 ± 6,12 ABb#
		A	4,12 ± 3,15 ABb#
	12 meses	C	7,19 ± 4,61 Aab*
		M	3,13 ± 3,41 Aab#
		A	3,14 ± 2,30 Aab#

N=8, $p<0,05$

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos com interação com o tempo

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de um mesmo tratamento

Símbolos diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os terços, considerando-se o mesmo tratamento e tempo.

Na análise do tratamento, este fator isoladamente não demonstrou diferenças entre os grupos testados no tempo de 12 meses.

Na comparação entre os tratamentos ao longo do tempo, os valores de 6 meses foram estatisticamente superiores aos de 24 horas, porém não ao tempo de 12 meses.

Em relação a comparação entre os terços, todos os grupos demonstraram o mesmo desempenho, sendo que o terço cervical sempre foi estatisticamente superior aos terços médio e apical em todos os tratamentos avaliados.

Análise das fraturas

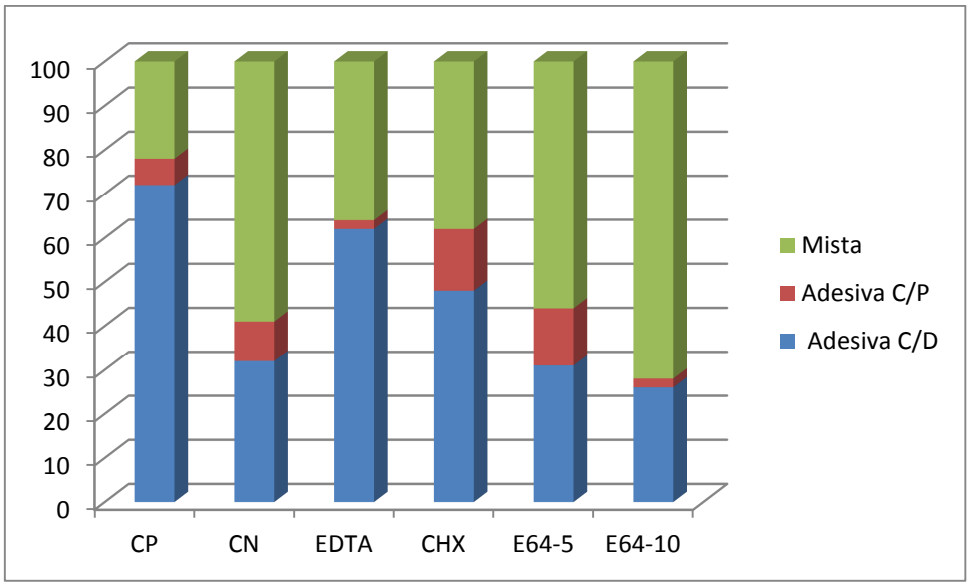


Figura 5 - Análise das fraturas no tempo de 24h

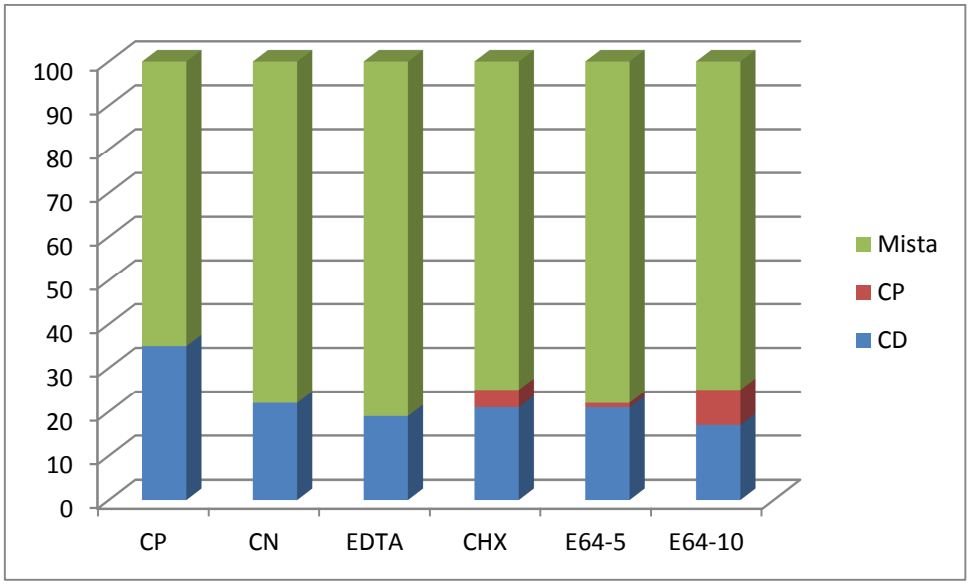


Figura 6 - Análise das falhas no tempo de 6 meses

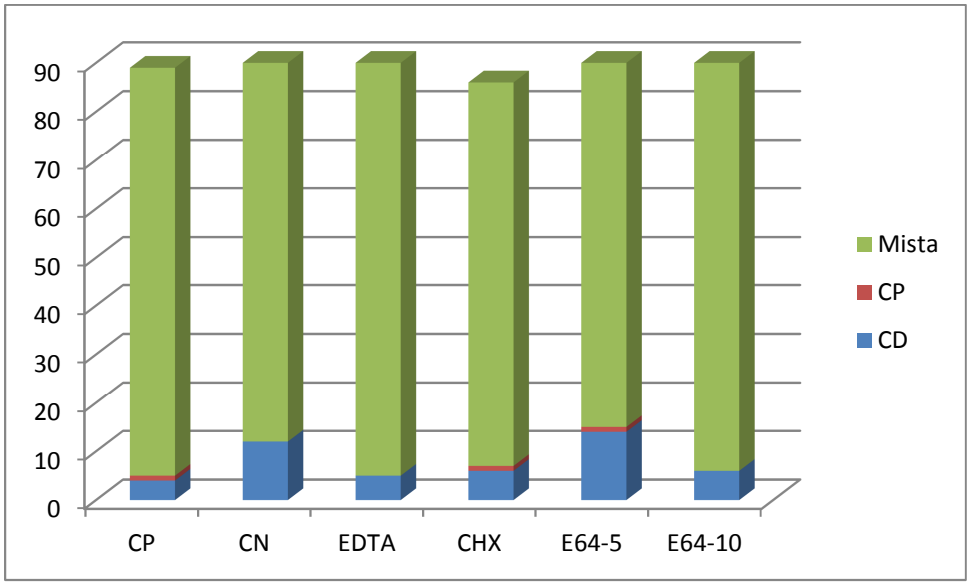


Figura 7 - Análise das falhas no tempo de 12 meses

No tempo de 24h, a análise de fraturas para os grupos CP, EDTA e CHX revelou maior quantidade de falhas adesivas entre o cimento e a dentina. Para os grupos CN, E64-5 e E64-10 as falhas mistas foram predominantes.

No tempo de 6 meses e 12 meses a maior quantidade de falhas para todos os grupos foi mista, intensificando-se aos 12 meses e apresentando menor porcentagem de falhas do tipo coesiva.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Os resultados desse trabalho sugerem que a utilização de diferentes inibidores da atividade proteolítica não promoveu um impacto na resistência de união no tempo de 12 meses. Entretando, a clorexidina obteve melhores resultados no tempo de 6 meses de armazenagem. Em relação aos terços, o terço cervical sempre foi estatisticamente superior aos terços médio e apical em todos os tratamentos avaliados. Portanto as hipóteses nulas foram rejeitadas.

Estudos tem evidenciado que MMPs e CCs co-existem na dentina (TERSARIOL et al., 2010; VIDAL et al., 2014) e participam da degradação do colágeno, contribuindo para a degradação da matriz orgânica dentinária, principalmente em dentina cariada (TJÄDERHANE et al., 2015). Este processo se reflete também na degradação da camada híbrida de restaurações adesivas (MAZZONI et al., 2015). O aumento significativo da CC na dentina cariada com o aumento da profundidade em direção a polpa pode indicar que MMPs e CCs desempenham uma atividade sinérgica e dependente (NASCIMENTO et al., 2011; SCAFFA et al., 2012; VIDAL et al., 2014). A utilização de dentes bovinos para essa avaliação é confiável pois também apresentam atividades de enzimas proteolíticas KATO et al., 2011)

Com o intuito de diminuir falhas de adesão e / ou deslocamento de pinos intrarradiculares e para prolongar sua longevidade, têm sido realizados estudos para investigar diferentes estratégias de cimentação de pinos associada aos inibidores proteolíticos de MMPs e CCs (LINDBLAD et al., 2010; CECHIN et al., 2011, LINDBLAD et al., 2012, WANG et al., 2013, DE ARAÚJO et al., 2014). Uma vez que o papel fisiológico e a possível interação dessas enzimas proteolíticas em dentina não estão totalmente elucidadas (TJÄDERHANE et al., 2013), este estudo teve o objetivo de avaliar esses aspectos pela utilização distintos inibidores.

Para testar o desempenho dos inibidores proteolíticos propostos, foi aplicado um sistema adesivo convencional, para que o condicionamento prévio contribuísse na desmineralização da dentina e intensificasse a ativação das enzimas proteolíticas. Assim, um grupo controle padrão, utilizado usualmente com adesivo

fotopolimerizável de 3 passos, foi considerado grupo controle negativo por não incorporar nenhuma estratégia adicional.

A influência dos fatores testados foi determinada usando o teste *push-out*, por ser um método confiável neste propósito, dentre suas limitações e comparativamente aos demais testes de resistência de união à dentina radicular (GORACCI et al., 2004). Vários estudos empregaram este método, permitindo também uma comparação mais efetiva dos dados (GORACCI et al., 2004; LINDBLAD et al., 2010; CECHIN et al., 2011; LEME et al., 2011; LINDBLAD et al., 2012; WANG et al., 2013; DE ARAÚJO et al., 2014,) .

Em trabalhos que testaram a cimentação intrarradicular, na grande maioria das vezes foram utilizados adesivos fotopolimerizados (LINDBLAD et al., 2010; LINDBLAD et al., 2012; WANG et al., 2013; ARAÚJO et al., 2014). Contudo, sabe-se que na região apical há maiores dificuldades técnicas adesivas quando comparada à adesão da porção mais coronária da raiz (EBRHIMI et al., 2014), considerando-se também que a luz propagada não alcançaria a mesma amplitude na região mais apical (QUITERO et al., 2014). Por isso o controle positivo desse trabalho foi o mesmo sistema adesivo utilizado em todos os grupos, associado com o ativador e catalisador para promover a polimerização em toda a extensão do conduto, em condições de cimentação (BALBOSH et al., 2006; LEME et al., 2011), porém comumente suprimida pelo profissional.

O fabricante indica a associação do sistema adesivo convencional de dois passos Adper Single Bond com o cimento resinoso dual, o RelyX ARC, pela simplicidade prática. Entretanto, optamos por utilizar um adesivo de três passos como em outros estudos (CECCHIN et al., 2011; WANG et al., 2013; DE ARAUJO et al., 2014; SOARES et al., 2008), pois adesivos simplificados apresentam incompatibilidade química com cimentos de polimerização dual. Isso se deve ao processo no qual os monômeros acídicos dos adesivos simplificados reagem com as aminas terciárias da porção autopolimerizável do cimento, interferindo negativamente no processo de polimerização (SANARES et al., 2001). Os adesivos simplificados, por um processo de osmose, exacerbam a movimentação de água através da dentina, intensificando a degradação do material resinoso (CHERSONI et al., 2005).

Neste trabalho, a utilização de adesivo convencional e dual não evidenciou diferenças comparadas àquelas já relatadas pela literatura (THITTHAWEERAT ET al.,2012; EBRAHIMI et al., 2014). Mesmo com a associação a um adesivo dual, a região apical apresentou os menores valores de resistência de união comparativamente aos terços cervical e médio. Na região apical, também não se pode deixar de considerar aspectos biológicos particulares que podem limitar uma adequada união: menor densidade e o maior diâmetro dos túbulos dentinários (SOARES et al., 2008; EBRAHIMI et al., 2014), configuração cavitária e fator C desfavoráveis e dificuldade de acesso ao procedimento adesivo (MAZZITELI et al., 2008).

A hipótese nula que os inibidores proteolíticos não interferem na resistência de união deve ser rejeitada, uma vez que a clorexidina demonstrou capacidade de interferir nessa propriedade.

Em estudos prévios, os dados indicaram que a CHX não tem efeito imediato na adesão de pinos utilizando diferentes adesivos, cimentos ou pinos (LINDBLAD et al., 2010; WANG et al., 2013). Contudo, alguns estudos indicam que CHX pode reduzir a resistência adesiva quando utilizam-se adesivos auto-condicionantes (WANG et al., 2013) e cimentos auto adesivos (DI HIPÓLITO et al., 2012). Di Hipólito et al. (2012) observaram precipitados quando a CHX foi usada com cimento auto-adesivo RelyX U100 que pode atuar como uma barreira física limitando a interação de cimentos resinosos com a superfície dentinária, minimizando a habilidade de adesão (DI HIPÓLITO et al., 2012). Por este motivo, o presente estudo não se propôs a diversificar os adesivos e cimentos, tendo o intuito específico de observar o desempenho atribuído à ação de inibidores enzimáticos.

A literatura evidencia que a CHX em concentrações de 0,2-2% demonstra-se eficaz na prevenção da perda da resistência adesiva na camada híbrida, sem afetar a resistência de união imediata (MONTAGNER et al., 2014; TJÄDERHANE, 2015; FRANCISCONI-DOS-RIOS et al., 2015). A CHX é um inibidor enzimático não específico, minimizando a atividade de um amplo espectro de MMPs e CCs (SCAFFA et al., 2012). Essas enzimas proteolíticas estão presentes também na dentina radicular (SANTOS et al., 2009), portanto a utilização de inibidores na cimentação de pinos em diferentes tipos de investigações poderia contribuir no

esclarecimento sobre a atuação dessas enzimas na degradação da camada híbrida nesta região. Outros inibidores foram utilizados com a finalidade de se verificar uma ação específica, como agentes específicos EDTA e E-64 contra MMPs (THOMPSON et al., 2012) e CCs (NASCIMENTO et al., 2011), respectivamente. Até o momento, estudos semelhantes foram publicados usando a CHX (LINDBLAD et al., 2012; WANG et al., 2013; DE ARAÚJO et al., 2014), mas nenhum deles avaliou os efeitos de um inibidor específico de CC na adesão de pinos intrarradiculares.

Em relação ao EDTA outros estudos também comprovaram que sua utilização não compromete a adesão imediata (MAO et al., 2011; OSORIO et al., 2011; TEKÇE et al., 2016). As soluções de E-64 não foram especificamente avaliadas quanto à sua compatibilidade a sistemas adesivos. A sua utilização em pesquisas na área odontológica até o momento está direcionada à trabalhos onde a especificidade com as enzimas proteolíticas foi verificada (NASCIMENTO et al., 2011; SCAFFA et al., 2013). Nesses trabalhos (NASCIMENTO et al., 2011; SCAFFA et al., 2013) E-64 a 5μM demonstrou ser um inibidor de CC eficaz na dentina. No presente estudo também foi investigado a maior concentração indicada pelo fabricante Sigma Aldrich®, E-64 a 10 μM, essa escolha foi feita considerando-se que uma vez aplicada nos procedimentos adesivos a dentina atuaria como barreira mecânica, podendo reduzir o seu efeito.

A hipótese nula de que a resistência de união não é afetada pelo tempo foi rejeitada, uma vez que foi observada diferença entre os tempos imediato e de 6 meses em algumas comparações.

Ao analisar diferentes estratégias restauradoras, vários estudos compararam seu desempenho até 12 meses (SOARES et al., 2008; CECHIN et al., 2011; FRANCISCONI-DOS-RIOS et al., 2015; TEKÇE et al., 2016;). Os resultados imediatos do presente trabalho mostraram que o E-64 a 5μM e a 10μM não influenciaram negativamente na adesão. Destaca-se também que o E-64 nas duas concentrações também não determinou resultados distintos nos tempos de 6 e 12 meses, o que sugere não haver incompatibilidade com o sistema adesivo, mesmo não demonstrando capacidade de inibição das enzimas proteolíticas nas condições aplicadas.

O grupo tratado com a CHX, aos 6 meses foi o que obteve os melhores resultados comparando-se todos os tratamentos e tempos testados. Além da substantividade da clorexidina, a propriedade catiônica dos íons cálcio é o que provavelmente mantém a enzima proteolítica inativada (CARRILHO et al., 2010). Já o EDTA é um quelante que se liga ao cálcio, sendo por isso um inibidor de MMPs (THOMPSON et al., 2012). Porém apresenta alta solubilidade em água, e a clorexidina se liga à dentina desmineralizada mais firmemente, mantendo a inatividade das MMPs por maior período de tempo (THOMPSON et al., 2012).

O grupo EDTA no tempo de 6 meses não apresentou melhora na resistência de união, contrariando outros trabalhos que observaram o aumento da resistência adesiva com o tempo (THOMPSON et al., 2012; TEKÇE et al., 2016). Thompson et al. 2012 utilizou o EDTA na dentina desmineralizada nos tempos de 1, 2 e 5 min, e Tekçe et al. em 2016 utilizou este agente por 1 min, ambos comprovando sua inibição às MMPs em dentina coronária. No presente trabalho, o EDTA foi aplicado por 30 segundos na dentina radicular, o que pode não ter sido suficiente na sua ação inibitória.

Mesmo as MMPs e CCs sendo ativadas em pH ácido, em torno de 2,5 – 4,5, o pH ótimo em que atuam são diferentes. As CCs atuam em um pH ainda ácido, 5, enquanto as MMPs atuam primordialmente em pH neutro (MAZZONI et al., 2015). De acordo com os fabricantes da CHX e EDTA utilizados, o pH dessas soluções são 5,5 e 7,5 respectivamente. As soluções de E-64 preparadas apresentaram pH 5,5. Desta forma, somente o EDTA apresentou pH neutro, o que corresponde ao pH em que as MMPs atuam após experimentar um meio ácido.

Já a CHX mantém o pH levemente ácido, possibilitando que enzimas proteolíticas possam se apresentar inativas antes do pH retornar ao neutro. Talvez esse fato seja outro motivo de inativar essas enzimas com maior sucesso. Sendo o pH do EDTA neutro, no momento da sua aplicação, as MMPs ainda encontram condições para sua atividade. Talvez uma maior concentração desta solução seja necessária para que promova sua inativação, como observado nos estudos que aplicaram o EDTA em um período de tempo maior (THOMPSON et al., 2012; TEKÇE et al., 2016). Seguindo o mesmo raciocínio, o E-64 possui um pH levemente ácido, sugerindo que mais pesquisas o utilizando em tempos de aplicação maiores

previamente ao sistema adesivo possa evidenciar se a inativação ocorreria de maneira efetiva.

Os resultados do presente trabalho discordam do trabalho de De Araújo et al. (2014) que demonstrou que a CHX não produziu melhora na resistência de união utilizando o mesmo cimento. Essa diferença de resultados pode ser devido a uma diferença na metodologia do trabalho. De Araújo et al. (2014) utilizaram EDTA após a instrumentação do canal como irrigante final. No presente trabalho não o utilizamos nesta fase. Uma vez que o EDTA é um inibidor de MMP, o utilizamos somente em um grupo distinto, para observar possível atuação das CC isoladamente.

Analisando os resultados de 12 meses, a resistência de união não apresentou melhores resultados em nenhum dos tratamentos propostos, mostrando que a manutenção da camada híbrida pela CHX que foi observado nos resultados de 6 meses não persiste ao longo do tempo. Esse resultado coincide com a revisão sistemática de Montagner et al. 2014 e com o trabalho de Francisconi-dos-Rios et al. 2015 que testaram a utilização de CHX 2% em dentina erodida. Em ambos os trabalhos, os autores observaram maior resistência adesiva aos 6 meses, mas em 12 meses essa resistência adesiva reduziu-se, reforçando a concepção de que os inibidores sejam capazes de postergar a ação enzimática, sem no entanto eliminá-la por completo.

A hipótese nula de que a resistência de união não é afetada pelo terço deve ser rejeitada.

Também devemos notar que independente do tratamento, a resistência de união de acordo com o terço, demonstrou que a região apical sempre se apresentou mais prejudicada e o terço médio piorando com o aumento do tempo de avaliação. Este desempenho generalizado também reforça que no conduto radicular, possivelmente os fatores mecânicos sejam mais deletérios que a ação biológica que ocorre.

De todos os tratamentos anti-proteolíticos testados neste trabalho, o emprego da CHX em restaurações adesivas na dentina radicular parece ter ação ainda mais confiável, ou ao menos detectável neste modelo de análise. Mesmo não garantindo

estabilidade na manutenção da camada híbrida, a inativação das enzimas proteolítcas tem sido evidenciada (TJÄDERHANE a 2015; TJÄDERHANE b et al., 2015)

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

As hipóteses nulas testadas foram rejeitadas. Diante dos resultados descritos e discutidos neste estudo, foi possível concluir que:

- Em relação aos inibidores de atividade proteolítica testados, a clorexidina determinou efeito positivo na resistência de união no tempo de 6 meses, mas não manteve essa melhora no tempo de 12 meses. Os agentes inibidores EDTA, e E-64 5 μM e E-64 10 μM não foram capazes de interferir na resistência de união na dentina radicular.

- Os terços cervical e apical apresentaram o melhor e o pior desempenho, respectivamente. O terço médio apresentou desempenho inferior ao longo do tempo.

- O tempo foi determinante na resistência de união, de acordo com o tratamento realizado.

Referências

REFERÊNCIAS

Abou-Id LR, Morgan LF, Silva GA, Poletto LT, Lanza LD, Albuquerque R. Ultrastructural evaluation of the hybrid layer after cementation of fiber posts using adhesive systems with different curing modes. Braz Dent J 2012; 23(2):116-21.

Arzanlou M. Inhibition of streptococcal pyrogenic exotoxin B using allicin from garlic. Microb Pathog. 2016; 93:166-71.

Asmussen E, Peutzfeldt A, Heitmann T Stiffness. Elastic limit, and strength of newer types of endodontic posts. J Dent 1999; 27(4):275–8.

Balbosh A, Kern M. Effect of surface treatment on retention of glass-fiber endodontic post. J Prosthet Dent. 2006; 95(3):218-23.

Bergoli CK, Amaral M, Boaro LC, Braga RR, Valandro LF. Fiber post cementation strategies: effect of mechanical cycling on push-out bond strength and cemente polymerization stress. J Adhes Dent. 2012; 14(5):471-8.

Bonfante EA, Pegoraro LF, de Góes MF, Carvalho RM. SEM observation of the bond integrity of fiber-reinforced composite posts cemented into root canals. Dent Mater. 2008 Apr;24(4):483-91.

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

Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Nicolau J, Breschi L, Mazzoni A et al. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. Dent Mater. 2010; 26 (8):779-85.

Cecchin D, Almeida JFA, Gomes BPFA, Zaia AA, Ferraz CCR. Influence of Chlorhexidine and Ethanol on the Bond Strength and Durability of the Adhesion of the Fiber Posts to Root Dentin Using a Total Etching Adhesive System. J Endod. 2011; 37(9):1310–15.

Chandrasekaran M, Chandrasekar R, Chun SC, Sathiyabama M. Isolation, characterization and molecular three-dimensional structural predictions of metalloprotease from a phytopathogenic fungus, Alternaria solani (Ell. and Mart.). J Biosci Bioeng. 2016. In Press.

Chaves LP, Graciano FMO, BimJunior O, Pedreira APRdoV, Manso AP, Wang L. Water interaction with dental luting cements by means of sorption and solubility. BrazDent Sci. 2012; (15):29-35.

Chaves LP. Avaliação da sorção e solubilidade de cimentos autoadesivos em comparação a outros cimentos. Universidade do Norte do Paraná, 2008.

Cheleux N, Sharrock PJ. Mechanical properties of glass fiber-reinforced endodontic posts. Acta Biomater. 2009; (5):3224–30.

Chersoni S, Acquaviva. GL , Prati C, Ferrari M, Grandini S, Pashley DH, Tay FR. In vivo fluid movement through dentin adhesives in endodontically treated teeth. J. Dent. Res. 2005; (3):223-27.

Cury AH, Goracci C, De Lima Navarro MF, Carvalho RM, Sadek FT, Tay FR et al. Effect of hygroscopic expansion on the push-out resistance of glass ionomer-based cements used for the luting of glass fiber posts. J Endod. 2006; 32(6):537-40.

De Araújo DF, Chaves LP, Bim O Jr, Pimentel Garcia FC, Ishikiriama SK, Honório HM, Wang L. Influence of 2% chlorhexidine digluconate on bond strength of a glass-fibre post luted with resin or glass-ionomer based cement. J Dent. 2014; 42(6):735-41.

De Munck J, Vargas M, Van Landuyt K, Hikita K, Lambrechts P, Van Meerbeek B.Bonding of na auto-adhesive luting material to enamel and dentin. Dent. Mater. 2004; 20(10):963-71.

Di Hipólito V, Rodrigues FP, Piveta FB, Azevedo LDAC, Bruschi Alonso RC, Silikas N et al. Effectiveness of self-adhesive luting cements in bonding to chlorhexidine-treaed dentin. Dent Mater. 2012; 28(5):495-501.

Ebrahimi SF, Shadman N, Nasery EB, Sadeghian F. Effect of polymerization mode of two adhesive systems on push-out bond strength of fiber post to different regions of root canal dentin. Dent Res J. 2014;11(1):32-8.

Ekim SNA, Erdemir A. Comparison of Different Irrigation Activation Techniques on Smear Layer Removal: An in vitro Study. Microsc. Res. Tech. 2015; 78(3):230–39.

Everts V, Delaissé JM, Korper W, Beertsen W. Cysteine proteinases and matrix metalloproteinases play distinct roles in the subosteoclastic resorption zone. J Bone Miner Res. 1998;13(9):1420-30.

Fabre HS, Fabre S, Cefaly DF, De Oliveira Carrilho MR, Garcia FC, Wang L. Water sorption and solubility of dentine bonding agents light-cured with different light sources. J Dent. 2007; 35(3): 253-8.

Ferracane JI; Stansbury JW; Burke FJ. Self-adhesive resin cements – chemistry, properties and clinical considerations. J Oral Rehabil. 2011;38 (4):295-314.

Ferrari M, Mason PN, Goracci C, Pashley DH, Tay FR.. Collagen degradation in endodontically treated teeth after clinical function. J. Dent. 2004; 83 (5): 414-9.

Figueiredo FED, Martins-Filho PRS, Faria-e-Silva AL. Do Metal Post–retained Restorations Result in More Root Fractures than Fiber Post–retained Restorations? A Systematic Review and Meta-analysis. J Endod. 2015; 41(3):309-16.

Francisconi-dos-Rios LF, Casas-Apayco LC, Calabria MP, Francisconi PAS, Borges AFS, Wang L. Role of Chlorhexidine in Bond Strength to Artificially Eroded Dentin Over Time. J Adhes Dent 2015; 17(2):133–39.

Geramipanah F, Rezaei SM, Sichani SF, Sichani BF, Sadighpour L Microleakage of different post systems and a custom adapted fiber post. J Dent (Tehran). 2013; 10(1):94-102.

Giacomonini MC. Efeitos de inibidores proteolíticos na adesão de dentina desmineralizada por cárie ou erosão. Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo. Bauru 2015.

Goracci C, Ferrari M. Current perspectives on post systems: a literature review. Australian Dental Journal 2011;(56):77–83.

Goracci C, Tavares AU, Fabianelli A, Monticelli F, Raffaelli O, Cardoso PC et al. The adhesion between fiber posts and root canal walls: comparison between microtensile and push-out bond strength measurements. Eur J Oral Sci. 2004; 112(4):353-61.

Grandini S, Goracci C, Tay FR, Grandini R, Ferrari M. Clinical Evaluation of the Use of Fiber Posts and Direct Resin Restorations for Endodontically Treated Teeth. Int J Prosthodont 2005; 18(5):399–404.

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

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

Imbery TA; Kennedy M; Janus C; Moon PC. Evaluating EDTA as a substitute for phosphoric acid-etching of enamel and dentin. Gen Dent 2012; 65(2):55-61.

Iriboz E, Bayraktar K, Türkaydın D, Tarc B. Comparison of Apical Extrusion of Sodium Hypochlorite Using 4 Different Root Canal Irrigation Techniques. JOE. 2015; 41(3): 380-84.

Kato M.T., Bolanho A., Zarella B.L., Salo T., Tjäderhane L., Buzalaf M.A.R.. Sodium Fluoride Inhibits MMP-2 and MMP-9. J Dent Res. 2014; 93(1):74-7.

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

Lamichhane A, Xu C, Zhang F. Dental fiber-post resin base material: a review. J Adv Prosthodont. 2014; (6):60-5.

Leme AA; Coutinho M; Insaurralde AF; Scaffa PMC; da Silva LM. The Influence of Time and Cement Type on Push-Out Bond Strength of Fiber Posts to Root Dentin. Oper Dent. 2011; 36(6):643-48.

Lindblad RM, Lassila LV, Salo V, Vallittu PK, Tjäderhane L. Effect of chlorhexidine on initial adhesion of fiber-reinforced post to root canal. J Dent. 2010;(10):796-801.

Lindblad RM, Lassila LV, Salo V, Vallittu PK, Tjäderhane L. One year effect of chlorhexidine on bonding of fibre-reinforced composite root canal posto to dentine. J Dent. 2012;(9):718-22.

Mao H, Chen Y, Yip KH-K, Smales RJ. Effect of three radicular dentine treatmens and two luting cements on the regional bond strength of quartz fibre posts. Clin oral invest. 2011; (15):869-78.

Martelli H Jr, Pellizzer EP, Rosa BT, Lopes MB, Gonini A Jr. Fracture resistance of structurally compromised root filled bovine teeth restored with accessory glass fibre posts. Int Endod J. 2008; 41(8):685-92.

Mazzitelli C, Monticelli F, Osorio R, Casucci A, Toledano M, Ferrari M. Effect of simulated pulpal pressure on self-adhesive cements bonding to dentin. Dent. Mater. 2008; 24(9):1156-63.

Mazzoni A, Nascimento F.D., Carrilho M., Tersariol I., Papa V., Tjäderhane L., Lenarda R. Di, 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): 467-72.

Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. Role of Dentin MMPs in Caries Progression and Bond Stability. J Dent Res. 2015; (2):241-51.

Montagner AF, Sarkis-Onofre R, Pereira-Cenci T, Cenci MS. MMP Inhibitors on Dentin Stability: A Systematic Review and Meta-analysis. J Dent Res. 2014;93(8):733-743.

Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldeli S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, Nader HB, Salo T, Tjäderhane L, Tersariol IL. Cysteine cathepsins in human carious dentin. J Dent Res. 2011;90(4):506-11.

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

Ohlmann B, Fickenscher F, Drevhaupt J, Rammelsberg P, Gabbert O,Schmitter M. The effect of two luting agents, pretreatment of the post, and pretreatment of the canal dentin on the retention of fiber-reinforced composite posts. J Dent. 2008; 36 (1):87-92.

Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley D, Tay F, Toledano M. Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. Eur J Oral Sci. 2011;119(1):79-85

Ozcan S, Sesseogullari-Dirihan R, Uctasli M, Tay FR, Pashley DH, Tezvergil-Mutluay A. Effect of plyacrylic acid on dentin protease activities. Dent Mater. 2015;31(8):901-06.

Palma-Dibb RG, de Castro CG, Ramos RP, Chimello DT, Chinelatti MA. Bond strength of glass-ionomer cements to caries-affected dentin. J Adhes Dent. 2003; 5(1):57-62.

Papadiochou S, Emmanouil I, Papadiochos I. Denture adhesives: A systematic review. J Prosthet Dent. 2015; 113(5):391-397.e2.

Pashley DH. Commentary. The effects of different desensitizing agents on the shear bond strength of adhesive resin cement to dentin. J Esthet Restor Dent. 2011;23(6):388-9.

Pegoraro, TA; Silva, NRFA; Carvalho, RM. Cements for Use in Esthetic Dentistry. Dent. Clin. North Am. 2007; 51(2):453-71.

Peixoto AC, Bicalho AA, Isolan CP, Maske TT, Moraes RR, Cenci MS, Soares, Faria-e-Silva AL. Bonding of Adhesive Luting Agents to Caries-affected Dentin Induced by a Microcosm Biofilm Model. Oper Dent. 2015;40(3):E102-11.

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

Pereira JR a, Valle AL, Ghizoni JS, Só MVR, Ramos MB, Lorenzon FC. Evaluation of push-out bond strength of four luting agents and SEM observation of the dentine/fibreglass bond interface. Int. End. J 2013;(46):982–92.

Pereira JR b, Valle AL, Ghizoni JS, Lorenzoni FC, Só MVR. Push-out bond strengths of different dental cements used to cement glass fiber posts. J Prosthet Dent. 2013;(110):134-40.

Qu ZG, Ma XT, Li WH, Zhang NZ, Yue L, Cui JM, Cai JP, Jia WZ, Fu BQ. Molecular characterization of a cathepsin F-like protease in Trichinella spiralis. Parasit Vectors. 2015; 21(8):652.

Quitero MFZ, Garone-Netto N, Freitas PM, Luz MAAC.Post translucency did not increase the tensile bond strength of dual-polymerized resin luting agents. J Prosthet Dent. 2014;111(1):35-41.

Sanares AM, Itthagarun A, King NM, Tay FR, Pashley DH. Adverse surface interactions between one-bottle light-cured adhesives and chemical-cured composites. Dent Mater. 2001; 17(6):542-56.

Santos J, Carrilho M, Tervahartiala T, Sorsa T, Breschi L, Mazzoni A et al. Determination of matrix metalloproteinases in human radicular dentin. J Endod. 2009; 35(5):686-9.

Scaffa PMC, et al. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. J Dent Res. 2012; (4):420-25.

Silva LM. Resistência de união da cimentação adesiva de pinos de fibra de vidro frente ao teste de remoção por extrusão [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2009.

Soares CJ, Santana FR, Castro CG, Santos-Filho PC, Soares PV, Qian F et al. Finite element analysis an bond strength of a glass post to intraradicular dentin: comparison between microtensile and push-out tests. Dent Mater. 2008; (10):1405-11.

Tekçe N, Tuncer S, Demirci M, Balci S. Do matrix metalloproteinase inhibitors improve the bond durability of universal dental adhesives? Scanning. 2016. In press.

Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Pääkkönen V, Martins MT, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, Salo T, Tjäderhane L. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. J Endod. 2010;36(3):475-81.

Thean HP, Mok BY, Chew CL. Bond strengths of glass ionomer restoratives to primary vs permanent dentin. ASDC J Dent Child. 2000; 67(2):112-6.

Thitthaweerat S, Nakajima M, Foxton RM, Tagami J. Effect of waiting interval on chemical activation mode of dual-cure one-step self-etching adhesives on bonding to root canal dentin. J Dent. 2012 Dec;40(12):1109-18.

Thompson JM, Agee K, Sidow SJ, MCNally K, Lindsey K, Borke J, Elsalanty M, Tay FR, Pashley DH. Inhibition of Endogenous Dentin Matrix Metalloproteinases by Ethylenediaminetetraacetic Acid. J Endond 2012;(38); 1, 62–5.

Tjäderhane L a.Dentin bonding: can we make it last? Oper Dent. 2015; 40(1):4-18.

Tjäderhane L b, Buzalaf MA, Carrilho M, Chaussain C.Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: the era of 'dentin degradomics'.Caries Res. 2015;49(3):193-208.

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

Tjäderhane L; Nascimento FD, Breschi L; Mazzoni A; Tersariol IL et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matriz metalloproteinases and cysteine cathepsins. Dent Mater. 2013;(1):116-35.

Tolde O, Rösel D, Mierke CT, Panková D, Folk P, Vesely P, Brábek J. Neoplastic progression of the human breast cancer cell line G3S1 is associated with elevation of cytoskeletal dynamics and upregulation of MT1-MMP. Int J Oncol. 2010; 36(4):833-9.

Turk D, Guncar G. Lysossomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. Acta Cryst. 2003;(59):201-13.

Van Meerbeek B, Van Landuyt K, De Munck J, Hashimoto M, Peumans M, Lambrechts P, et al. Technique-sensitivity of contemporary adhesives. Dent Mater J. 2005; Mar;24(1):1-13.

Vidal CMP, Tjäderhane L , Scaffa PM, Tersariol IL, Pashley D , Nader HB, Nascimento FD, Carrilho MR. Abundance of MMPs and Cysteine Cathepsins in Cariesaffected Dentin. J Dent Res. 2014;(3):269-74.

Vidal CMP. Efeito da atividade proteolítica da dentina humana sadia e cariada.Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 2012.

Wang L, Pinto TA, Silva LM, Araujo DFG, Martins LM, Hannas AR, Pedreira APRV, Francisconi PAS, Honorio HM. Effect of 2% chlorhexidine digluconate on bond strength of a glass-fibre post to root dentine. Int Endod J. 2013; (9):847-54.

Yoshikawa T, Morigami M, Sadr A, Tagami J.Environmental SEM and dye penetration observation on resin-tooth interface using different light curing method. Dent Mater J. 2016;35(1):89-96.

Zheng P, Zaruba M, Attin T, Wiegand A.Effect of different matrix metalloproteinase inhibitors on microtensile bond strength of an etch-and-rinse and a self-etching adhesive to dentin. Oper Dent. 2015; 40(1):80-6.

Zia A, Andrabi SMUN, Beyn A, Kumar A, Fatima Z. Endodontic irrigant as a root conditioning agent: An in vitro scanning electronmicroscopicstudy evaluating theability of MTAD to remove smear layer from periodontallly affected root surfaces. Singapore Dent J. 2014; (35): 47-52.

Zicari F; De Munck J; Scotti R; Naert I; Van Meerbeek B. Factors affecting the cemente-post interface. Dent Mater. 2012; 28(3):287-97.

Anexo

ANEXO

Avaliação de 6 meses

Os fatores em estudo tratamento (p=0,026), tempo (p=0,013) e terço (p<0,001) foram estatisticamente significativastivas, bem como a interação entre tratamento e tempo (p=0,002).

Tratamento	Tempo	Terço	Resistência de união
CP	24 horas	C	7,77 ± 4,75 ABa*
		M	6,25 ± 2,34 ABa*#
		A	4,15 ± 2,34 AB a#
	6 meses	C	7,98 ± 4,42 Ab*
		M	4,43 ± 2,06 Ab*#
		A	2,75 ± 1,76 Ab#
CN	24 horas	C	3,56 ± 1,84 Aa*
		M	3,47 ± 2,27 Aa*#
		A	3,01 ± 2,33 Aa#
	6 meses	C	4,62 ± 2,84 Ab*
		M	3,91 ± 3,37 Ab*#
		A	2,84 ± 2,30 Ab#
EDTA	24 horas	C	4,78 ± 6,19 Aa*
		M	4,79 ± 3,39 Aa*#
		A	2,09 ± 2,09 Aa#
	6 meses	C	4,96 ± 2,35 Ab*
		M	3,31 ± 2,12 Ab*#
		A	4,03 ± 2,45 Ab#
CHX	24 horas	C	4,45 ± 1,85 Aa*
		M	3,13 ± 1,93 Aa*#
		A	2,05 ± 1,61 Aa#
	6 meses	C	6,59 ± 4,56 Bb*
		M	11,58 ± 8,89 Bb*#
		A	7,26 ± 4,65Bb#

...continua

Continuação...

E64-5µM	24 horas	C	4,32 ± 2,76 Aa*
		M	3,49 ± 2,96 Aa*#
		A	4,63 ± 2,79 Aa#
	6 meses	C	6,68 ± 2,92 Ab*
		M	3,65 ± 2,34 Ab*#
		A	3,79 ± 2,27 Ab#
E64-10µM	24 horas	C	7,26 ± 2,36 Aa*
		M	3,14 ± 0,96 Aa*#
		A	1,95 ± 1,29 Aa#
	6 meses	C	6,03 ± 4,24 ABb*
		M	5,92 ± 6,12 ABb*#
		A	4,12 ± 3,15 ABb#

N=8, $p<0,05$

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos com interação com o tempo

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de um mesmo tratamento

Símbolos diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os terços, considerando-se o mesmo tratamento e tempo.

Na análise do tratamento, observamos que o CP não diferiu com nenhum dos demais tratamentos testados em nenhum tempo e terço.

Aos 6 meses, apenas o grupo tratado com CHX demonstrou valores que diferiram do grupo CP de 6 meses, reduzindo os valores no terço cervical, porém aumentando nos terços médio e apical. O grupo E64-10 não diferiu do grupo CHX e nem dos demais grupos. CP no tempo de 24 h não difere do CHX 6 meses.

Em relação à comparação entre os terços, todos os grupos demonstraram o mesmo desempenho, sendo que o terço cervical sempre foi estatisticamente superior ao terço apical em todos os tratamentos avaliados. O terço médio não diferiu de nenhum dos outros terços.