



Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Departamento de Materiais Dentários e Prótese
Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral



Rafael Hayaxibara Sturaro

Análise de solução aquosa de Azadirachtina purificada como agente antimicrobiano e protetor das fibras colágenas e sua influência na força de união de pinos de fibra de vidro fixados com cimento resinoso autoadesivo

Ribeirão Preto
2019

Rafael Hayaxibara Sturaro

Análise de solução aquosa de Azadirachtina purificada como agente antimicrobiano e protetor das fibras colágenas e sua influência na força de união de pinos de fibra de vidro fixados com cimento resinoso autoadesivo

Versão Corrigida

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor. Área de concentração: Reabilitação Oral.

Orientadora: Profa Dra Rossana Pereira de Almeida

Ribeirão Preto

2019

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

Sturaro, Rafael Hayaxibara

Análise de solução aquosa de Azadirachtina purificada como agente antimicrobiano e protetor das fibras colágenas e sua influência na força de união de pinos de fibra de vidro fixados com cimento resinoso autoadesivo. Ribeirão Preto, 2019.

110 p.: il. ; 30 cm

“Versão corrigida da Dissertação/Tese. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa”.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Reabilitação Oral.

Orientadora: Rosana Pereira de Almeida

1. Azadirachtina. 2. Adesão. 3. Dentina. 4. Clorexidina.
5. Sistema Resinoso.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rafael Hayaxibara Sturaro

Análise de solução aquosa de Azadirachtina purificada como agente antimicrobiano e protetor das fibras colágenas e sua influência na força de união de pinos de fibra de vidro fixados com cimento resinoso autoadesivo.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do **Título de Doutor**.
Área de concentração: Reabilitação Oral.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este Trabalho

Aos meus pais, Luiz e Claudet, pelo apoio e carinho para enfrentar os desafios que me foram impostos nessa jornada. Agradeço imensamente por tudo que fizeram, pois sem todo este esforço eu não estaria onde estou hoje.

A minha esposa querida Gabriela que durante a jornada assumiu este posto e sempre me amparou e me ajudou a transpor os obstáculos que a vida nos propõe.

Aos meus irmãos, Anderson, Adriana e Andressa, por de uma forma ou outra terem a compreensão, carinho e companheirismo. Agradeço pela convivência e ajuda para tornar-me quem sou.

Aos meus amigos, notadamente Erick, por estar na mesma etapa que eu, soube a rotina da pós graduação e todo auxílio prestado desde sempre.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço a minha orientadora Professora Doutora Rossana Pereira de Almeida que pela segunda vez acreditou e me guiou pela segunda vez na pós graduação, em que pude crescer imensamente.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Raquel Fernanda Gerlach que não deixou de nos apoiar e auxiliar nos trabalhos quanto foi necessário.

À técnica Junia Ramos que tanto se empenhou para que os testes com MMPs fossem realizados a tempo e com maestria.

À pós doutoranda Karina da Mata que me auxiliou com a definição e diretrizes dos testes de atividades das MMPs.

À Fernanda Talita Freitas e Regiane de Cássia Tirado Damasceno, secretárias do departamento de Materiais Dentários e Próteses, pela agilidade, amizade e disponibilidade.

À Mary Carmessano, da secretaria de Pós Graduação, pela cordialidade e atenção.

Ao técnico Edson Volta pelo auxílio e comprometimento nos testes executados.

À técnica Viviane de Cássia Oliveira pela dedicação e tempo dispensado em me auxiliar na execução dos testes microbiológicos.

À Direção da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, representada por seu Diretor, Professora Dra Léa Assed Bezerra da Silva, por sua competência e amizade.

À engenheira Ana Paula Macedo, pela ajuda durante os experimentos e com a análise dos resultados.

Aos técnicos José de Godoi, Lício, Paulo Sérgio, Marcelo, Odair, Júlio, Henrique, Eduardo e Fernando, pela amizade, disponibilidade, e terem sido tão solícitos quando foi necessário.

Todos os alunos de Pós Graduação do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, pela convivência e amizade.

A todos os docentes do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, pela amizade e que de alguma forma me ajudaram.

Todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto que participaram de alguma forma dessa etapa.

Agradeço a todos meus familiares e amigos que me apoiaram e incentivaram nessa jornada.

À CAPES pela bolsa concedida durante o curso de Doutorado.

À Angelus que nos auxiliou com doação de material para os experimentos.

RESUMO

Sturaro, R, H. Análise de solução aquosa de Azadirachtina purificada como agente antimicrobiano e protetor das fibras colágenas e sua influência na força de união de pinos de fibra de vidro fixados com cimento resinoso autoadesivo.

A reabilitação de dentes extensamente destruídos sempre foi um desafio para o profissional. Diversas técnicas são propostas para estes casos, dentre elas a utilização de pinos de fibra de vidro fixados com cimentos resinosos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação da Azadirachtina purificada como agente antimicrobiano, sua ação protetora de colágeno e sua influência sobre a retenção de pinos de fibra de vidro fixados com cimento resinoso autoadesivo. Tratamento endodôntico foi realizado em 100 dentes bovinos com as coroas seccionadas; durante o preparo do espaço para pino foram utilizadas as seguintes soluções: G1: Solução salina 0,9%; G2: solução aquosa de AZD 0,5%; G3: CHX aquosa 2%; G4: Hipoclorito de sódio 2,5%, G5: EDTA 17%. Os pinos de fibra de vidro foram cimentados com cimento resinoso autoadesivo (RelyX U200) e as raízes foram seccionadas em *slices* para o teste de *push out*. Espécimes de cada grupo foram selecionados e preparados para análise por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na análise da concentração inibitória mínima foi utilizada placa de 96 poços em duplicata e foram feitas 10 concentrações diferentes da relação meio de cultura líquida e quantidade de AZD presente. Após tempo de incubação o meio líquido foi semeado em meio sólido para contagem de colônias. Para análise de ação anti proteolítica utilizou-se a zimografia por meio de gel de bisacrilamida 12% e aplicação das amostras: AZD; MMP2 + AZD; MMP2. No teste de fluorimetria foram aplicada na placa as seguintes soluções: AZD; AZD 0,25% + MMP2; AZD 0,5% + MMP2; AZD 1% + MMP2; MMP2; Colagenase. O teste de *push out* mostrou que houve diferença na força de união entre os grupos G1 e G4, sendo G1 com melhor resultado. Pela análise de MEV foi possível verificar a preservação das fibras colágenas quando se utiliza AZD. O teste de inibição mínima não apresentou diferenças e em relação a ação anti-proteolítica da AZD foi possível notar alteração das atividades tanto na análise de zimografia quanto de fluorimetria. Dessa forma, pode-se concluir a solução de Azadirachtina promoveu força de união de pinos de fibra de vidro fixados com cimento resinoso semelhante às outras soluções irrigantes utilizadas; permitiu a manutenção de estrutura dentinária preservada e presença de fibras colágenas após análise por MEV; não apresentou atividade antimicrobiana sobre o *E. faecalis*, e teve ação positiva sobre as propriedades de redução da ação das MMPs.

Palavras Chave: Azadirachtina, Adesão, Dentina, Clorexidina, Sistema Resinoso.

ABSTRACT

Sturaro, R, H. Analysis of aqueous solution of purified Azadirachtin as antimicrobial agent and protector of collagen fibers and its influence on the bond strength of glass fiber post cemented with self adhesive resin cement.

Rehabilitation of widely destroyed teeth has always been a challenge for the dental professional. Several techniques are proposed for these cases, among them the use of fiber glass post, fixed with resin based cements. The objective of this study was to evaluate the action of purified Azadirachtin (AZD) as an antimicrobial agent, its protective action of collagen and its influence on bond strength of glass fiber post fixed with self-adhesive resin cement. For the experiment, endodontic treatment was performed in 100 bovine teeth with sectioned crowns; the bovine roots were divided in groups and the following solutions were used after the root preparation: G1: Saline solution 0.9%; G2: aqueous solution of AZD 0.5%; G3: Aqueous chlorhexidine 2%; G4: 2.5% sodium hypochlorite, G5: 17% EDTA. After the root treatment the fiber glass post were fixed with self-adhesive resin cement (RelyX U200) and the roots were sectioned into slices for the push out test. Specimens from each group were selected and prepared for analysis of scanning electron microscopy (SEM). In the analysis of the minimum inhibitory concentration, 96 wells were used and in duplicate at 10 different concentrations of the liquid culture and the amount of AZD present were used. After incubation time the liquid was seeded in solid medium for colony count. Anti-proteolytic activity analysis was performed using zymography with 12% bisacrylamide gel and applied to the samples: AZD; MMP2 + AZD; MMP2. In the fluorimetry test the following solutions were applied to the plaque: AZD; AZD 0,25% + MMP2; AZD 0,5% + MMP2; AZD 1% + MMP2; MMP2; Collagenase. The push-out test showed that there was a difference in bond strength between groups G1 and G4, with G1 having the best result. In the SEM analysis it was possible to detect dentin that showed the presence of preserved collagen fibers with the solutions studied. The minimal inhibitory concentration test showed no differences and, in relation to the anti-proteolytic test, the action of AZD was possible to note alteration of activities in both the zymography and fluorimetry analysis. Thus, it is possible to conclude that the solution of AZD promoted bond strength of fiberglass post fixed with resinous cement similar to the other irrigating solutions used. Also allowed the maintenance and preserve dentin structure of collagen fibers, observed in the SEM analysis; although did not present bactericidal potential on *E. faecalis*, had reduced action of MMPs.

Keywords: Azadirachtin, Adhesion, Dentin, Chlorhexidine, Resinous System.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Dente seccionado e com tratamento endodôntico finalizado.	42
Figura 2: Remoção do material obturador com broca de Largo, deixando 3 mm apicais.	43
Figura 3: Pino de fibra de vidro cimentado.	44
Figura 4: Divisão para os cortes dos <i>slices</i> utilizados no teste de <i>push out</i>	45
Figura 5: Máquina universal de Ensaio EMIC 2000 (EMIC DL.2000, EMIC, São José dos Pinhais, PR, Brasil) em que foi realizado teste <i>push out</i>	46
Figura 6: Esquema do procedimento do teste <i>push out</i> . A seta azul representa a força aplicada pela máquina.	46
Figura 7: Corpo de prova posicionado na máquina universal de ensaios, para o teste de <i>push out</i>	47
Figura 8: Corpo de prova após a compressão (<i>push out</i>) com visível degrau entre sistema resinoso e dentina.	47
Figura 9: Pellet formado após centrifugação do meio de cultura TSB.	48
Figura 10: Cubeta de leitura do espectrofotômetro.	50
Figura 11: Máquina de espectrofotometro MultiScakn GO(Thermo Scientific, Tokyo, Japão).	50
Figura 12: Preenchimento dos poços com meio inoculado e AZD em diferentes concentrações.	51
Figura 13: Estufa para controle da temperatura a 37°C.	52
Figura 14: Placa em estufa a 37°C para ser guardada por 24 horas.	52
Figura 15: Placa de Petri com meio TSA preparado para inoculação.	53
Figura 16: Esquema de montagem dos dispositivos para conformação do gel de acrilabima e bisacrilamida.	55
Figura 17: Amostras aplicadas no gel de poliacrilamida previamente ao início da corrida.	56
Figura 18: Aplicação das amostras e reagentes para realização da leitura de absorbância em placa opaca de 96 poços.	58
Figura 19: Máquina de leitura da absorbância SpectraMax Gemini EM (San José, California, EUA).	58

Figura 20: Momento prévio a leitura, amostras e reagentes já estavam prontos para realização do teste.	59
Figura 21: Gráfico de média e desvio padrão.	64
Figura 22; 23 e 24: Superfície dentinária intrarradicular de espécime irrigada com solução salina 0,9%. Presença de fibras colágenas em alguns pontos e manutenção da estrutura dentinária.	65
Figura 25; 26 e 27: Superfície dentinária intrarradicular de espécime irrigada com solução de AZD 0,5%. Estrutura dentinária preservada e presença de fibras colágenas.	66
Figura 28; 29 e 30: Superfície dentinária intrarradicular de espécime irrigada com solução de CHX 2%. Presença de estruturas colágenas e preservação da estrutura dentinária.	67
Figura 31, 32 e 33: Superfície dentinária intrarradicular de espécime irrigada com solução de hipoclorito de sódio 2,5%. Pouca e ausência de projeções de fibras, degradação nítida da estrutura dentinária.	68
Figura 34, 35 e 36: Superfície dentinária intrarradicular de espécime irrigada com solução de EDTA 17%. Preservação da estrutura dentinária e manutenção das fibras colágenas.	69
Figura 37: Todos os meios apresentaram crescimentos dos microrganismos. ...	70
Figura 38: Todos os grupos apresentaram crescimento dos microrganismos similares.	70
Figura 39: Gel com aplicação de MMP2 + AZD na proporção 1:1. Rastro a esquerda: 10 uL de AZD + MMP2 ; rastro a direita: 15 uL de AZD + MMP2.	71
Figura 40: Gel controle. Rastro a esquerda (poço 3): MMP2 apenas como controle positivo; rastro a direita (poço 7): AZD apenas como controle negativo não apresentando degradação do gel.	71
Figura 41: Gráfico da relação dos dados da tabela 4. Abcissa “y” Absorbância e abcissa “x” tempo (minutos), mostra a relação atividade x tempo da MMP, MMP + AZD e Colagenase.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações de AZD definidas para teste de concentração inibitória mínima. CP = controle positivo; CN = controle negativo. De 1 para 10 foi realizada diluição na proporção de 1 para 2 até obtermos 10 concentrações diferentes. ...	51
Tabela 2: Resultados do teste de <i>push out</i> , terços cervical e médio. Ao final valor médio por grupo.	61
Tabela 3: Valores do teste ANOVA.	62
Tabela 4: Comparativos.	62
Tabela 5: Valores estimados.	63
Tabela 6: Comparação por pares.	63
Tabela 7: Média seguida do desvio padrão.	64
Tabela 8: Dados de absorvância da máquina de fluorimetria que foram mensurados a cada 5 minutos.	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 PROPOSIÇÃO	39
2.1 Objetivo Geral	39
2.2 Objetivos específicos	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Seleção e Preparo dos Dentes Bovinos:	41
3.2 Preparo dos <i>slices</i> para o teste <i>Push Out</i>	45
3.2.1 Teste <i>Push Out</i>	45
3.3 Análise Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	48
3.4 Concentração inibitória mínima	48
3.4.1 Espectrofotômetro	49
3.4.2 Semeadura do meio sólido	53
3.5 Zimografia	53
3.5.1 Reagentes preparados para realização do gel	53
3.5.2 Preparo do Gel	54
3.5.3 Aplicação e Corrida das amostras	55
3.5.4 Coloração do gel	56
3.6 Fluorimetria	57
3.7 Análise estatística	59
4 RESULTADOS	61
4.1 Teste <i>Push Out</i>	61
4.2 Testes ANOVA e Tukey	62
4.3 MEV	64
4.4 Análise de Concentração Inibitória Mínima	70
4.5 Zimografia	71
4.6 Fluorimetria	72
5 DISCUSSÃO	75
6 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

1 INTRODUÇÃO

A restauração de dentes tratados endodonticamente tem desafiado os profissionais da área de reabilitação, principalmente quando há pouco remanescente dentinário e há necessidade de pinos intrarradiculares. Dentre as opções de tratamento a colocação de pinos de fibra de vidro tem aumentado muito nos últimos anos (NAUMANN et al., 2012). Este tipo de pino é bem aceito devido suas propriedades óticas, seu módulo de elasticidade semelhante ao da dentina, sua habilidade de união, bem como distribuição de forças de modo homogêneo, o que minimiza a ocorrência de fraturas radiculares (MARTELLI et al., 2008). Embora este sistema apresente vantagens consideráveis o problema do fator C desfavorável no interior da raiz e a dificuldade de se controlar a umidade durante os procedimentos de união podem ser salientados como desvantagens (CHERSONI et al., 2005; FARIA-E-SILVA et al., 2014).

A maior prevalência de falhas ocorre nas interfaces pino-resina e resina-dentina (D'ARCANGELO et al., 2007; OHLMANN et al., 2008). Estes fatores exercem grande influência, pois se não for selecionada uma adequada combinação entre o sistema de união dentinária e o cimento resinoso podem ocorrer falhas e a descimentação dos pinos comprometendo a durabilidade do tratamento (SANARES et al., 2001).

Dentes tratados endodonticamente são mais suscetíveis à fratura coronal e radicular (MARTINEZ-INSUA et al., 1998; SCHWARTZ; ROBBINS, 2004; HUSSAIN; MCDONALD; MOLES, 2007; VARVARA et al., 2007). O próprio acesso cirúrgico para tratamento endodôntico gera remoção do teto da câmara pulpar o que promove redução significativa da resistência à fratura gerando comprometimento na longevidade do elemento (SCHWARTZ; ROBBINS, 2004). Existem hoje diversas opções para reforço dental, dentre elas os núcleos de fibra de vidro. Há vantagens no uso deste pino notadamente pela redução de custos, menor tempo de trabalho e eliminação da fase laboratorial exigida pelos núcleos metálicos fundidos (PEREIRA et al., 2005; PEREIRA et al., 2006; DO VALLE et al., 2007; DE OLIVEIRA et al., 2008; ZOGHEIB et al., 2008; PEREIRA et al., 2014). Pinos de fibra de vidro requerem a manutenção de remanescente nativo para sua segura e correta instalação (PEREIRA et al., 2005; PEREIRA et al., 2006; DO VALLE et al., 2007; DE OLIVEIRA et al., 2008; ZOGHEIB et al., 2008; PEREIRA et al., 2009).

Dentre as opções de retentores intrarradiculares, a escolha de pinos de fibra de vidro para a reabilitação desses dentes é viável. Isso porque apresentam propriedades físicas semelhantes à dentina, como módulo de elasticidade, flexibilidade, coeficiente de expansão térmica, além de possibilitar reabilitação estética e apresentarem biocompatibilidade (OLIVEIRA et al., 2018). Logo, a escolha de pinos com técnicas definidas tem ganhado cada vez mais reconhecimento (ALKHUDHAIRY, F. I. et al., 2018). Ademais o pino de fibra de vidro tem melhorado e criado vantagens adicionais à reabilitação de dentes tratados endodonticamente, tais como resistência à corrosão, estética satisfatória, transmissão de luz aprimorada e compatibilidade química aos sistemas adesivos (GARCIA et al., 2018). Podendo igualmente citar sua praticidade na colocação e remoção, quando comparado com pinos metálicos fundidos, também é uma vantagem ao seu uso (GARCIA et al., 2018).

A utilização de pinos pré-fabricados do tipo fibra de vidro mostram as seguintes vantagens aos personalizados: tempo clínico reduzido; resistência à corrosão; resistência à fadiga; propriedades mecânicas semelhantes às do dente; facilidade de remoção do pino quando já instalado; estética; baixo custo; preparo conservador (PEREIRA et al., 2005; PEREIRA et al., 2006; DO VALLE et al., 2007; DE OLIVEIRA et al., 2008; ZOGHEIB et al., 2008; PEREIRA et al., 2009).

Dentes com grande destruição coronal e menos de 2 mm de remanescente cervical há necessidade da utilização de núcleos personalizados, como no caso núcleo metálico fundido. Há possibilidade de confeccionar núcleos a partir de fresamentos em zircônia (LEE, J. H., 2018), porém são de custo elevado e seu módulo de elasticidade é consideravelmente maior que o da dentina (OZKURT; ISERI; KAZAZOGLU, 2010).

Por haver várias etapas para o uso de cimento resinoso convencional, há maior chance de que ocorram falhas e a força de união não seja tão elevada (ANCHIETA et al., 2011). O sucesso dos sistemas de cimentação resinosos está diretamente ligado ao mecanismo de união entre substrato nativo e a prótese (BUENO et al., 2011). Os primeiros cimentos resinosos originados na década de 1950 continham metacrilato de metila e poucas partículas inorgânicas resultando em propriedades físicas inadequadas para cimentação pois havia grande contração de polimerização e assim maior chance de infiltração marginal e, além disso a alteração de cor era nítida (LADHA; VERMA, 2010). Em 1963 Bowen e colaboradores adotaram o Bis-GMA sintetizado a partir da resina epóxi e metacrilato de metila como parte do cimento

resinoso (BOWEN, 1963). Atualmente são utilizados Bis-GMA ou UDMA nos cimentos resinosos para melhorar a fluidez e garantir película mais fina possível na cimentação (LADHA; VERMA, 2010; MANSO et al., 2011). Os cimentos resinosos quimicamente ativados polimerizam pela união de duas pastas e nos fotoativados a polimerização se dá pela união das duas pastas e fotoativação. Pode-se encontrar ainda cimentos "dual", ou seja, combinam a polimerização por meio da luz e a polimerização química, fato que supera as dificuldades clínicas quanto a localizações difíceis de cimentação (BUENO et al., 2011; HADDAD; ROCHA; ASSUNCAO, 2011). Dentre os cimentos de última geração tem-se os cimentos autoadesivos e como principal característica destes a redução de sensibilidade dentinária pós operatória, uma vez que uma camada de *smear layer* é mantida, o que garante menor interação com a porção sensível do dente (VAN MEERBEEK et al., 2011).

A simplificação dos passos para instalação de próteses com cimento resinoso mostrou que a sensibilização de problemas e consequentemente falhas apresenta-se menor (RADOVIC et al., 2008; AGUIAR et al., 2010; PISANI-PROENCA et al., 2011). Entretanto há controvérsias; quando se comparam estudos relacionados a cimentação resinosa, há relatos de que a resistência de união dos cimentos resinosos autoadesivos mostram menor força de retenção do que os cimentos resinosos convencionais devido a manutenção da camada de *smear layer* que permanece durante o processo de adesão no primeiro (SANTOS, M. J. et al., 2011). Os cimentos resinosos diferem das resinas compostas por apresentar menor quantidade de partículas inorgânicas e viscosidade reduzida (LADHA; VERMA, 2010; SIMON; DARNELL, 2012). Os cimentos resinosos apresentam, ainda, menor microinfiltração, baixa solubilidade, maior retenção e maior resistência à fratura quando comparado aos demais cimentos com mesma finalidade (BEHR et al., 2003; HADDAD; ROCHA; ASSUNCAO, 2011).

Sistemas resinosos têm indicação para tratamentos livres de metal que buscam altos níveis de estética, sendo assim o material de eleição (BEHR et al., 2003; HADDAD; ROCHA; ASSUNCAO, 2011). Para apresentar melhor desempenho o cimento deve apresentar forte união ao substrato dentinário e à restauração e para isso o nível de polimerização é fundamental para resultar em sucesso (SOARES, C. J. et al., 2005). Como citado anteriormente pode-se encontrar três formas de polimerização: física, química e dual (SANTOS, G. C., JR.; SANTOS; RIZKALLA, 2009; MANSO et al., 2011).

Xiong et al. (2019) mostraram que o simples passo da cimentação adesiva orientada pelos fabricantes já apresenta bons resultados, porém quando há associação de outros elementos, como por exemplo ultrassom e laser de baixa intensidade pode haver melhora no processo adesivo (XIONG et al., 2019).

Para a fixação dos pinos de fibra de vidro, basicamente são utilizados: uso direto em que o pino e conduto são besuntados com cimento manipulado e levados à raiz dental preparada e a técnica direta-indireta onde o pino de fibra de vidro recebe resina composta para ser modelado no conduto e então polimerizado, são os denominados pinos anatômicos que são conformados de acordo com anatomia do conduto para então ser feita a sua fixação (DAL PIVA et al., 2018; LORENZETTI et al., 2019; PHEBUS et al., 2019). Ramos et al. (2018) utilizaram trinta caninos humanos tratados endodonticamente e preparados para receber núcleo de fibra de vidro, os quais foram divididos randomicamente em três grupos de dez elementos cada. Estes receberam cimentação com RelyX ARC; RelyX U200 e Ionômero de vidro (GC Gold Label Luting e Lining), em seguida os dentes foram incubados em saliva por 6 meses. Os espécimes foram seccionados transversalmente obtendo porção cervical, média e apical que passaram por teste de *push out*. Ao final foi possível notar que a força de adesão entre cimento resinoso RelyX e ionômero de vidro foram similares. (RAMOS et al., 2018b)

Ramos et al. (2018) analisaram a ação da aplicação de técnica fotodinâmica com laser e analisaram a eficiência do sistema adesivo. Para o experimento foram selecionados 40 caninos que receberam tratamento endodôntico e preparados para receber pino de fibra de vidro. Os dentes foram separados em grupos de acordo com o protocolo de cimentação e uso de laser: cimentação convencional; cimentação auto-adesiva; laser + cimento convencional; laser + cimento auto-adesivo. Após cimentação dos pinos as raízes foram seccionadas em três terços: apical, médio e cervical. Os *slices* obtidos foram submetidos a teste de *push out* e em seguida foi realizada a microscopia confocal. Os autores constataram que a associação de laser e cimento convencional foi o grupo que apresentou menor força de adesão. Todos os outros grupos apresentaram força de adesão similar, concluindo que o laser pode gerar redução da força adesiva em caso de cimentos não auto condicionantes (RAMOS et al., 2018a).

Maroulakos et al. (2018) em sua revisão mostraram que a utilização de cimentos diferentes, como não resinosos podem apresentar alteração na adesão do pino a ser instalado. (MAROULAKOS; HE; NAGY, 2018)

A união resina-dentina apresenta-se, ainda, como um desafio quanto à adesão para os vários produtos já desenvolvidos. (KOSHIRO et al., 2005; CECCHIN et al., 2011b) A perda da integridade da interface resina-dentina acontece, prioritariamente por dois motivos, a hidrólise dos componentes da resina (YIU et al., 2004) assim como pela ação de enzimas endógenas que degradam as fibras colágenas presentes na dentina, denominadas Metaloproteínas de Matriz (MMP)(PASHLEY et al., 2004). Estas proteínas são encontradas em dentina coronal e radicular (MAZZONI et al., 2007; SANTOS, J. et al., 2009). Na literatura já existem trabalhos mostrando bons resultados quanto à inativação ou redução da atividade degradativa das MMPs (NASCIMENTO et al., 2018).

O espaço entre as fibras colágenas expostas é de 11 a 30 nm em média (TALUNGCHIT et al., 2014). O adesivo envolve estas fibras e penetra na camada previamente desmineralizada, esta situação é denominada camada híbrida (NAKABAYASHI; KOJIMA; MASUHARA, 1982).

A degradação da camada híbrida é praticamente inevitável (SANO, 2006; SPENCER et al., 2010). Apesar de haver grandes esforços para aprimorar a adesão, a umidade da dentina tem gerado problemas como reportam alguns estudos na literatura (HASHIMOTO et al., 2000; DE MUNCK et al., 2003; ARMSTRONG, S. R. et al., 2004; HEBLING et al., 2005; GARCIA-GODOY et al., 2010). A falha do sistema adesivo é a geração de micro-espaços. O uso de resinas compostas têm demonstrado resultados limitantes e risco de fratura e formação de lesão cáriosa (DRUMMOND, 2008; OPDAM et al., 2010). Cáries recorrentes em elementos com restauração de resina composta apresentam como falha prioritariamente infiltração marginal e lesão cáriosa (FERRACANE, JACK L., 2013).

Sabe-se que a deterioração crônica da interface de adesão ocorre pela hidrólise e lixiviação do adesivo (ALKHUDHAIRY, FAHAD I. et al., 2018; GARCIA et al., 2018; LEE, J. H., 2018). Com a infiltração na camada híbrida as fibras colágenas tornam-se susceptíveis ao ataque das enzimas colagenolíticas (OHLMANN et al., 2008; LADHA; VERMA, 2010).

Quanto à degradação da camada híbrida tem-se dois padrões prevalentes: desorganização das fibras colágenas e perda da resina que permeia as fibras (PHEBUS et al., 2019).

Groos e Charles publicaram pela primeira vez sobre as MMPs (GROSS; LAPIERE, 1962). Hoje sabe-se que as MMPs estão envolvidas em diversos processos fisiológicos como desenvolvimento embrionário, processo cicatricial, erupção dental, doença periodontal, enfisema pulmonar, osteoporose, doenças cardiovasculares e outros (WOESSNER, 1991; RYAN; RAMAMURTHY; GOLUB, 1996). As MMPs são divididas em seis grupos de acordo com suas funções, similaridade e domínio: colagenases que enquadram MMP1, MMP8, MMP13, MMP18; estromelinas que incluem MMP3 e MMP10; gelatinases que incluem MMP2 e MMP9; colagenases tipo 4 que enquadram MMP7 e MMP 26; metaloproteinases de membrana incluem MMP14; MMP15; MMP16, MMP17, MM24 e MMP25; metaloelastase que inclui MMP12 (GUSMAN; SANTANA; ZEHNDER, 2002).

A dentina apresenta diversas enzimas endógenas, o grupo mais abrangente e conhecido são as metaloproteinases de matriz (MMP) (MAZZONI et al., 2006; SULKALA et al., 2007; TJADERHANE et al., 2013). Estas enzimas são expostas e ativadas durante o processo de desafio ácido (PASHLEY et al., 2004; MAZZONI et al., 2006). Estas são responsáveis pela degradação de praticamente toda matriz extracelular (MAZZONI et al., 2007). O complexo dentinário apresenta ao menos quatro tipos desta enzima: MMP3 (TALUNGCHIT et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2018), MMP8 uma colagenase (NASCIMENTO et al., 2018), gelatinases MMP2 e MMP9 (SANO, 2006; SPENCER et al., 2010).

Atualmente sabe-se que durante o preparo do sistema adesivo a ação dessas enzimas é ativada (DE MUNCK et al., 2003; ARMSTRONG, S. R. et al., 2004; LADHA; VERMA, 2010; SPENCER et al., 2010) e isto pode causar degradação de parte da camada híbrida, notadamente quando há infiltração de umidade (SANARES et al., 2001; ARMSTRONG, S. R. et al., 2004).

Como inibidor de MMPs e prolongador da vida útil da camada híbrida pode-se lançar mão do uso de clorexidina (CHX) (GROSS; LAPIERE, 1962; WOESSNER, 1991; RYAN; RAMAMURTHY; GOLUB, 1996; GUSMAN; SANTANA; ZEHNDER, 2002), metacrilatos de amônio quaternários ou cloreto de benzalcônio (MAZZONI et al., 2006; SULKALA et al., 2007). Uma alternativa é o uso de *cross linker* de colágeno que liga fortemente o colágeno ao sistema resinoso evitando assim exposição do

colágeno para as enzimas (TJADERHANE et al., 2013). Alguns autores ainda propuseram remineralização da dentina bem como uso de álcool durante o preparo do sistema adesivo (RYAN; RAMAMURTHY; GOLUB, 1996; GUSMAN; SANTANA; ZEHNDER, 2002; MAZZONI et al., 2006; SULKALA et al., 2007; BRESCHI et al., 2010; TJADERHANE et al., 2013).

Pode-se citar duas formas de regular a degradação do colágeno pelas MMP:

1) Utilizando substâncias inibidoras ou redutoras da atividade gelatinolítica local, dentre elas pode-se citar a CHX em diversas concentrações (4,0%; 2,0%; 1,0%; 0,12%; 0,02%; 0,002%) que já apresentaram resultados muito similares em estudos quanto à adesão (CAMPOS, E. A. et al., 2009; BRESCHI et al., 2010). Quanto a sistemas auto adesivos a indicação é evitar concentrações superiores a 0,2% por mais de 30 segundos (BRESCHI et al., 2009).

2) Aumentar a resistência das fibras colágenas em relação às enzimas degradantes. O colágeno demonstra força de união e resistência devido a ligações cruzadas presentes em sua estrutura, estas ligações também apresentam resistência à degradação. Diversas soluções podem melhorar o número de ligações cruzadas do colágeno, como por exemplo: glutaraldeído, genipinm etildimetilaminopropil carbodiamida, ácido tânico e proantocianidina. (KOIDE; DAITO, 1997; SUNG et al., 1999; BEDRAN-RUSSO, A. K. et al., 2007; BEDRAN-RUSSO, A. K. et al., 2008; WALTER et al., 2008; BEDRAN-RUSSO, A. K. B. et al., 2009; BEDRAN-RUSSO, A. K. et al., 2010; TALUNGCHIT et al., 2014)

Além das MMPs alguns autores relatam a presença de outras enzimas potencialmente colagenolíticas presentes na polpa dental e secretadas pelos odontoblastos, estas enzimas são conhecidas como catepsinas cisteína (CP). Em estudo descrito em literatura HASHIMOTO et al. (2000) e HEBLING et al. (2005) demonstraram que tanto em dentes hígidos quanto em dentes com processo carioso instalado há atividade de MMPs e CPs, além disso houve aumento significativo da atividade dessas enzimas em sítios com lesão ativa quando comparados com locais sem lesão, isso levou os autores a crer que a degradação da porção orgânica da dentina não é fruto exclusivo das MMPS.

A CHX além de ótimo antimicrobiano é um efetivo inibidor das MMPs 2, 8 e 9, ou seja, inibidor de collagenases (CAMPOS, E. A. et al., 2009) e catepsinas de cisteína (BRESCHI et al., 2009). A literatura mostra diversos estudos em que a CHX mostrou ação inibitória frente às MMPs, consequentemente preservando a camada híbrida e

melhorando a força de união adesivo / dentina (GROSS; LAPIERE, 1962; KOIDE; DAITO, 1997; MARTINEZ-INSUA et al., 1998; SUNG et al., 1999; BEDRAN-RUSSO, A. K. et al., 2007; WALTER et al., 2008; BEDRAN-RUSSO, A. K. B. et al., 2009; BEDRAN-RUSSO, A. K. et al., 2010; PEREIRA et al., 2014). Concentrações entre 0,05% e 0,2% de CHX já são suficientes para apresentar inibição das MMPs (LADHA; VERMA, 2010; ANDRE, CAROLINA BOSSO et al., 2013) e concentrações entre 0,5 % e 2,0% podem inibir parcialmente a ação do primer no sistema adesivo(ANDRE, C. B. et al., 2013).

Em alguns experimentos foi adicionada CHX ao sistema adesivo (0,2 a 2,0%) e verificaram que houve aumento da resistência à flexão e módulo de elasticidade, ao mesmo tempo ficou claro que não obtiveram melhora quanto à absorção de água e causou atraso ou redução na quantidade de monômeros polimerizados (DELAI et al., 2018). MATOS et al. (2017) mostraram em experimento que uso de inibidores em diversas concentrações pode levar à melhor preservação da camada híbrida, uma vez que o inibidor pode ser liberado lentamente e a inibição do sítio em contato ser prolongado (PECIULIENE et al., 2008; DELAI et al., 2018).

Galardin é um inibidor de MMP sintético que tem forte relação com MMP 1, 2, 8 e 9 (WOESSNER, 1991). Alguns estudos de incorporação do Galardin ao sistema adesivo mostraram aumento da força de união dos sistemas adesivos (GUSMAN; SANTANA; ZEHNDER, 2002). Além disso, Galardin também apresentou inibição de atividade colagenolítica 10 a 100 vezes melhor que no caso da CHX (WOESSNER, 1991).

A tetraciclina apresenta ação quelante e pode inibir atividade das MMPs (PASHLEY et al., 2004; SIQUEIRA; ROCAS, 2008; BARAS et al., 2019). SOARES, J. A. et al. (2019) mostra em seus trabalhos que a doxiciclina (muito similar a tetraciclina) tem forte ação regulatória de degradação das fibras colágenas da dentina, uma vez que pode quelar zinco.

Doxiciclina é uma substância antimicrobiana amplamente utilizada em situações como infecções geradas por traumas, sífilis, cólera e outros (CUNHA; SIBLEY; RISTUCCIA, 1982). Recentemente foi verificado que a doxiciclina tem ação quelante (LIPOWSKY; SAH; LESCANIC, 2011) e conseqüentemente pode inibir eficientemente a ação das MMPs (LIPOWSKY; SAH; LESCANIC, 2011; PIMENTA et al., 2013; JUNG et al., 2016).

Pode-se encontrar em literatura que extratos de chá verde podem apresentar ação inibitória de MMPs com diferentes intensidades em determinados tipos de MMPs (SARKAR et al., 2016; CHOWDHURY et al., 2017).

A família dos bisfosfonatos também mostrou ação inibitória da ação das enzimas degradantes de matriz extracelular, possivelmente pela ação quelante de zinco e cálcio (GOMES FRANCA et al., 2015). Alguns autores mostraram que o ácido polivinilfosfórico (PVFF) teve efeitos inibitórios sobre as MMPs com grande eficiência (LEITUNE; COLLARES; WERNER SAMUEL, 2010). Mais eficiente que a CHX o PVFF pode envolver as fibras colágenas protegendo-as dos danos enzimáticos (GURGAN; BOLAY; KIREMITCI, 1999).

Com mecanismo similar ao da CHX os compostos quaternários de amônio inibem efetivamente a MMP 9, notadamente em situação de dentina desmineralizada (MAZZONI et al., 2006). O composto denominado brometo de 12-metacrilóiloxidodecilmiridínio é um bom agente antimicrobiano e pode ser adicionado aos *primers* de sistemas autoadesivos sem problemas quanto a polimerização (WANG, L. et al., 2013; DE ARAUJO et al., 2014). Cloreto de benzalcônio foi testado contra ação da MMP 2, 8 e 9 e mostrou-se como um ótimo inibidor (SULKALA et al., 2007). O Cloreto de benzalcônio também foi utilizado em sistemas adesivos e mostrou melhor durabilidade da camada híbrida (BEDRAN-RUSSO, A. K. et al., 2014; VIDAL et al., 2014).

Os agentes formadores de *cross link* têm capacidade de melhorar a estabilidade do colágeno de regiões de dentina desmineralizada (FABRY; OKEMO; ANSORG, 1998; PAI; ACHARYA; UDUPA, 2004). O uso de glutaraldeído, proanthocyanidin, genipina (SHARMA et al., 2014), riboflavina (VEERARAGHAVAN et al., 2011), ácido tânico (MUKESH et al., 2014) e carbodiimida (TJADERHANE et al., 2013) (70) mostraram melhora considerável na estabilidade estrutural das fibras colágenas e mantendo as uniões da camada híbrida, tornando assim esta relação mais duradoura (TANDAN et al., 1990; VANKA et al., 2001; CHIASSON; BOSTANIAN; VINCENT, 2004; VENZON et al., 2008; ELUMALAI et al., 2012).

Para PASHLEY et al. (2011), as técnicas de adesão que consistem de 3 passos (condicionamento e limpeza) e de 2 passos (sistemas auto condicionantes) são considerados os padrões de ouro. A técnica de 2 passos é a mais utilizada devido dificuldades de se garantir um condicionamento homogêneo de todas as superfícies

e uma completa lavagem do ácido quando da utilização da técnica de 3 passos (CHERSONI et al., 2005).

O novo sistema de cimentos autoadesivos não requer condicionamento ácido da estrutura dental e a aplicação de agentes de união antes da cimentação. Isto simplifica o procedimento de cimentação porque se reduz o número de passos quando comparado aos procedimentos convencionais (RADOVIC et al., 2008; FERRACANE, J. L.; STANSBURY; BURKE, 2011; ANDRE, C. B. et al., 2013). A aplicação de cimentos auto condicionantes poderia ser mais complexa do que nos cimentos autoadesivos particularmente devido à evaporação do solvente, remoção do excesso de adesivo e fotopolimerização nas áreas apicais. Por outro lado há autores que citam que os cimentos autoadesivos podem levar à deposição de fosfatos de cálcio na dentina que são instáveis em meio aquoso, interferindo com a integridade da união (FERRACANE, J. L.; STANSBURY; BURKE, 2011; VAN MEERBEEK et al., 2011). Mesmo assim, o uso de cimentos autoadesivos pode melhorar a retenção de pinos de fibra de vidro no interior do canal (SARKIS-ONOFRE et al., 2014). Poucas informações estão disponíveis sobre as reações químicas e a durabilidade de união destes cimentos (ANDRE, C. B. et al., 2013).

A contaminação secundária do conduto radicular tem sua origem com a simples exposição da dentina com o meio bucal (HARAGUSHIKU et al., 2015), o que ocorre com o preparo do conduto radicular sem o devido isolamento absoluto. A saliva tem sido considerada a maior fonte de contaminação pós preparo, principalmente quando a guta-percha é removida sem proteção dos terços médio e cervical, deixando remanescente de 3-4mm apical (HARAGUSHIKU et al., 2015).

Delai e colaboradores (DELAI et al., 2018) demonstraram a influência negativa da contaminação do sistema radicular por microrganismos (principalmente *E. faecalis*) em que houve redução da força adesiva de sistemas auto adesivos. A recontaminação do conduto preparado, na maioria das vezes, acontece por microrganismos mais resistentes e de difícil controle (PECIULIENE et al., 2008). Outros autores relatam que a presença de bactérias gram negativas são as de mais fácil colonização devido aos fatores que provém do conduto endodôntico (SIQUEIRA; ROCAS, 2008). A espécie mais prevalente em contaminações intracanaís é o *Enterococcus faecalis* por ser de rápida proliferação e por ser um microrganismo anaeróbio facultativo se adapta bem ao ambiente com ou sem a presença de oxigênio (CAMILLOTO et al., 2010; KASIC et al., 2017; BARAS et al., 2019; SOARES, J. A. et al., 2019).

Em estudo, 80 blocos de dentina foram esterilizados, setenta foram incluídos em 0,1 mL de inoculo bacteriano fresco e mantido 7 dias sobre umidade e temperatura controlada. Assim, foram divididos em oito grupos (n=10) de acordo com método de descontaminação: 1: 2,5% NaOCl; 2: 2,5% NaOCl + terapia fotodinâmica com azul de metileno, 18 J por 180 segundos; 3: 2,5% NaOCl + terapia fotodinâmica com azul de metileno 8J por 80 segundos; 4: azul de metileno; 5: terapia fotodinâmica e azul de metileno 18J e 180 segundos; 6: terapia fotodinâmica e azul de metileno 8J por 80 segundos; 7: grupo positivo; 8: grupo negativo. Avaliação foi realizada por crescimento em meio e posterior análise em espectrofotometria com UV. Os autores constataram que apenas terapia fotodinâmica não foi capaz de eliminar os microrganismos com a mesma eficácia do que a associação com NaOCl (ESTRELA et al., 2018).

Visto que adesão em dentina ainda é um obstáculo para o profissional todos os fatores precisam contribuir para aumentar consideravelmente a relação de união. Assim, vários fatores devem ser considerados: Enzimas collagenases, *smear layer*, estado da dentina, interações com cimento, agentes irrigantes.

A CHX foi introduzida como uma solução irrigante com ação antimicrobiana com largo espectro de ação e relevante substantividade o que faz com que essa solução seja utilizada em dentina coronal e radicular reduzindo a atividade proteolítica (CECCHIN et al., 2011a; GOMES FRANCA et al., 2015). De acordo com LEITUNE; COLLARES; WERNER SAMUEL (2010) embora este potencial proteolítico tenha sido demonstrado, sua ação positiva não é detectada imediatamente, principalmente na dentina radicular, o que pode comprometer a adesão coesiva do cimento à dentina. Assim, este pré-tratamento com CHX pode ser um problema se a substância interferir nos procedimentos de união. Na literatura há resultados conflitantes, alguns estudos sugerem que a CHX afeta a resistência de união (GURGAN; BOLAY; KIREMITCI, 1999; WANG, L. et al., 2013; DE ARAUJO et al., 2014) enquanto outros estudos reportam que a CHX não afeta a união ou a microinfiltração de sistemas de união (DE CASTRO et al., 2003; COLLARES et al., 2013). HIRAIISHI et al. (2009; 2010) investigando o efeito do pré tratamento da dentina com CHX e sua influência na força de união e microinfiltração de cimentos auto-adesivos chegaram à conclusão de que essa substância reduziu a força de união e produziu maior microinfiltração. A CHX pode auxiliar inibindo a ação das MMPs sobre as fibras de colágeno (PASHLEY et al., 2004; CECCHIN et al., 2011b), porém já foi mostrado que esta exerce ação negativa sobre a camada híbrida dentro de 18 a 24 primeiros meses da confecção do processo

restaurador (RICCI et al., 2010). Algumas substâncias recentemente estudadas têm demonstrado grande valor na proteção das fibras colágenas quanto à degradação enzimática. Esta proteção se dá pela união da substância às fibras de modo que a ação degradativa não acontece, substâncias que agem desta forma são denominadas “cross linkers”. A proanthoyanidina (PTH) apresenta característica de um *cross linker* (EPASINGHE et al., 2013; BEDRAN-RUSSO, A. K. et al., 2014; VIDAL et al., 2014; LEE, J.; SABATINI, 2017). A PTH atua de forma a melhorar as propriedades biomecânicas bem como bioestabilidade da dentina desmineralizada (CASTELLAN et al., 2010; VIDAL et al., 2014). Além disso, ocorre aumento imediato da força de adesão resina-dentina (AL-AMMAR; DRUMMOND; BEDRAN-RUSSO, 2009).

Na literatura há resultados conflitantes, alguns estudos sugerem que a CHX afeta a resistência de união (GURGAN; BOLAY; KIREMITCI, 1999; WANG, L. et al., 2013). SANTANA et al. (2015) realizaram experimento analisando técnica de instrumentação, solução irrigante, envelhecimento dos espécimes a adesão do cimento resinoso quando usado para cimentação de pinos de fibra de vidro. Constataram que o uso de hipoclorito de sódio foi satisfatório em relação à CHX no que diz respeito à adesão em teste *push-out*. HIRAISHI et al. (2009) investigando o efeito do pré tratamento da dentina com CHX e sua influência na força de união e microinfiltração de cimentos autoadesivos chegaram à conclusão de que essa substância reduziu a força de união e produziu maior microinfiltração.

Visando a dificuldade de se desenvolver um protocolo de assepsia do conduto intrarradicular já preparado para receber a cimentação do pino de fibra de vidro é necessário que se alcance novas opções para este passo. A *Azadirachta indica* ou mais comumente conhecida por “Neem” ou “Nim”, uma espécie de planta já bastante conhecida pela ciência (KUMAR; NAVARATNAM, 2013), pode ser uma opção. Desde tempos pré-históricos extratos de neem são usados pela humanidade. Na civilização antiga de Harappa (Índia) foram encontrados extratos de neem em potes quem indicavam a realização de cirurgias e fitofarmacologia antiga, datada de 4500 anos atrás. Da árvore Neem são utilizados: frutos, sementes, óleo, folhas, raízes e casca de acordo com a situação (KUMAR; NAVARATNAM, 2013). Segundo alguns autores (BISWAS et al., 2002), 135 compostos foram isolados e estudados de diversas partes da *Azadirachta indica*. Dentre as substâncias extraídas pode-se encontrar anti-inflamatórios (JAIN, A.; BASAL, 2003), antibacterianos (FABRY; OKEMO; ANSORG, 1998; PAI; ACHARYA; UDUPA, 2004), antifúngicos (FABRY; OKEMO; ANSORG,

1998; NATARAJAN et al., 2002) e imunomoduladores (UPADHYAY et al., 1992). Mukesh et al. (2014) relataram que o uso da forma tópica de extratos de *Azadirachta indica* age de forma eficaz como repelente do mosquito *Aedes aegypti*. Alguns autores relatam que a interação de compostos extraídos do Neem podem decrescer ou até mesmo inibir a ação dos fatores de crescimento (IGF) (SHARMA et al., 2014). Alguns autores mostraram que extratos de Neem podem auxiliar na indução de apoptose de células cancerígenas (VEERARAGHAVAN et al., 2011; ELUMALAI et al., 2012), Componentes isolados das folhas de Neem podem interferir na proliferação e crescimento de células cancerígenas. Especula-se a atividade anticariogênica de extratos de Neem para controle de *Streptococcus mutans* para uso em forma de colutório (VANKA et al., 2001).

As principais substâncias extraídas são uma mistura de 3 a 4 correlatos, que podem ser modificados em 20 outros de menores estruturas. Estes pertencem a classe dos produtos naturais denominados tetranortriterpenoides, mais especificamente limonóides. Dos derivados de Neem são encontrados nove limonóides de interesse para uso nas ciências de saúde. Dentre estes limonóides podemos citar: azadiractina, nimbin, nimbinin, nimbidinin, nimbolide, ácido nimbidico (BISWAS et al., 2002).

Os extratos de Neem são amplamente usados como defensivos agrícolas e eficientes no controle de pragas como agentes naturais apresentando curto efeito residual (CHIASSEON; BOSTANIAN; VINCENT, 2004), além de toxicidade significativamente baixa para seres humanos (VENZON et al., 2008).

Extratos alcoólicos de folhas de Neem têm baixa toxicidade e os limites para uso estabelecidos foram de 176 mg/Kg de massa corpórea (TANDAN et al., 1990).

Shah et al. (2016) mostraram a eficiência da Azadiractina (AZD), substância extraída dos vários extratos de Neem, contra *Enterococcus faecalis* em tratamento endodôntico. O estudo afirma que mesmo em concentrações de 2,6%, a solução de AZD mostrou eficiência similar ao do Hipoclorito de Sódio 3%. Kankariya et al. (KANKARIYA; PATEL; KUNTE, 2016) concluíram que solução aquosa de AZD 40% é similar a ação de CHX 0,2% no controle do *Streptococcus mutans* presente no biofilme de crianças na faixa de 8 a 12 anos. (SHAH et al., 2016)

A adesão à parede dentinária ainda é um desafio na rotina clínica. A relação entre sistema adesivo e esmalte já é bastante conhecida e existe grande gama de

produtos para este fim que já mostraram resultados bastante satisfatórios (ROSA; PIVA; SILVA, 2015).

Um estudo de Haragushiku (2015) em que 53 dentes tratados endodonticamente foram submetidos a contaminação por *E faecalis* por 1 hora e 30 dias. Para limpeza dos condutos foi realizada irrigação de acordo com os seguintes grupos: NaOCl 2,5%; CHX 2%; água estéril. Cimentação foi realizada de acordo com as indicações do fabricante e realizaram teste *push out*. A descontaminação com solução NaOCl foi verificada apenas no grupo de 1 hora. Com CHX ambos os tempos mostraram efetividade. NaOCl não mostrou influência na força de adesão. No grupo CHX foi observado valores de adesão mais altos. Em microscopia eletrônica de varredura foi detectada presença de *tags* em ambos grupos irrigantes. Concluindo, a CHX mostrou melhores resultados em ambas análises, tanto na força de adesão quanto na eliminação de microrganismos (HARAGUSHIKU et al., 2015).

Quanto ao tipo de união entre sistema resinoso e dentina UBALDINI et al. (2018) e colaboradores realizaram experimento utilizando a técnica *pull out*, micro-Raman para cimentos resinosos convencionais, autoadesivos e auto condicionantes; chegaram à conclusão de que a interação cimento resinoso – dentina acontece prioritariamente pela interação química. (UBALDINI et al., 2018)

Estudos que envolvem análises dos componentes da dentina requerem testes específicos. A zimografia foi proposta para analisar a atividade de enzimas presentes em diversas situações da fisiologia animal (LEBER; BALKWILL, 1997); os alvos da zimografia são as atividades de MMPs já identificadas com ação gelatinolítica, ou ainda colagenolítica (TOTH; SOHAIL; FRIDMAN, 2012). Portanto, o teste de zimografia pode ser utilizado em diversas situações, notadamente patológicas, como por exemplo, doença periodontal (TAJHYA; PATEL; BEETON, 2017).

No presente estudo foram utilizados dentes bovinos para as análises devido à grande similaridade com a micro estrutura dentinária (dentina e esmalte) apresentada pelo dente humano e, também, pela facilidade de obtenção dos mesmos (NOVAIS et al., 2016; SOARES, F. Z. et al., 2016).

Vários testes de estresse são aplicados em análises de materiais odontológicos. Dentre eles, o *push out* tem sido usado com grande frequência para estudos da relação dentina e sistema resinoso quanto à sua resistência (ARMSTRONG, S. et al., 2010). O teste *push out* tem sido o mais utilizado quando a

análise requer a verificação da resistência de união entre 2 materiais diferentes (EL MOURAD, 2018).

KURTZ et al. (2003) relatam que o teste de *push-out* apresenta resultados mais fiéis do que tensão de cisalhamento, uma vez que o rompimento ocorre paralelamente à interface de adesão. Porém, Goracci et al. (2005) relatam que os resultados deste teste são de modo geral, maiores do que em outros testes similares, fato originado possivelmente pela fricção durante o deslocamento, que cria tensão na interface da restauração. (KURTZ et al., 2003; GORACCI et al., 2005)

Outro método de análise dos materiais odontológicos é a análise pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). A microscopia teve grande evolução quando a microscopia eletrônica de varredura foi incorporada aos meios de análises. Em 1935 houve o primeiro trabalho descrito com o conceito de microscopia eletrônica (Knoll, 1935). Posteriormente Ardenne (1938) desenvolveu um microscópio eletrônico de varredura e transmissão. Mais tarde Zworykin (1942) desenvolveu a transmissão de elétrons e sensores de captação de elétrons. Em 1960 foi desenvolvido o sistema que transforma os feixes eletrônicos em luz para melhor resolução (EVERHART; THORNLEY, 1960). Na Odontologia a microscopia eletrônica de varredura é aplicada para analisar seus diversos seguimentos, notadamente em materiais odontológicos, mas também no comportamento biológico responsivo e o comportamento de substâncias em meio oral.

O presente trabalho visa analisar uma solução alternativa, AZD, para CHX como agente de limpeza pré cimentação de pinos de fibra de vidro associado a sistemas de cimentação resinosos, de modo que apresente características de controle antimicrobiano, aprimoramento da adesão em substrato dentinário e não interaja negativamente com o sistema resinoso.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo foi analisar a ação da Azadirachtina purificada, utilizada na fase de preparo intrarradicular, sobre a força de união de pinos de fibra de vidro fixados com cimento resinoso autoadesivo em dentes bovinos tratados endodonticamente, analisar seu potencial bactericida/bacteriostático e sua atividade antigelatinolítica.

2.2 Objetivos específicos

- a) análise da força de união do cimento resinoso à dentina radicular pelo teste de *push out* comparando a ação da Azadirachtina purificada com outras soluções irrigantes: soro fisiológico, CHX, hipoclorito de sódio e EDTA;
- b) análise das características da superfície tratada com as diferentes soluções irrigantes após o teste de resistência de união, por meio de microscopia eletrônica de varredura;
- c) análise do potencial bactericida / bacteriostático da Azadirachtina sobre o microrganismo *E. faecalis*;
- d) Análise da atividade antigelatinolítica da Azadirachtina, por meio da técnica de zimografia e fluorimetria

3 MATERIAL E MÉTODOS

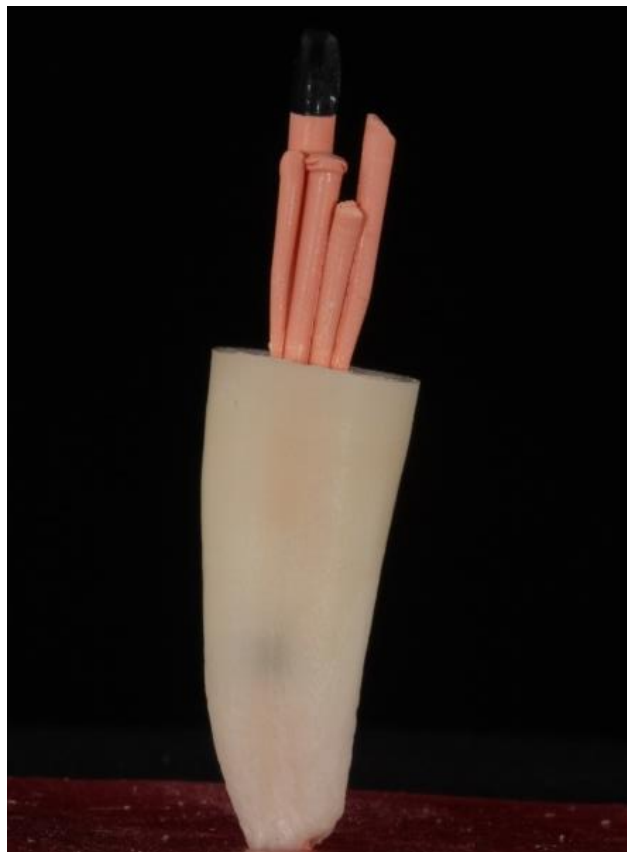
3.1 Seleção e Preparo dos Dentes Bovinos:

Foram selecionados 100 dentes incisivos centrais bovinos hígidos, limpos e retos. Os dentes tiveram sua raiz seccionada obtendo-se 18 mm da porção radicular para padronização dos tratamentos endodônticos e preparo do conduto (Figura 1). Dentes com ápices não formados foram excluídos da pesquisa.

Os dentes foram tratados endodonticamente de acordo com a seguinte técnica:

Para exploração do canal foi utilizada inicialmente uma lima endodôntica # 15 (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suíça), que foi introduzida até que aparecesse no ápice da raiz, em seguida recuou-se 1mm (milímetro), para que se atingir o comprimento de trabalho. A instrumentação do canal foi feita inicialmente com as limas #15 à #40, para formar o batente apical. Após isso foi realizado o escalonamento radicular, com recuos de 1mm a cada troca de lima, das limas #40 à #80; à partir da lima #80, foram utilizadas brocas de Largo de #2, #3 e #4 (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suíça), recuando-se 2mm a cada troca de broca. Durante as trocas de limas e brocas, foi realizada a irrigação do canal com solução Dakin (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil). Após a instrumentação e irrigação dos canais, os condutos foram secos com papel absorvente (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suíça) e obturados com cone de guta percha #40 (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suíça) e cones acessórios R7 e R8 (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suíça). Como cimento endodôntico foi utilizado o cimento resinoso Sealer 26 (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suíça), manipulado e espatulado de acordo com as instruções do fabricante. Concluído o tratamento endodôntico os dentes foram armazenados em umidade relativa de 100%, por um período de 72 horas.

Figura 1: Dente seccionado e com tratamento endodôntico finalizado.



Decorridas as 72 horas foi realizada a remoção do material que preenche o conduto preservando-se 3 milímetros apicais (Figura 2). Foi realizada inspeção clínica do conduto para avaliar se a exposição da dentina foi plena, esta etapa foi realizada por meio de visualização com auxílio de lupas de aumento. Nesta etapa os dentes foram divididos em 5 grupos que tiveram seus condutos irrigados com 2 mL, pelo tempo de 1 minuto das seguintes soluções:

- G1 Soro fisiológico (controle)
- G2 Azadirachtina aquosa 0,5%
- G3 CHX aquoso 2%
- G4 Hipoclorito de Sódio 2,5%
- G5: EDTA 17%

Figura 2: Remoção do material obturador com broca de Largo, deixando 3 mm apicais.



Depois de ajustados, os pinos de fibra de vidro (Reforpost, Angelus, Londrina, PR, Brasil) foram limpos com álcool 70, e passaram pelo processo de silanização, que consiste na aplicação de silano (Angelus, Londrina, PR, Brasil) na superfície do pino com o auxílio do *cavibrush* longo (Condac 37, FGM, Joinville, SC, Brasil), com posterior espera de 1 minuto.

O preparo do conduto foi feito com condicionamento com ácido fosfórico à 37% (Condac 37, FGM, Joinville, SC, Brasil) por 15 segundos, seguido por lavagem abundante do canal radicular e secagem com cone de papel absorvente. Em seguida, o cimento resinoso autoadesivo dual (RelyX U200, 3M ESPE -Sumaré/SP), foi manipulado de acordo com as recomendações do fabricante e aplicado ao redor do pino e no interior do conduto radicular com o auxílio de um explorador reto, finalizando com a introdução do pino de fibra de vidro no canal radicular e fotoativação (500mW/cm²) por 40 segundos (Ultralux, Dabi Atlante, Ribeirão Preto, Brasil)

Ao final, os corpos de prova foram armazenados em umidade relativa de 100%, por 72 horas.

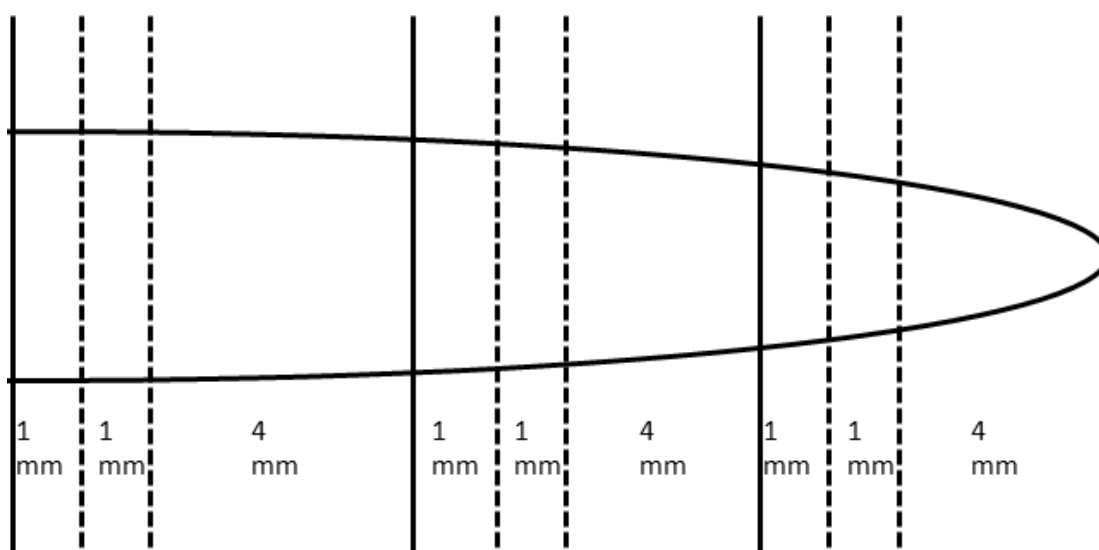
Figura 3: Pino de fibra de vidro cimentado.



3.2 Preparo dos *slices* para o teste *Push Out*

Foram realizadas marcações na raiz indicando os terços a cada 6mm. A contar da porção cervical foi eliminado 1mm e utilizado o milímetro seguinte; na porção média foi utilizado o segundo milímetro e na porção apical foi repetido o processo (Figura 4). Estes *slices* foram utilizados no teste de *push out* (CALIXTO et al., 2012; KAHNAMOUEI et al., 2012; BAENA; FLORES; CEBALLOS, 2017).

Figura 4: Divisão para os cortes dos *slices* utilizados no teste de *push out*.



3.2.1 Teste *Push Out*

Cada *slice* foi posicionado em dispositivo adaptado na máquina de ensaio universal EMIC 2000 (EMIC DL.2000, EMIC, São José dos Pinhais, PR, Brasil) de forma que as paredes compostas por dentina ficassem apoiadas e a região intracanal e o pino de vidro não tivessem suporte (Figura 5). Foi aplicada célula de carga de 5 N de força e velocidade de 1mm por minuto até o rompimento. Após o rompimento os valores de força de união de cada espécime foram registrados, para posterior análise (ROYDHOUSE, 1970; DE LIMA et al., 2016; KAMALASANAN et al., 2017).

Figura 5: Máquina universal de Ensaio EMIC 2000 (EMIC DL.2000, EMIC, São José dos Pinhais, PR, Brasil) em que foi realizado teste *push out*.



Figura 6: Esquema do procedimento do teste *push out*. A seta azul representa a força aplicada pela máquina.

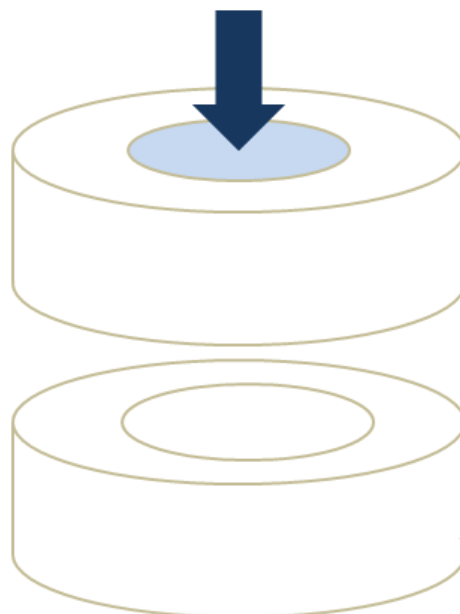


Figura 7: Corpo de prova posicionado na máquina universal de ensaios, para o teste de *push out*.

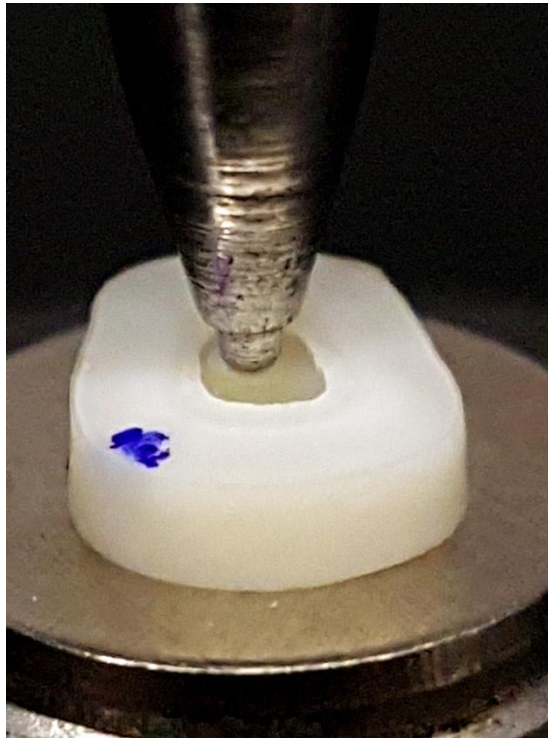
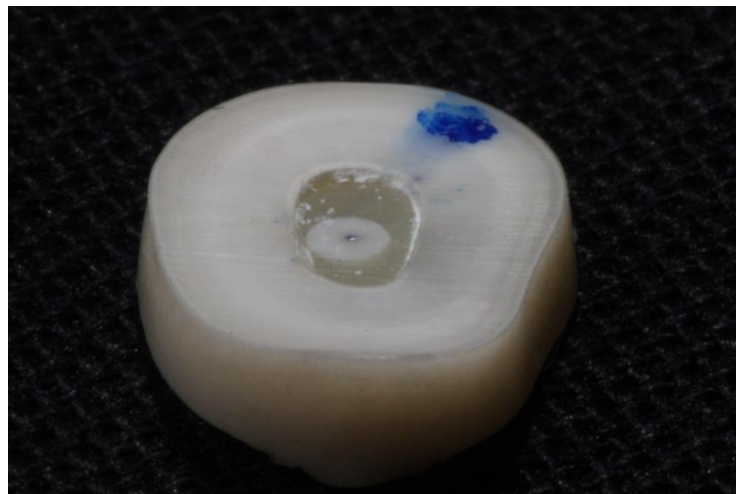


Figura 8: Corpo de prova após a compressão (*push out*) com visível degrau entre sistema resinoso e dentina.



3.3 Análise Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O corpo de prova resultante do teste *push out* foi seccionado ao meio com disco carborundum (Dentorium, Nova York, EUA) de modo a se obter duas metades em forma de “C”. Inicialmente, o espécime seccionado passou pelo processo de desidratação com sequência ascendente de grau alcoólico de álcool etílico (40°, 50°, 70°, 80° e 96° GL), permanecendo por 1 hora em cada concentração alcoólica e, ao final, em álcool etílico absoluto por 24 horas. Em seguida os espécimes foram colocados em um dessecador até o momento da análise por MEV, de forma a impedir a umidificação das amostras. No momento da análise, os espécimes receberam uma cobertura ultrafina de material eletricamente condutor (aproximadamente 30 nanômetros), por meio de um processo denominado metalização. Na sequência, foram fixados com fita adesiva condutora de corrente elétrica em suportes metálicos (Stubs).

Sendo assim as amostras preparadas foram levadas para análise em MEV (Oxford Instruments, Scotts Valley, California) nos aumentos de 1000, 2500, 5000 e 10000 vezes.

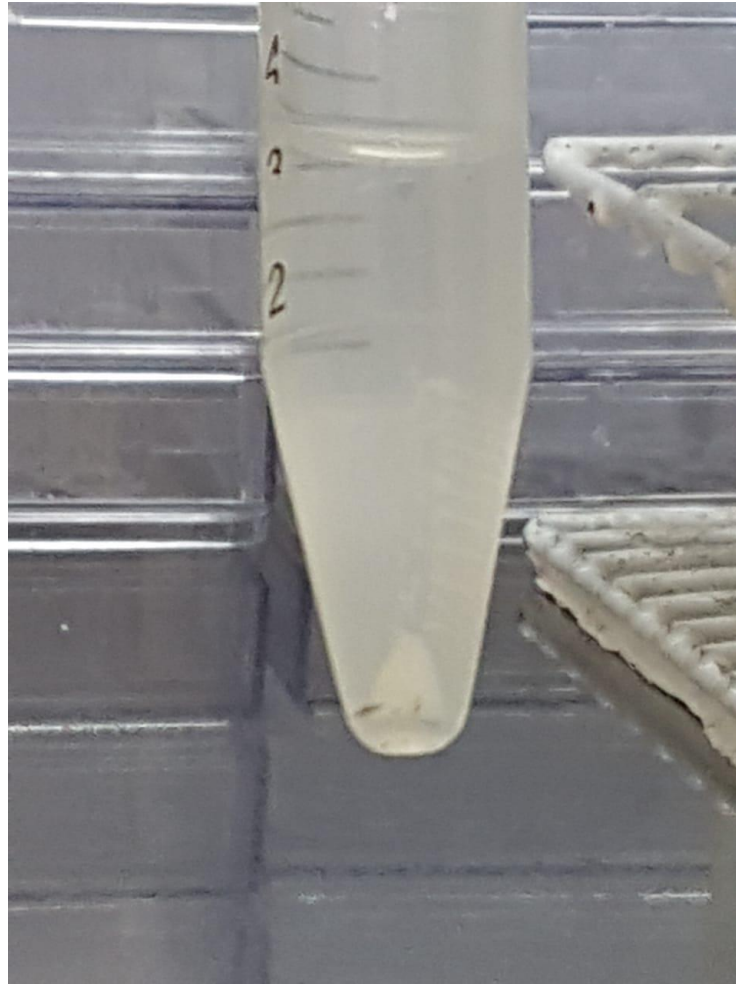
3.4 Concentração inibitória mínima

Tryptone Spya Broth (TSB): Foi preparado com 1000 mL de água destilada e 30 g do meio de cultura de Tryptone Soya Broth (HiMedia Laboratories RVT LTDA, Mumbai, Índia), após sua total homogeneização o meio de cultura foi levado para esterilização durante 15 minutos a 121°C.

Tryptone Soya Agar (TSA): Para preparo deste meio foi utilizado 1000 mL de água destilada, 40 g de meio de cultura desidratado de tryptone Soya Agar (Himedia Laboratories PVT. LTDA, Mumbai, Índia). Após homogeneização o meio foi levado para esterilização durante 15 minutos a 121°C.

Para análise do efeito antimicrobiano e inibidor da AZD foi realizada cultura de *Enterococcus faecalis* em meio TSB durante 24 horas. Deste meio mãe foram coletados 3 mL e centrifugados a 4200g por 5 minutos (Centrifuge 5430R, Eppendorf). O pellet foi resuspenso em 3,5 mL de PBS (Figura 9), passado em vortex e centrifugado novamente por 5 minutos a 4200g (Centrifuge 5430R, Eppendorf).

Figura 9: Pellet formado após centrifugação do meio de cultura TSB.



3.4.1 Espectrofotômetro

Cubeta 1 (Figura 10) foi preenchida com PBS (branco) e levada para máquina de leitura (Figura 11) a 650 nm. Outra cubeta (2) foi preenchida com o meio de cultura anteriormente citado. O meio apresentou leitura de 0,15 (este número refere a 5×10^5 unidades formadoras de colônias). Assim, cada poço recebeu 5uL do meio de cultura.

Figura 10: Cubeta de leitura do espectrofotômetro.



Figura 11: Máquina de espectrofotometro MultiScakn GO(Thermo Scientific, Tokyo, Japão).

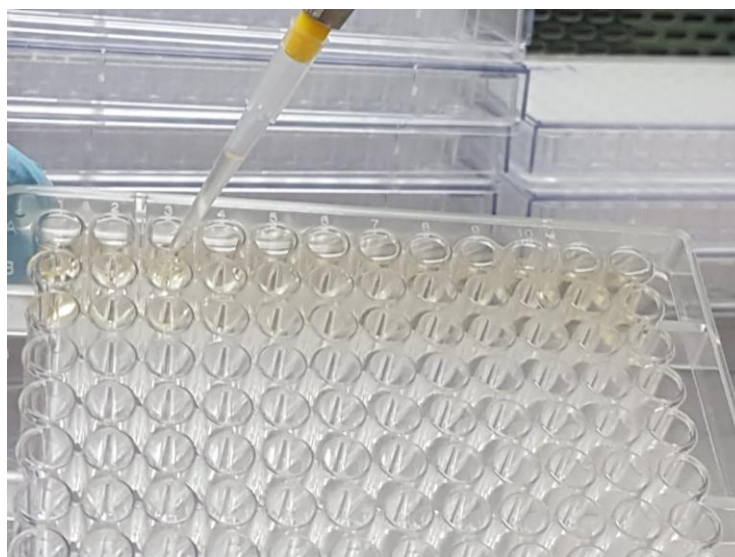


Após obtenção de concentração de 0,15 na análise de espectrofotômetro, foi separado 100 uL de meio para preenchimento do poço 1 e acrescido 100 uL de solução de AZD 10 uL/mL e realizada a homogeneização. Outros 100 uL de meio foram dispensados nos poços 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12. Foram coletados 100 uL do poço 1 e dispensados no poço 2, realizada homogeneização e coleta de mais 100 uL do poço 2 para o poço 3. Estes procedimentos de troca foram realizados de forma que todos poços recebessem diluições progressivas de AZD em todos meios. Poços 11 e 12 não receberam volume dos anteriores. Poço 11 apenas meio contaminado e poço 12 meio estéril (controle negativo) (Figura 12). Esta etapa foi realizada em duplicata.

Tabela 1: Concentrações de AZD definidas para teste de concentração inibitória mínima. CP = controle positivo; CN = controle negativo. De 1 para 10 foi realizada diluição na proporção de 1 para 2 até obtermos 10 concentrações diferentes.

Concentração (μ /mL)										CP	CN
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
5,0	2,5	1,25	0,625	0,312	0,15	0,07	0,039	0,019	0,009	0	0

Figura 12: Preenchimento dos poços com meio inoculado e AZD em diferentes concentrações.



Preparada a placa de cultura esta foi levada pelo tempo de 24 horas em estufa à temperatura de 37°C (Figura 13).

Figura 13: Estufa para controle da temperatura a 37°C.



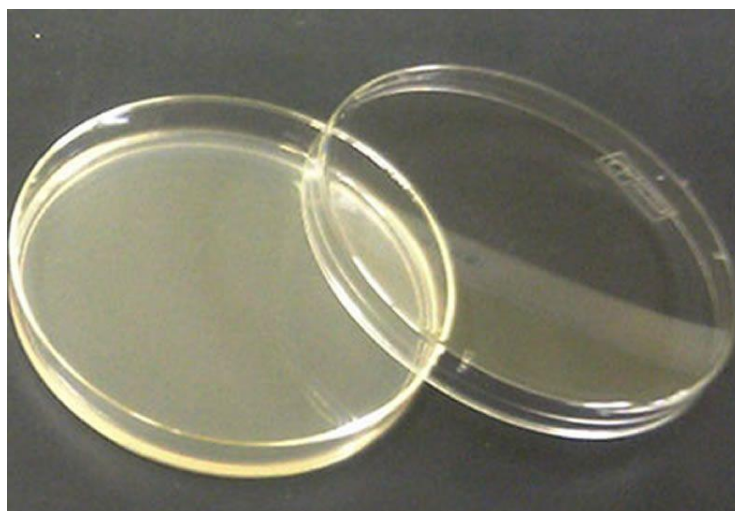
Figura 14: Placa em estufa a 37°C para ser guardada por 24 horas.



3.4.2 Semeadura do meio sólido

Foi realizada semeadura em meio TSA, utilizando cada meio com diferentes diluições. Cada duplicata gerou uma semeadura de modo que se pode verificar com segurança a inibição ou não da ação da AZD.

Figura 15: Placa de Petri com meio TSA preparado para inoculação.



3.5 Zimografia

3.5.1 Reagentes preparados para realização do gel

Tris CL 1 M: foi adicionado 121,0 g de Tris Base 1 M em 84 mL de HCL e ajustado o pH para 7,4. Esta solução, depois de homogeneizada, foi armazenada em refrigerador a 8°C.

Tampão Tris 50 mM com CaCl_2 a 10 mM: foram separadas 50 mL da solução Tris CL 1 M e acrescentados 990 mL de água, seguido de homogeneização e armazenagem em refrigerador a 4°C.

Tampão de corrida 5x: foi adicionado 15,1 g de Tris base (0,125M), 72 g de glicerina, 5,0 g de SDS e completado com água até atingir 1 litro. Esta solução foi armazenada em refrigerador a 4°C.

Solução Renaturante Triton X 100: em 100 mL de água fervente foi adicionado 10 mL de Triton X 100 e em seguida adicionado água até atingir volume de 500 mL e a solução foi armazenada em refrigerador a 4°C.

Corante coomassie blue: Volume final da solução deveria ser de 1 L. Inicialmente foram adicionados 300 mL de metanol 30%, 100 mL de ácido acético 10%, 0,5 g de coomassie blue G250 0,05% e água destilada foi utilizada para completar-se para 1 litro. Após a homogeneização a solução foi armazenada em temperatura ambiente.

Descorante: foram acrescentados 300 mL de metanol 30%, 100 mL de ácido acético 10% e completou-se com água até atingir 1 litro. Seu armazenamento foi feito em temperatura ambiente.

Tampão de amostra não redutor 2x: foram preparados 25 mL de solução 4x tris CL/SDS com pH 6,8, 20 mL de glicerol 20%, 4g de SDS 4% e 1,0 mg de azul de bromofenol 0,001%, e foi acrescentada água até completar 100 mL. Alíquotas de 1 mL foram pipetadas em tubos eppendorf para serem armazenados em freezer à temperatura de -20°C.

Tampão de amostra não redutor 6x: para esta solução foram adicionados 7 mL de solução 4x tris CL/SDS com pH 6,8, 3 mL de glicerol 30%, 1g de SDS, 1,2 g de azul de bromofenol 0,0012%. A solução foi completada com água até 100 mL e alíquotas de 0,5mL foram acondicionadas em tubos de eppendorf e armazenadas em freezer à temperatura de -20°C.

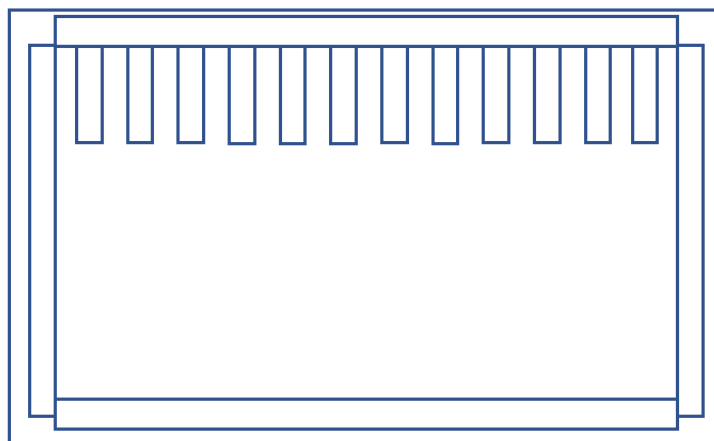
Agarose 3%: foram separados 3 g de agarose, adicionou-se 100 mL de água fervente até que a solução tornou-se homogênea. Foi então armazenado em refrigerador a 4°C.

Solução de Contração: foram adicionados 300 mL de metano a 30%, 50 mL de glicerol 5% e completados com água até atingir 1 L. a solução foi armazenada em temperatura ambiente.

3.5.2 Preparo do Gel

O gel foi preparado utilizando duas placas de vidro separadas por espaçadores e um pente que moldou o gel deixando espaços que serviram de poços de aplicação das amostras, como mostra o esquema a seguir (Figura 16):

Figura 16: Esquema de montagem dos dispositivos para conformação do gel de acrilabima e bisacrilamida.



Foram então presas com dois grampos para não haver vazamentos das soluções. Inicialmente realizou-se o preparo com os seguintes reagentes em becker de 500 mL: 4,9 mL de água, 6,0 mL de solução de acrilamida 30% e bisacrilamida 0,8%, 3,75 ml de tampão 4x tris Cl/SDS pH 8,8, 3,75 uL de gelatina, 50 uL de APS 10% e 10 uL de TEMED. Os reagentes foram homogeneizados e dispensados no vão entre placas com auxílio de pipetas. Em volume foi preenchido 70% do vão. Aguardou-se a polimerização do gel por aproximadamente 30 minutos. Então iniciou-se o preparo do gel de largada, em Becker de 250 mL misturou-se os seguintes reagentes: 3,05 mL de água, 650 uL de solução de acrilamida 30% e bisacrilamina 0,8%, 1,25 mL de tampão 4x Tris Cl/SDS pH 6,8, 25 uL de APS 10%, 5 uL de TEMED. Todos reagentes foram misturados até completa homogeneização e dispensados sobre o gel de separação já polimerizado. Por fim acrescentou-se o pente que moldou os poços para aplicação das amostras. Aguardou-se mais 30 minutos a polimerização do gel de largada.

3.5.3 Aplicação e Corrida das amostras

Com 1,5 ug de AZD liofilizada foi realizada suspensão em 15 uL de tampão Tris HCl, obtendo então dois volumes diferentes: a – 10 uL e 1 ug de AZD; b – 5 uL e 0,5 ug de AZD. Em seguida foi adicionado tampão 4x na proporção de cada volume, sendo assim 2,5 uL em a e 1,1 uL em b. Foi adicionado também 1 uL de corante em

cada amostra e para amostra a foi adicionado 0,5 ug de MMP2 resuspenso em 7,5 uL de Tris HCl e em b foi adicionado 0,5 ug de MMP2 resuspenso em 6,9 uL de Tris HCl. Dessa forma, resultou que a mostra apresentaria uma relação (MMP2 para AZD) de 1:2 e amostra b 1:1 em relação MMP2 e AZD. As amostras foram homogeneizadas e aplicadas imediatamente em seus respectivos poços.

Foi colocado tampão de corrida 1 X no tanque superior da cuba, até cobrir o gel. Aplicadas as amostras, a cuba foi levada ao refrigerador. Os eletrodos foram ligados de acordo com as marcações de polos positivos e negativos. A fonte foi ligada e ajustada amperagem de 30 mA, mantida até a corrida total das amostras (Figura 17).

Figura 17: Amostras aplicadas no gel de poliacrilamida previamente ao início da corrida.



3.5.4 Coloração do gel

O gel da placa foi retirado e transferido para o reservatório com 100 mL de Triton e foi levado à bailarina por mais 30 minutos numa velocidade de 3,0g. A solução foi descartada, adicionados mais 100 mL da solução de Triton, e novamente levados à bailarina por mais 30 minutos numa velocidade de 3,0g.

O Triton foi descartado e adicionado mais 100 mL de Tampão Tris.CaCl₂. O armazenamento se deu na estufa (37°C), por aproximadamente 18 horas. O Tampão Tris. CaCl₂ foi substituído por 100 mL de corante Coomassie Blue G-250. Então o gel foi levado à bailarina por 3 horas na velocidade de 3,0g. O corante do recipiente foi

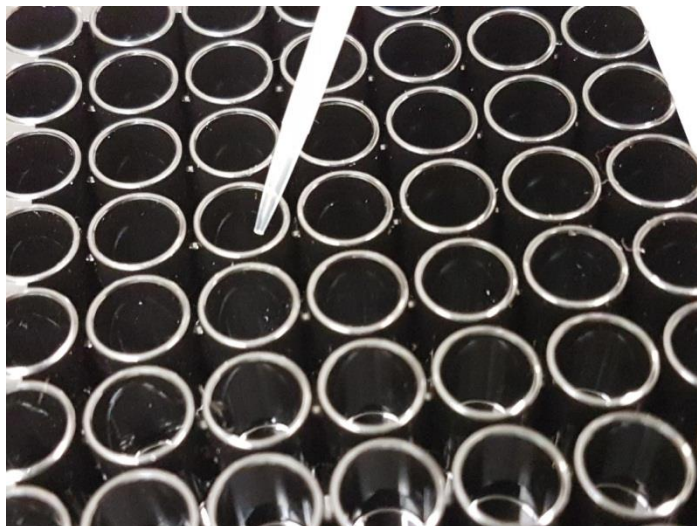
substituído pelo descorante e levados para agitação pelos seguintes tempos e volumes de descorantes: 15 minutos com 150 ml de descorante; 30 minutos com 150 ml de descorante; 60 minutos com 150 ml de descorante. O descorante foi substituído por 150 ml de solução de contração. Assim, o gel pode ser fotografado (HU; BEETON, 2010; BENCSIK et al., 2017; CHHABRA; RANI, 2018).

3.6 Fluorimetria

Para análise por fluorimetria foram resuspensos 5 µg de AZD liofilizada (Sigma-Aldrich, EUA) em 50 µL de solução Tris HCl 50 mM de modo que a solução se adequasse à concentração de 10% de AZD. Isto foi feito para a mistura final de cada poço resultar adequadamente com as porcentagens de 1%, 0,5% e 0,25% em concentração final. Foi preparada, também, solução de MMP2 recombinante humana (Abcam, Reino Unido) utilizando 50 µg de MMP2 e 100 µL de tris HCl e foi incubada em geladeira até momento do uso. Peptídeo ES001 (Merck SA, Brasil) foi utilizado para o experimento, este foi reservado em 3 µL de peptídeo e 27 µL de solução Tris HCl pH 7,4, resultando numa solução de 30 µL final e 10% de ES001. Em seguida em placa opaca e preta foram selecionados 5 poços (A; B; C; D; E) para realizar análise na máquina de fluorimetria. Os poços foram distribuídos com seguinte formação:

- A: Branco: 197 µL Tris HCl + 3 µL solução peptídeo ES001
- B: Colagenase: 197 µL Tris HCl + solução peptídeo ES001
- C: 15 µL MMP2 recombinante + 162 Tris HCl + 3 µL solução peptídeo ES001 + 20 µL solução de AZD 10%
- D: 15 µL MMP2 recombinante + 172 µL Tris HCl + 3 µL solução peptídeo ES001 + 10 µL solução de AZD 10%
- E: 15 µL MMP2 recombinante + 177 µL Tris HCl + 3 µL solução peptídeo ES001 + 5 µL solução de AZD 10%

Figura 18: Aplicação das amostras e reagentes para realização da leitura de absorvância em placa opaca de 96 poços.



As soluções já misturadas e homogeneizadas foram pipetadas em seus respectivos poços. Aguardou-se 30 minutos em geladeira a 8°C para que houvesse início da reação. Após tempo de encubação a placa foi levada ao leitor do Fluorímetro (Spectra Max, Gemini EM, Molecular Devices, San José, Califórnia, EUA). O software Softmax PRO (Gemini EM, Molecular Devices, San José, Califórnia, EUA) foi utilizado para definir os seguintes parâmetros:

- Comprimento de onda da leitura: 320 – 405 nm
- Sensibilidade: nível 12
- Tempo de leitura: 2 horas / 12 horas
- Intervalo entre leituras: 5 minutos / 10 minutos

Figura 19: Máquina de leitura da absorvância SpectraMax Gemini EM (San José, Califórnia, EUA).

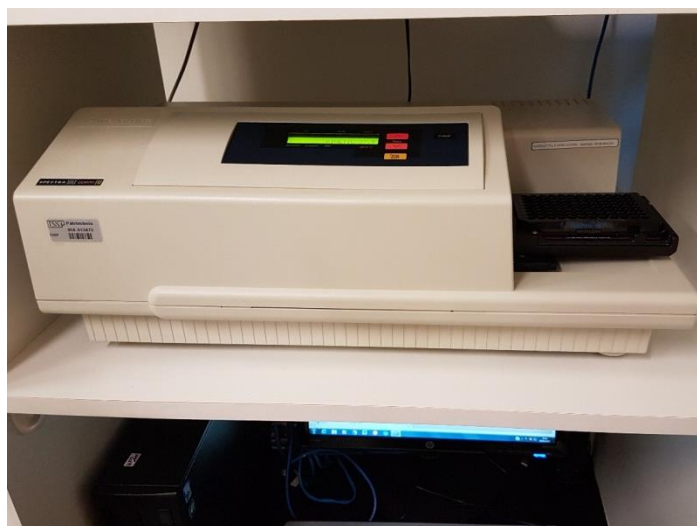


Figura 20: Momento prévio à leitura, amostras e reagentes já estavam prontos para realização do teste.



Os dados foram anotados em tabela de Excel.

3.7 Análise estatística

Os dados foram analisados com auxílio do programa Graphpad InStat 3.0 (IBM SPSS Statistics Version 20 - São Francisco - EUA). Para análise dos resultados foi realizado ANOVA e Tukey, Teste de Bonferroni aplicado como correção dos dados mais discrepantes.

4 RESULTADOS

4.1 Teste *Push Out*

A decisão da não inclusão do terço apical no teste *push out* foi tomada devido à falta de selamento apical de grande parte dos espécimes, sendo assim a cimentação poderia ser defeituosa na porção apical. Resultados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados do teste de *push out*, terços cervical e médio. Ao final valor médio por grupo.

SORO		AZD		CHX		NaOCI		EDTA 17%	
Médio	Cervical	Médio	Cervical	Médio	Cervical	Médio	Cervical	Médio	Cervical
155,26	118,42	124,42	132,54	15,99	59,32	12,03	53,6	16,68	91,45
39,8	47,98	51,27	92,3	46,41	125,22	39,65	11,8	74,26	138,14
49,35	68,22	55,21	44,89	33,13	76,42	63,82	18,32	112,86	76,66
140,21	46,12	144,38	98,25	92,95	52,68	21,88	111,85	42,48	25,79
13,23	146,2	46,94	125,65	105,59	113,25	36,08	100,3	47,91	77,81
35,85	56,7	85,17	25,9	138,39	19,88	100,31	37,45	85,04	16,7
23,51	110,78	42,99	130,11	21,86	145,87	42,29	46,77	27	140,27
110,03	70,68	127,33	99,63	39,79	99,65	106,16	96,42	31,35	57,85
56,29	101,8	25,14	17,81	25,64	58,42	105,11	64,83	9,78	49,67
50,67	32,4	156,11	93,4	41,43	14,85	19,67	100,29	82,52	117,21
79,73	67,9	2,25	114,29	73,6	155,89	80,42	31,54	104,36	110,9
29,91	87,1	46,81	32,28	130,46	42,39	61,72	76,94	73,71	59,71
112,26	17,2	31,97	90,386	70,38	85,74	32,01	22,18	14,2	144,28
139,42	165,1	17,61	91,2	46,2	31,45	7,49	16,48	98,82	26,55
110,98	122,64	147,28	42,19	59,55	99,76	42,83	45,8	9,39	79,35
89,73	45,99	92,45	102,3	99,16	64,33	70,41	95,67	117,55	95,15
164,29	149,8	63,04	92,99	112,43	141,28	40,5	88,14	114,33	121,78
109,16	111,4	68,86	16,8	107,43	131,89	74,95	60,89	53,34	58,37
97,41	94	120,12	55,49	76,86	79,18	15,98	130,81	116,85	102,11
		106,73	115,16	132,49	100,66			91,29	78,15
84,584	87,391	77,804	80,678	73,487	84,907	51,227	63,688	66,186	83,395

Todos os elementos que passaram por teste de *push out* apresentaram falha do tipo adesiva (em que o sistema adesivo se separa da dentina).

4.2 Testes ANOVA e Tukey

Foi realizado teste ANOVA com as médias repetidas em que a posição do corte na raiz (média/ cervical) era o dado vinculado. Ao comparar os grupos foi observada diferença significativa ($p=0,043$), onde o Grupo H apresentou menor resistência que o Grupo S ($p=0,035$), os grupos A, E e C apresentaram valores intermediários (sem diferença significativa entre e si e em relação a H e S). Ao comparar as posições não foi encontrada diferença significativa entre média e cervical ($p=0,099$). A interação Grupo vs Posição não foi significativa ($p=0,905$).

Tabela 3: Valores do teste ANOVA.

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Grupo	17674,432	4	4418,608	2,571	,043
Erro	159842,234	93	1718,734		
posição	4284,983	1	4284,983	2,780	,099
posição * Grupo	1578,373	4	394,593	,256	,905
Erro(posição)	143349,519	93	1541,393		

Tabela 4: Comparativos.

Grupo	Medial		Cervical		Total (Grupos)	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
A	77,80	46,87	80,67	38,41	79,241ab	42.3281
C	73,48	39,35	84,90	42,29	79,197ab	40.7327
E	66,18	39,04	83,39	38,36	74,790ab	39.1876
H	51,22	31,56	63,68	36,14	57,458a	34.058
S	84,58	46,99	87,39	42,07	85,987b	44.0204
Total (Posição)	70,71	41,89	80,10	39,60		

ab: letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística entre os grupo ($p>0,05$)

Tabela 5: Valores estimados.

Grupo	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
A	79,241	6,555	66,224	92,258
C	79,197	6,555	66,180	92,214
E	74,790	6,555	61,774	87,807
H	57,458	6,725	44,102	70,813
S	85,987	6,725	72,632	99,343

Tabela 6: Comparação por pares.

(I) Grupo	(J) Grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.b	95% Confidence Interval for Differenceb	
					Lower Bound	Upper Bound
A	C	,044	9,270	1,000	-26,613	26,701
	E	4,451	9,270	1,000	-22,206	31,108
	H	21,784	9,391	,226	-5,222	48,789
	S	-6,746	9,391	1,000	-33,752	20,259
C	A	-,044	9,270	1,000	-26,701	26,613
	E	4,406	9,270	1,000	-22,251	31,063
	H	21,739	9,391	,228	-5,266	48,745
	S	-6,791	9,391	1,000	-33,796	20,215
E	A	-4,451	9,270	1,000	-31,108	22,206
	C	-4,406	9,270	1,000	-31,063	22,251
	H	17,333	9,391	,681	-9,673	44,338
H	S	-11,197	9,391	1,000	-38,202	15,809
	A	-21,784	9,391	,226	-48,789	5,222
	C	-21,739	9,391	,228	-48,745	5,266
	E	-17,333	9,391	,681	-44,338	9,673
S	S	-28,530*	9,511	,035	-55,879	-1,180
	A	6,746	9,391	1,000	-20,259	33,752
	C	6,791	9,391	1,000	-20,215	33,796
	E	11,197	9,391	1,000	-15,809	38,202
	H	28,530*	9,511	,035	1,180	55,879

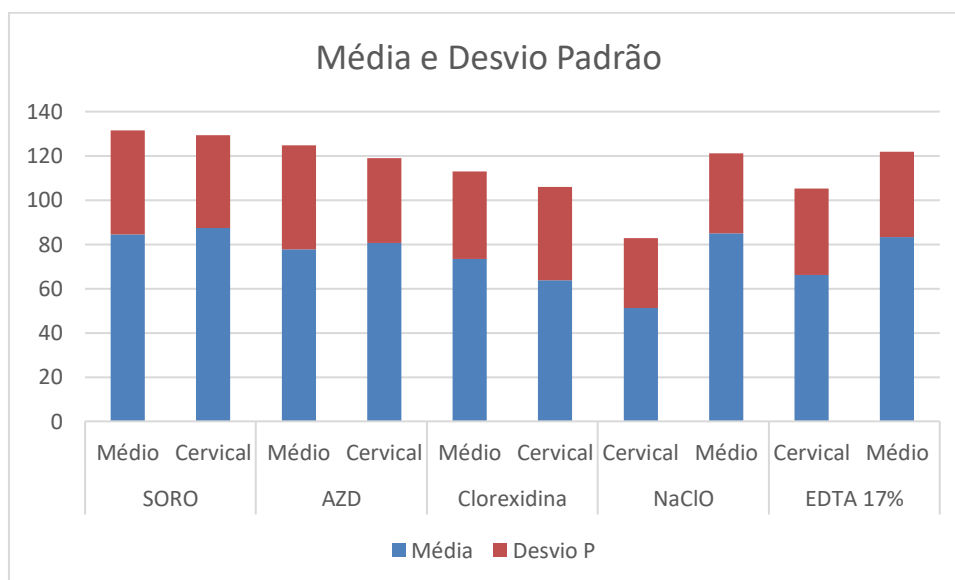
Baseado nas média marginais

*A diferença da média é significativa ao nível de 0,05.

b. Ajuste de múltiplas comparações: Bonferroni

Tabela 7: Média seguida do desvio padrão.

SORO		AZD		CHX		NaOCl		EDTA 17%	
Médio	Cervical	Médio	Cervical	Médio	Cervical	Cervical	Médio	Cervical	Médio
84,584	87,391	77,804	80,678	73,487	63,688	51,227	84,907	66,186	83,395
±46,999	±42,072	±46,879	±38,413	±39,351	±42,29	±31,56	±36,143	±39,047	±38,361

Figura 21: Gráfico de média e desvio padrão.

4.3 MEV

Foram obtidas imagens de MEV do substrato tratado com as seguintes substâncias: solução salina 0,9%, AZD 0,5%, hipoclorito de sódio 2,5%, CHX 2%, EDTA 17%, as análises foram feitas nos aumentos de 1000, 2500 e 10000 vezes.

Figura 22; 23 e 24: Superfície dentinária intrarradicular de espécime irrigada com solução salina 0,9%. Presença de fibras colágenas em alguns pontos e manutenção da estrutura dentinária.

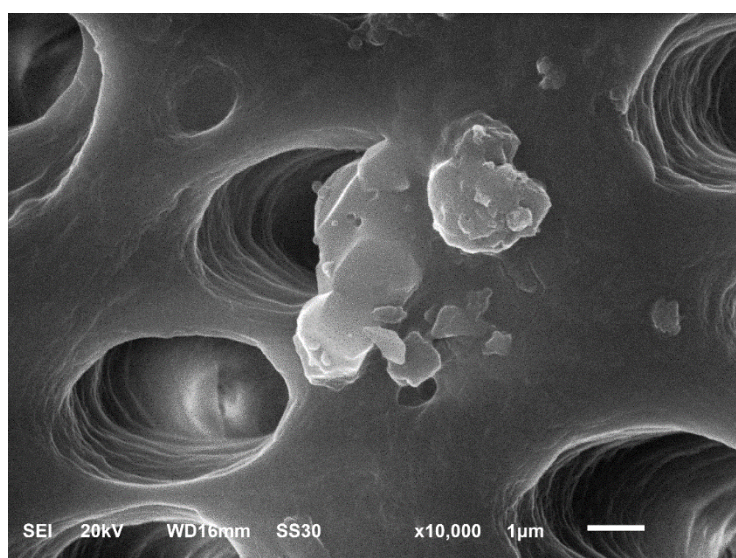
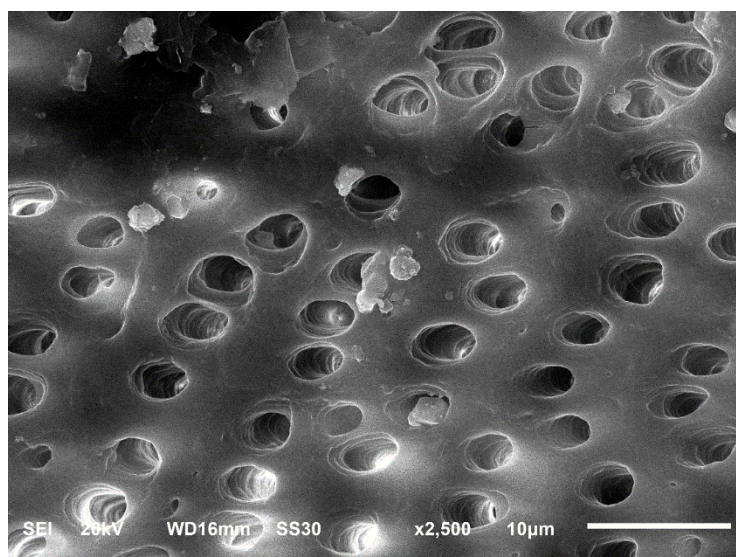
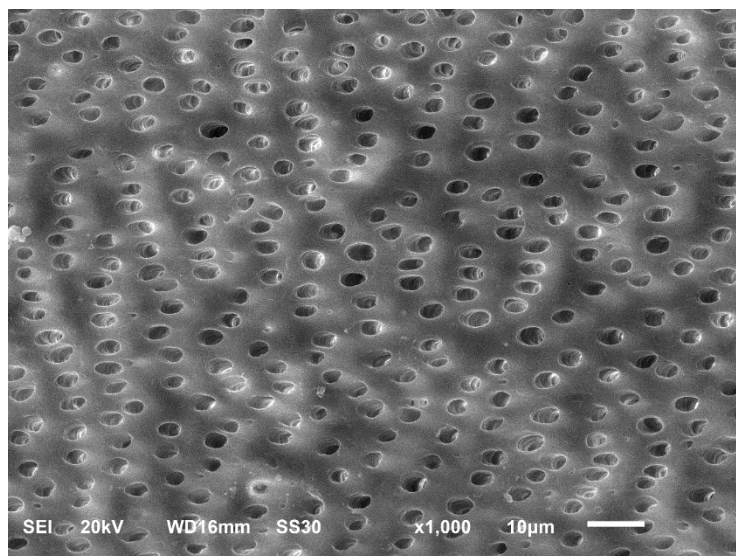


Figura 25; 26 e 27: Superfície dentinária intrarradicular de espécime irrigada com solução de AZD 0,5%. Estrutura dentinária preservada e presença de fibras colágenas.

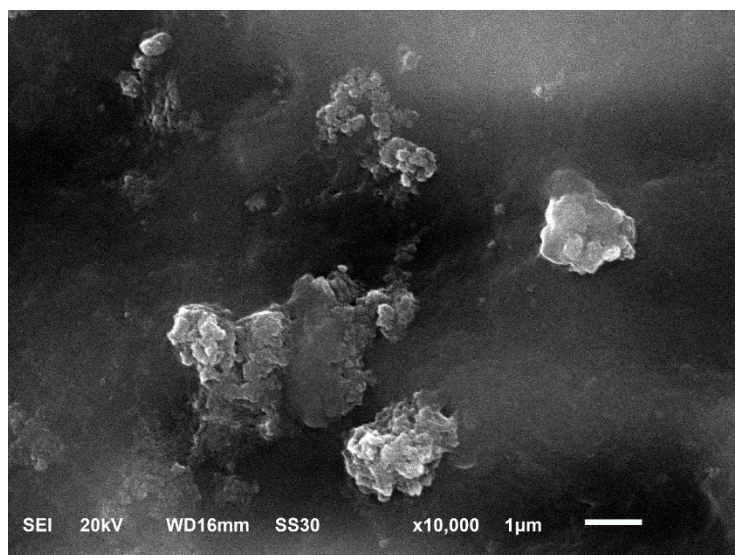
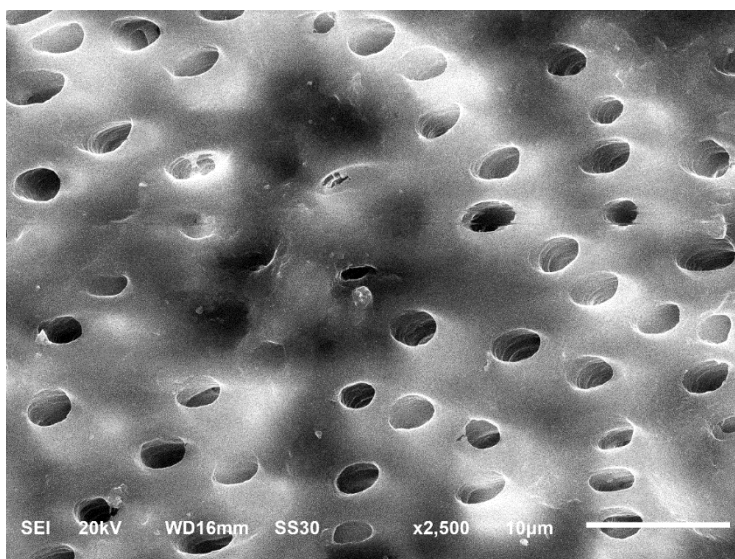
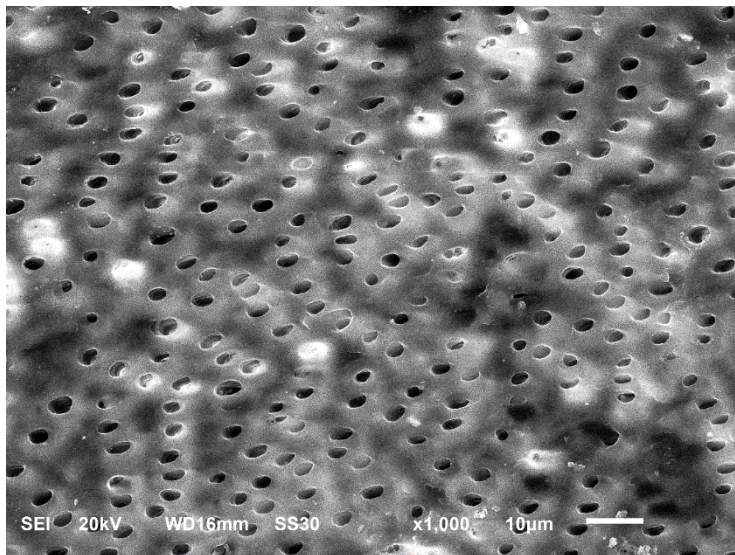


Figura 28; 29 e 30: Superfície dentinária intraradicular de espécime irrigada com solução de CHX 2%. Presença de estruturas colágenas e preservação da estrutura dentinária.

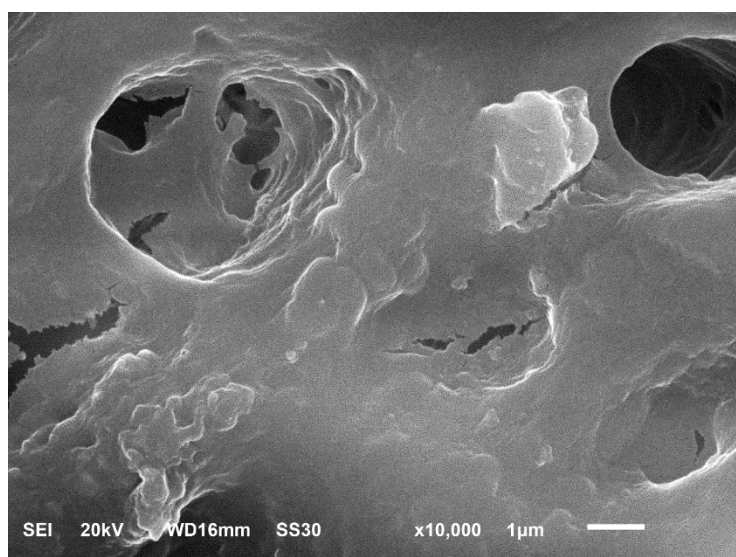
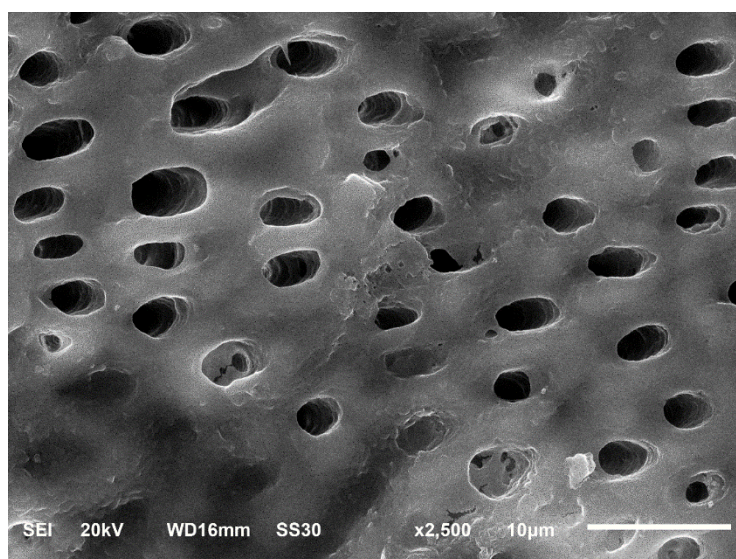
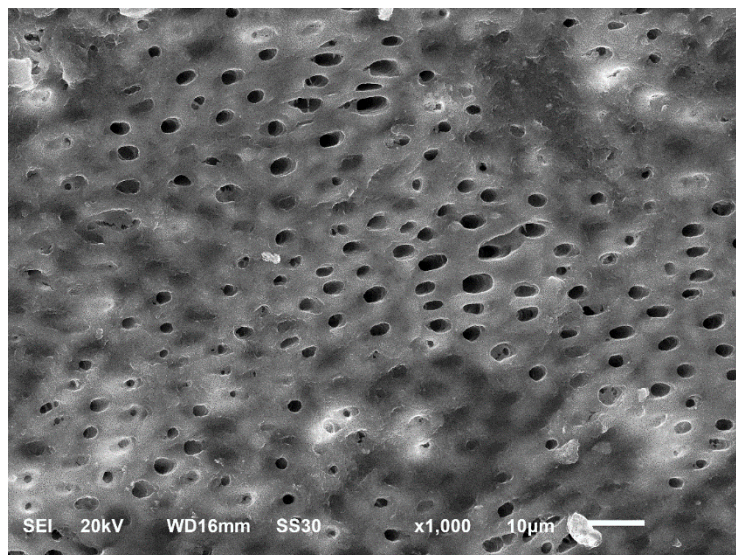


Figura 31, 32 e 33: Superfície dentinária intrarradicular de espécime irrigada com solução de hipoclorito de sódio 2,5%. Pouca e ausência de projeções de fibras, degradação nítida da estrutura dentinária.

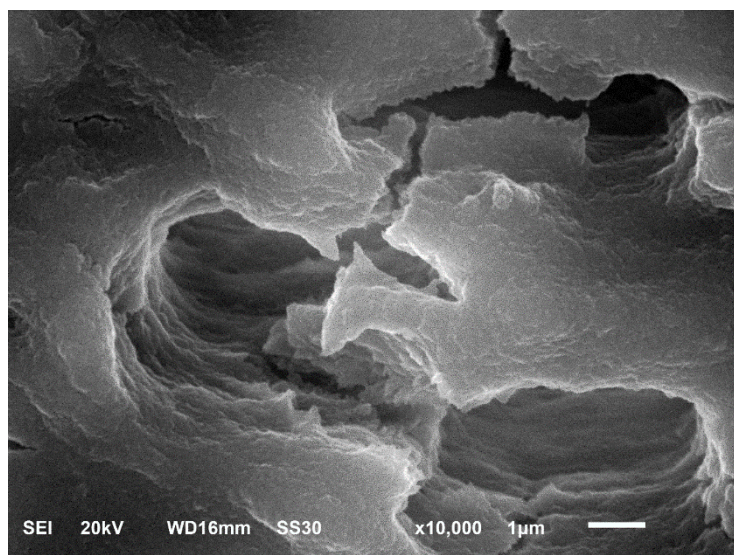
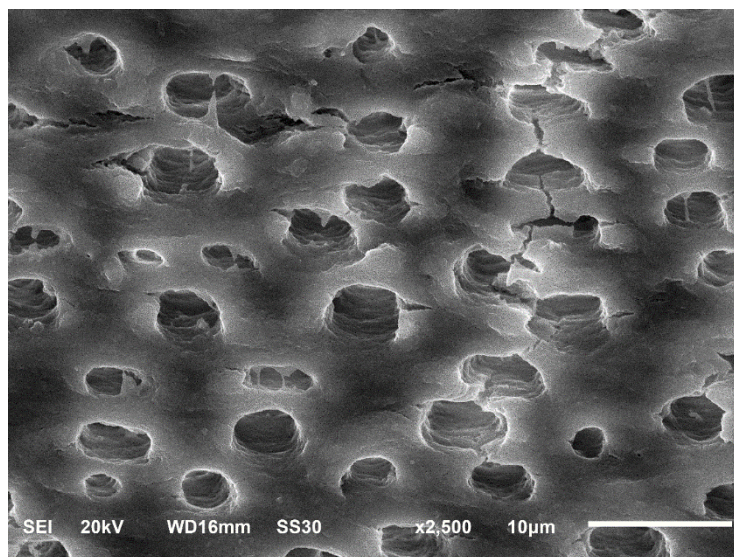
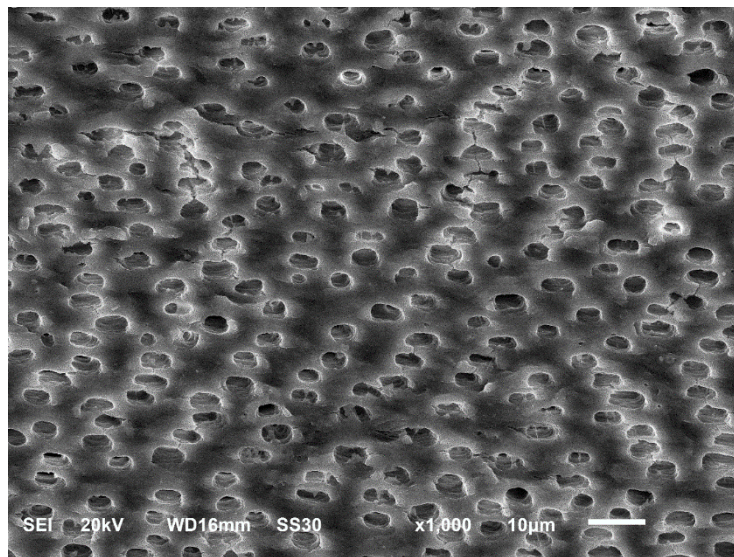
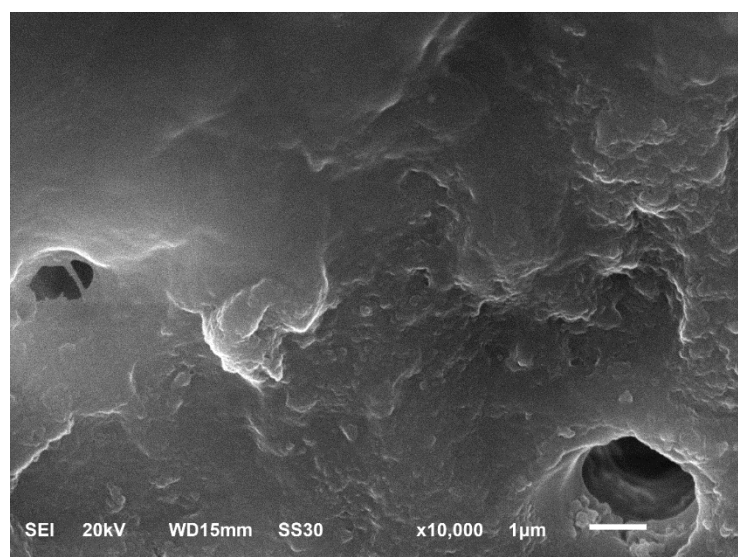
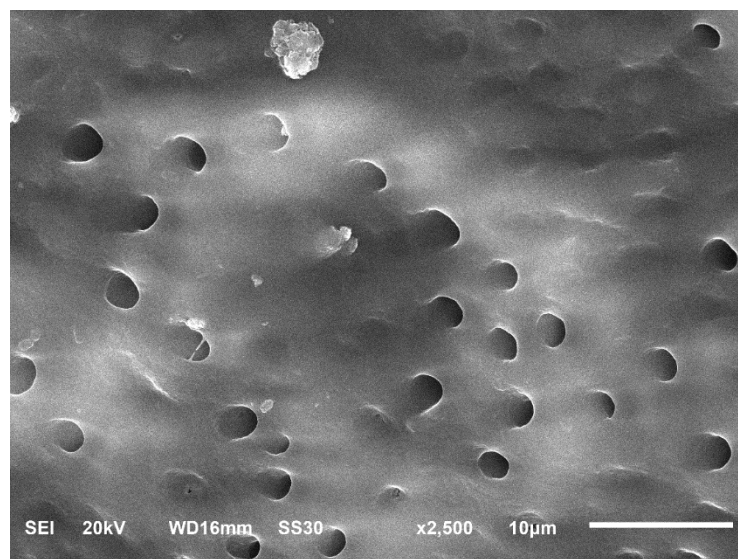
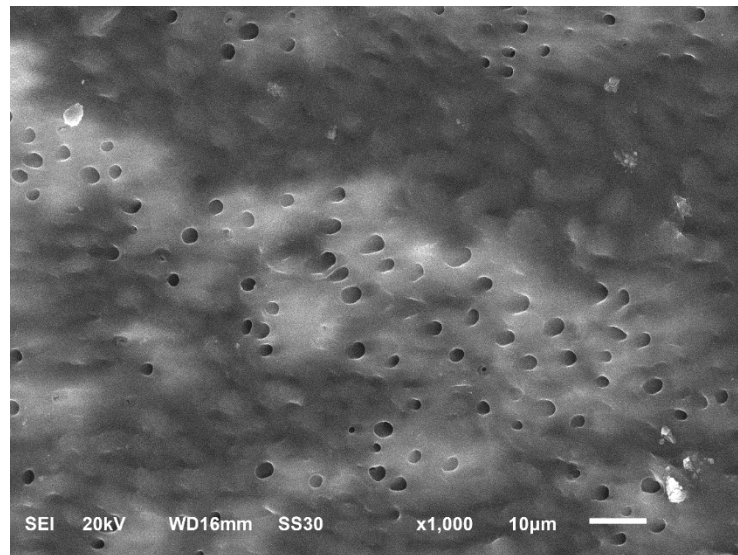


Figura 34, 35 e 36: Superfície dentinária intrarradicular de espécime irrigada com solução de EDTA 17%. Preservação da estrutura dentinária e manutenção das fibras colágenas.



Todos os elementos que passaram por teste de *push out* apresentaram falha do tipo adesiva (em que o sistema adesivo se separa da dentina).

4.4 Análise de Concentração Inibitória Mínima

Os poços com meio TSB que continham *Enterococcus faecalis* não apresentaram inibição com soluções de AZD nas concentrações: 5,0, 2,5, 1,25, 0,625, 0,312, 0,15, 0,07, 0,039, 0,019, 0,009.

Figura 37: Todos os meios apresentaram crescimentos dos microrganismos.

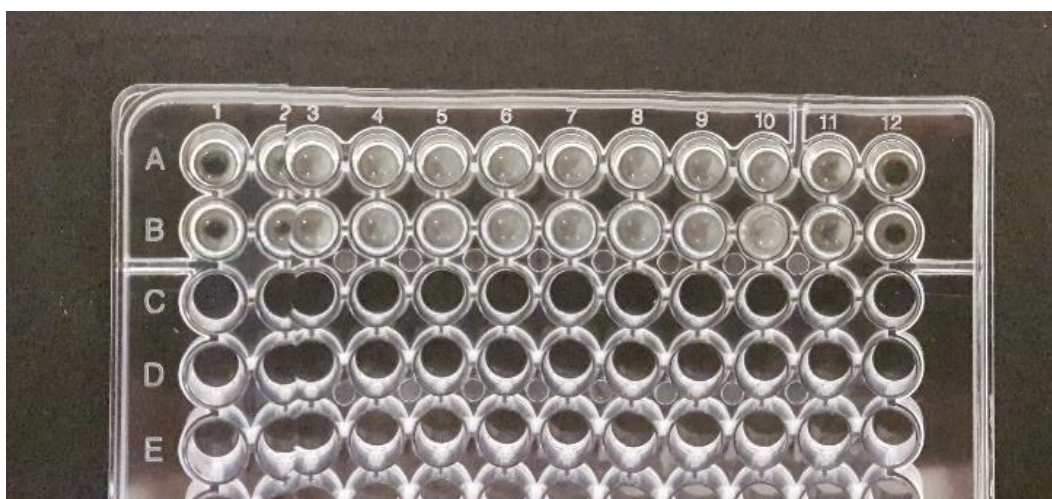
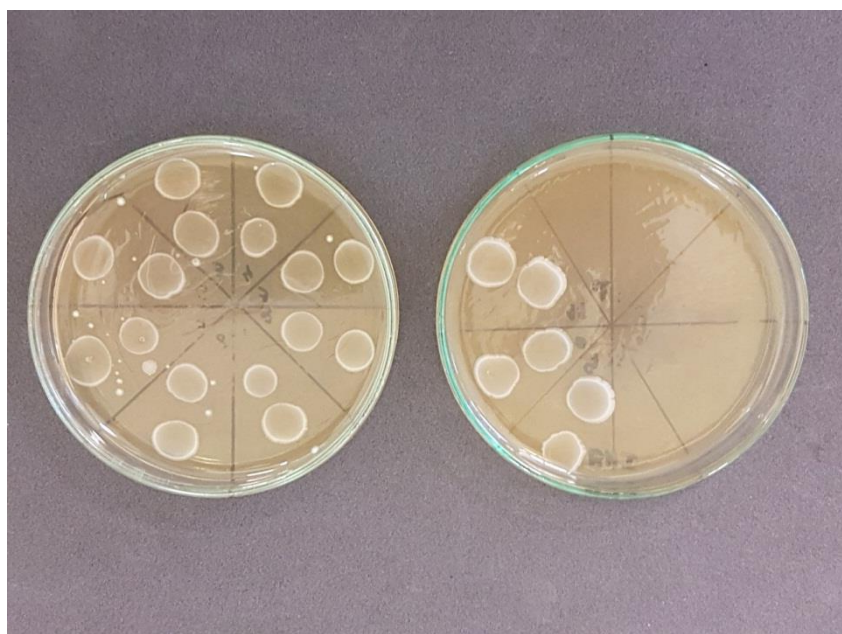


Figura 38: Todos os grupos apresentaram crescimento dos microrganismos similares.



4.5 Zimografia

Foi analisado que a concentração de MMP2 aplicada apresentou grande degradação gelatinolítica e as bandas formadas estavam fortes para visualização. Os resultados mostraram que houve ainda grande degradação gelatinolítica em todos os casos.

Figura 39: Gel com aplicação de MMP2 + AZD na proporção 1:1. Rastro a esquerda: 10 uL de AZD + MMP2 ; rastro a direita: 15 uL de AZD + MMP2.

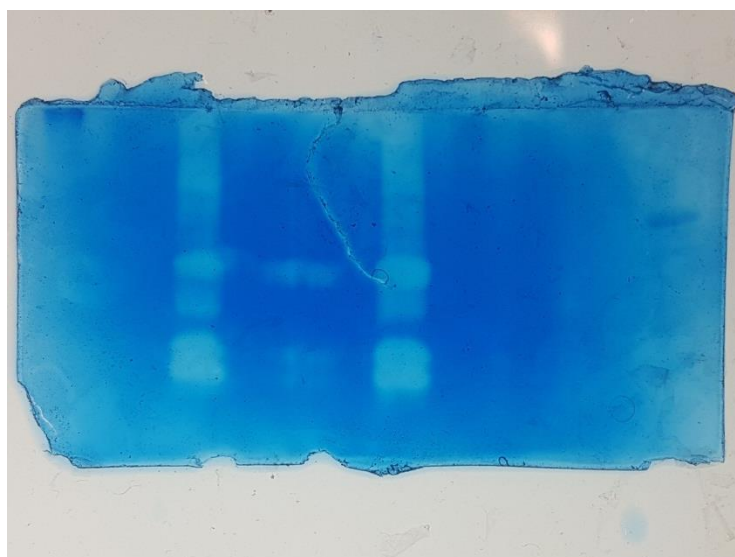


Figura 40: Gel controle. Rastro a esquerda (poço 3): MMP2 apenas como controle positivo; rastro a direita (poço 7): AZD apenas como controle negativo não apresentando degradação do gel.



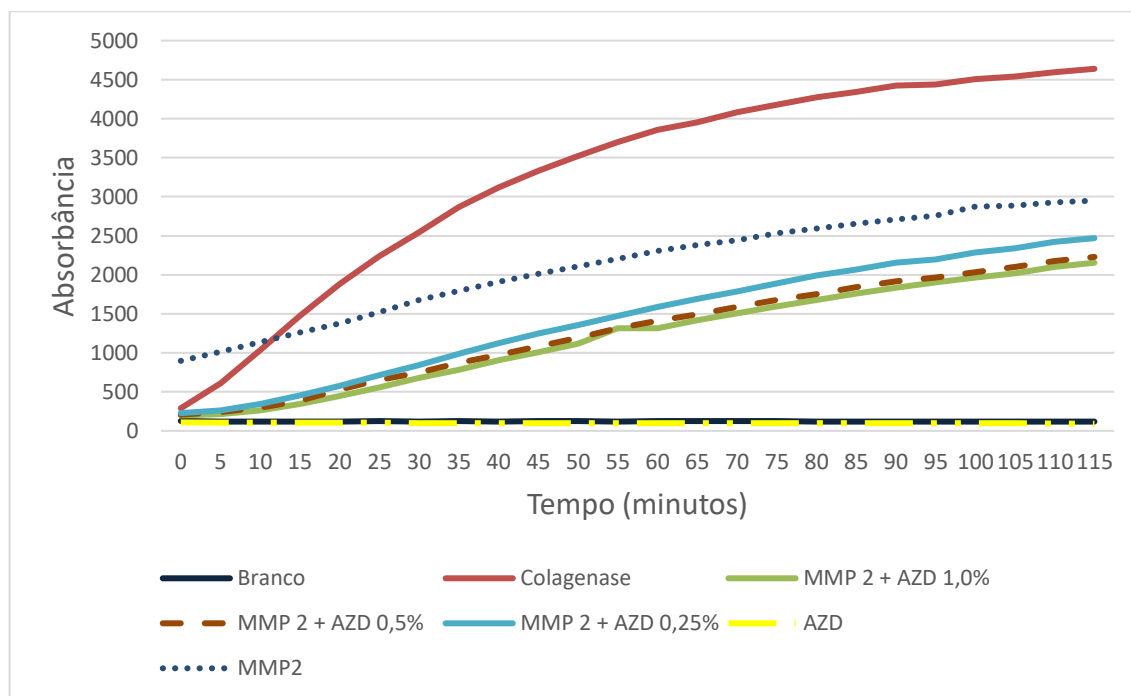
4.6 Fluorimetria

O teste de fluorimetria apresentou os seguintes dados tabelados (Tabela 8):

Tabela 8: Dados de absorvância da máquina de fluorimetria que foram mensurados a cada 5 minutos.

Tempo (min.)	Branco	Colagenase	MMP 2 + AZD 1,0%	MMP 2 + AZD 0,5%	MMP 2 + AZD 0,25%	AZD	MMP 2
0	126,71	289,08	197,05	207,62	227,6	108,49	896,60
5	121,13	608,81	216,06	238,38	260,25	108,3	1017,11
10	121,69	1036,4	264,46	299,47	345,47	108,1	1139,92
15	119,55	1470,8	342,89	386,22	453,49	105,16	1260,05
20	120,47	1882,8	446,97	526,18	578,27	103,25	1379,39
25	122,8	2235,1	553,8	649,08	711,4	103,27	1520,82
30	120,74	2544,8	676,83	749,31	846,29	101,4	1679,07
35	122,88	2863,8	782,44	867,56	987,87	100,49	1790,58
40	121,89	3120,2	902,03	973,01	1121,7	100,47	1907,81
45	123,07	3330,4	1010	1082,6	1244,4	99,503	2012,15
50	123,83	3521,6	1119,8	1192,4	1355,6	99,182	2110,31
55	120,07	3700,2	1312	1312	1473,9	99,351	2205,59
60	123,02	3856,4	1318	1408,3	1587,8	97,479	2302,50
65	123,16	3954,7	1415,7	1490,7	1692,5	100,27	2380,18
70	123,17	4080,7	1505	1590	1788,5	96,816	2445,16
75	122,63	4178,8	1592,3	1678,9	1886,7	96,827	2529,07
80	120,6	4276,3	1678,2	1755,4	1988,5	96,443	2594,93
85	121,15	4345,5	1756,1	1843,9	2063,4	95,759	2650,85
90	120,67	4420,9	1835,4	1913,5	2155,3	96,178	2706,37
95	120,11	4441	1900,4	1967,2	2193,5	95,355	2757,26
100	120,85	4505,3	1961,9	2034,6	2283,1	95,968	2874,85
105	119,41	4541,6	2021	2103	2342,7	95,993	2886,20
110	118,86	4596,2	2102,4	2175,4	2418,9	93,053	2927,14
115	118,74	4638,7	2154,3	2228,4	2469,6	94,533	2949,90

Figura 41: Gráfico da relação dos dados da tabela 4. Ordenada “y” Absorbância e abcissa “x” tempo (minutos), mostra a relação atividade x tempo da MMP, MMP + AZD e Colagenase.



5 DISCUSSÃO

Aproximadamente 50% em volume da dentina é constituída pela fase mineral, o restante (aproximadamente 30%) colágeno tipo 1 e água (TJÄDERHANE et al., 2009). A penetrabilidade dentinária depende da presença e quantidade de túbulos dentinários, umidade e local onde se encontra a área a receber preparo para adesão (PASHLEY; CARVALHO, 1997). Esta variação estrutural e de permeabilidade afeta diretamente o processo de adesão em dentina (GIANNINI et al., 2001; CARVALHO, R. M. et al., 2009; PERDIGAO, 2010; PASHLEY et al., 2011).

A diferença regional de adesão em dentina já está descrita em diversos trabalhos em que a adesão se mostra mais favorável em dentina distante do conduto endodôntico do que a dentina mais próxima ao conduto (CARVALHO, R. M. et al., 2009). Além disso o tipo de cimento resinoso utilizado também pode interferir nessa adesão (VICHI; GRANDINI; FERRARI, 2001; BONFANTE et al., 2007; WANG, V. J. et al., 2008), assim como soluções irrigantes empregadas previamente à cimentação como agentes de remoção de *smear layer* e antimicrobianos (BARRETO et al., 2016; ALKHUDHAIRY, FAHAD I. et al., 2018; SUZUKI et al., 2019). Apesar de apresentar alterações quanto ao retardo ou redução do processo de polimerização do sistema adesivo há consenso que a CHX é a solução de irrigação prévia mais indicada de acordo com relatos na literatura (CAMPOS, E. A. D. et al., 2009; LENZI et al., 2012; YIU et al., 2012; DIONYSOPOULOS, 2016).

O cimento autoadesivo apresenta superior adesão frente aos convencionais (ANDRE, C. B. et al., 2013), isso é atribuído às suas propriedades de interação com a dentina (SAHAFI et al., 2004). Os cimentos resinosos autoadesivos têm sido a primeira opção em casos de restaurações indiretas com necessidade de cimentação de pino de fibra de vidro (ZICARI et al., 2013). A facilidade de uso desses cimentos leva a redução de falhas, devido à praticidade e rapidez do protocolo. Essas características tornam os cimentos autoadesivos uma ótima opção para se trabalhar em local de difícil acesso, baixo controle de umidade e pouca visibilidade (BOUILLAGUET et al., 2001). Neste estudo foi eleito o cimento resinoso autoadesivo RelyX U200 pelas qualidades adesivas e a praticidade apresentada quanto ao protocolo de cimentação de pinos de fibra de vidro, visando as necessidades clínicas de controle de fatores ambientais que agem contra o sucesso da adesão do sistema.

Há relatos embasados que o uso de dentes bovinos apresentam similaridade adequada para realização de experimentos que deveriam ser realizados em dentes humanos, uma vez que há dificuldade na obtenção de espécimes de origem humana os dentes bovinos se tornam uma ótima opção (SCHILKE et al., 2000). Trabalhos realizados visando a resistência de união em dentina bovina e humana mostraram que há semelhança entre os dados analisados (PIOCH; STAEHLE, 1996). Em trabalhos que analisam uso de diferentes sistemas adesivos em dentes humanos e dentes bovinos mostram que mesmo se variando o sistema adesivo não houve diferença estatisticamente significativa para os resultados de tração (MUENCH; DA SILVA; BALLESTER, 2000).

A adesão em dentina tem demonstrado melhorias quanto a força de união com evolução dos sistemas adesivos (PERDIGAO et al., 2000; OZER; BLATZ, 2013). No atual experimento foi constatado, por meio do teste *push out*, que o uso de AZD na pré cimentação de pinos de fibra de vidro com sistema resinoso autoadesivo apresentou força de união similar à solução de CHX que é a solução padrão de uso pré cimentação atual. Este fato é trazido com mais força quando se analisa os testes estatísticos realizados a partir dos dados do teste *push out*, havendo discrepância quando comparado grupo Soro e grupo Hipoclorito de sódio, que já era esperado (DIKMEN; TARIM, 2018; GARCIA et al., 2018; SEBALLOS et al., 2018). De acordo com os resultados estatísticos do trabalho em questão pode-se observar que os grupos hipoclorito de sódio e soro apresentaram diferença estatisticamente significativa; além disso, foi identificado que os grupos CHX, AZD e EDTA apresentaram similaridade em relação aos resultados estatísticos entre grupos. A similaridade entre estes três grupos mostra que em situação *in vitro* pode-se sugerir que a ação de AZD é similar à utilização da CHX.

Vários autores ressaltam a importância da avaliação da dentina pelo método da Microscopia de Varredura Eletrônica, devido principalmente a qualidade de avaliação da superfície de contato resina-dentina (BOUILLAGUET et al., 2001; FERRARI; VICHI; GRANDINI, 2001; RADOVIC et al., 2008).

Diferentes soluções são preconizadas como irrigantes previamente a cimentação. Da mesma forma tem-se diversos resultados com suas peculiaridades. A análise de MEV permite verificar a qualidade da dentina remanescente (SANO et al., 1995). Ao comparar os grupos pós *push out* foi possível notar que houve nítida diferença entre os grupos, notadamente quando comparado grupo hipoclorito de sódio

com grupo soro fisiológico, CHX e AZD. A comparação entre grupo AZD e CHX apresentou resultados muito similares visualmente.

Pela microscopia eletrônica de varredura pode-se observar na superfície tratada pelo hipoclorito de sódio canalículos mais amplos com aspecto de degradação da matriz da dentina. Alguns autores já descreveram a interação do hipoclorito de sódio em relação à fase orgânica da dentina, sendo intensamente ativo em sua degradação (EICK et al., 1997). Alterações como degradação das fibras colágenas e ampliação da luz do conduto dos túbulos dentinários são alguns dos achados em análises por microscopia eletrônica de varredura em canais tratados com hipoclorito de sódio em concentrações e tempos de ação diferentes (PRATI; CHERSONI; PASHLEY, 1999; VARELA et al., 2003).

A presença das fibras colágenas é de fundamental importância na adesão em dentina e isto já está claro em diversos trabalhos na literatura (CARRILHO, M. R. et al., 2007). Além da presença estas fibras necessitam apresentar-se o mais intactas possível para real formação da camada híbrida de forma que as fibras fiquem envolvidas pelo sistema resinoso (CARVALHO, R. M. et al., 1999; CARRILHO, M. R. et al., 2007; MAIOR et al., 2007; LIN et al., 2016). A degradação destas está ligada a alguns fatores inerentes a fisiologia oral: colagenases endógenas como MMP2 e MMP9 (LI et al., 2015; SESEOGULLARI-DIRIHAN et al., 2015) e hidrólise dos componentes da camada híbrida (BRESCHI et al., 2008; FRASSETTO et al., 2016; BETANCOURT; BALDION; CASTELLANOS, 2019). A dentina apresenta diversas enzimas endógenas, principalmente a família das MMPs (MAZZONI et al., 2006; SULKALA et al., 2007; TJÄDERHANE et al., 2009; TJÄDERHANE et al., 2013). Estas enzimas, quando expostas, apresentam-se em sua forma ativa durante o processo de desafio ácido (PASHLEY et al., 2004; MAZZONI et al., 2006). Alguns autores mostraram que quanto mais intenso e prolongado for o ataque ácido, maior será ativação das MMPs (MAZZONI et al., 2006; TAY et al., 2006), conseqüentemente ao iniciar o preparo da dentina para receber o sistema adesivo automaticamente dá-se início ao processo de degradação das fibras colágenas expostas.

As principais MMPs envolvidas na degradação da camada híbrida são MMP2, MMP9 e MMP20 (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006; HANNAS et al., 2007), há estudos que mostram participação da MMP8 (HEDENBJORK-LAGER et al., 2016). Sendo a matriz orgânica da dentina composta em 90% por colágeno tipo 1 a maior parte da degradação ocorre devido a MMP2 e MMP9. Durante sua produção as MMPs

são armazenadas em sua forma inativa chamada de "pro MMP" (MAZZONI et al., 2007), podendo atingir sua forma ativa por estímulos externos como, por exemplo, redução do pH para 4,5 ou menos, em lesões cariosas (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006). A aplicação de sistemas de dois passos pode gerar aumento de 45% a 260% de ativação de MMPs enquanto sistemas autocondicionantes podem ter essa atividade aumentada em até 14 vezes. Em relação a inativação das MMPs, existem algumas teorias de que os sítios receptores de cálcio e zinco são bloqueados por determinadas substâncias (KOTRA et al., 2001). Por outro lado, em altas concentrações de ions de zinco, como pode ocorrer quando há liberação de materiais odontológicos, pode haver inibição da atividade das MMPs (SANTOS, M. C. et al., 2004). Há fortes indícios na literatura que a CHX tem ação quelante frente ao zinco e cálcio impedindo assim a ativação das pro MMPs (GENDRON et al., 1999). Outra via de inibição é por ligações em diferentes sítios das MMPs principalmente por hidróxido de zinco que pode alterar sua conformação e torna-la inativa (LARSEN; AULD, 1991; DE SOUZA; GERLACH; LINE, 2000). A proteção das fibras colágenas também pode ser feita pela ação de agentes *cross linkers*, que são substâncias que se ligam fortemente às fibras tornando-as resistentes à ação das MMPs (KNOTT; BAILEY, 1998; SCHEFFEL et al., 2014).

A modulação da atividade dessas enzimas pode levar à melhora e aumento da manutenção da camada híbrida (EKAMBARAM et al., 2014b; EKAMBARAM et al., 2014a). Assim como outras substâncias a CHX tem ação protetora do substrato orgânico dentinário uma vez que apresenta ação inibitória ou reduz ação colagenolítica das MMPs (CARRILHO, M. R. O. et al., 2007; MOON; WEAVER; BROOKS, 2010; ZHENG; CHEN, 2017), tal como tetraciclinas (GOLUB et al., 1983), bisfosfonatos (TERONEN et al., 1997a; TERONEN et al., 1997b), compostos quaternários de amônia (LIU et al., 2011), proantocianidinas (LIU; DUSEVICH; WANG, 2013), extratos de chá verde (CARVALHO, C. et al., 2016), doxiciclina (SAMARTZIS et al., 2019; ZHANG, F. et al., 2019) que apresentam ação quelante em relação a ions dispersos. A CHX apresenta duas linhas divergentes: que defendem que a CHX pode alterar negativamente em relação da força de adesão sistema resinoso e dentina (DIONYSOPOULOS, 2016) ou ainda altera a força de adesão tardia (KOMORI et al., 2009) e outra que alega que a CHX potencializa tal ligação (LOGUERCIO et al., 2009; DE-MELO et al., 2013). Sabendo que a atividade das MMPs são zinco e cálcio dependentes (SULKALA et al., 2007; JACOBSEN et al., 2011) substâncias com algum

grau de ação quelante podem alterar a ação das MMPs (HAZRA et al., 2012; TANAKIT et al., 2012).

Pode-se definir que há relação direta entre sistema adesivo e Metaloproteinase de Matriz quanto à força de união do cimento resinoso à dentina (PERDIGAO; REIS; LOGUERCIO, 2013). Sabendo disso o controle da ação degradativa das enzimas endógenas da dentina pode melhorar a força de união do sistema resinoso e dentina uma vez que a camada híbrida estará preservada (MOON; WEAVER; BROOKS, 2010; GOLDBERG et al., 2011; PERDIGAO; REIS; LOGUERCIO, 2013; LONGHI et al., 2015; OH et al., 2018). Proteínas de baixo peso molecular têm função específica de inibição das MMPs e estão presentes naturalmente nos tecidos e participam do *turn over* (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006). O digluconato de CHX além de excelente antimicrobiano apresenta característica similar aos inibidores teciduais, notadamente em relação MMP2, MMP8 e MMP9 (GENDRON et al., 1999; OSORIO et al., 2011; MASKE et al., 2019). Os testes estatísticos oriundos deste experimento mostraram que houve diferença entre grupo hipoclorito de sódio e grupo soro (controle) como já esperado e descrito em literatura (SARAIVA et al., 2013; ALKHUHAIRY; BIN-SHUWAISH, 2016; ANDRIOLI et al., 2016; MORENO-PRECIADO et al., 2016; JAIN, K. et al., 2018). Já é consagrado que a CHX apresenta bons resultados quanto a proteção das fibras colágenas e pode preservar a força de união de diferentes apresentações de sistema resinoso em relação a dentina (CAMPOS, E. A. D. et al., 2009; SILVA et al., 2015; DIONYSOPOULOS, 2016). O grupo AZD quando comparado com grupo CHX não mostrou diferença estatisticamente significativa, com isso pode-se sugerir que a relação da dentina com a AZD pode ser similar a relação da CHX quando os resultados são comparados em estudos.

No teste de fluorimetria, que apresentou resultados em que houve alteração quanto a ação gelatinolítica da MMP 2, pode-se notar a diferença entre os resultados da MMP2 junto ao peptídeo e a situação das associações de MMP2 com diferentes concentrações de AZD, bem como controle negativo de AZD e peptídeo. A montagem do gráfico leva a crer que o aumento da concentração de AZD pode reduzir ainda mais a atividade da proteolítica da MMP2. Possivelmente, havendo maiores concentrações seriam notadas flutuações de valores diferentes dos dados obtidos no gráfico apresentado neste estudo. O controle negativo também se mostrou sem atividades gelatinolíticas pelo teste de fluorimetria, apresentando resultados constantes e baixos ao longo do tempo de análise do experimento. Todo experimento foi preparado para

início das leituras após 30 minutos de incubação a 8°C em geladeira, o controle positivo (MMP2) teve seu início discrepante das demais associações analisadas possivelmente devido à ausência de agentes inibitórios.

Os resultados alcançados no teste de fluorimetria demonstram que houve alteração quanto a ação gelatinolítica da MMP 2, pode-se notar a diferença entre os resultados da MMP2 isolada junto ao peptídeo e a situação das associações de MMP2 com diferentes concentrações de AZD. A montagem do gráfico leva a crer que o aumento da concentração de AZD na solução estudada pode reduzir ainda mais a atividade da MMP2.

Na literatura encontra-se relatos de experimentos utilizando AZD comparado com CHX como agentes antimicrobianos visando controle de *Streptococcus mutans* e consequentemente controle das lesões cariosas (KANKARIYA; PATEL; KUNTE, 2016). O presente estudo mostrou que para o controle do *Enterococcus faecalis* a solução AZD foi ineficaz. Durante o experimento houve breve exposição da solução de AZD ao aço inox, não há estudo sobre relação entre AZD e metal, porém é uma hipótese que deve ser levada em consideração. As soluções que inibem as MMPs são prioritariamente quelantes, sendo assim a relação da solução de AZD com metal pode ter influenciado os resultados e quando houve a necessidade de apresentar característica antimicrobiana não houve efeito. A hipótese levantada no estudo é que a solução de AZD possa ser quelante.

A zimografia é um teste amplamente utilizado para verificar a ação proteolítica das amostras estudadas (VANDOOREN et al., 2013; WILKESMAN, 2017; WILKESMAN; KURZ, 2017). Podem ser estudados tanto situações fisiológicas quanto patológicas, como por exemplo, problemas cardiovasculares (RABKIN, 2014; OTTO et al., 2016), doenças pulmonares (HENDRIX; KHERADMAND, 2017; HUANG et al., 2017), nefropatias (OKAMOTO et al., 2017; ZHOU et al., 2017), patologias neuronais (REINHARD; RAZAK; ETHELL, 2015; PIJET et al., 2018), osteoporose (FENG et al., 2016; SUN et al., 2016), artrite (ZHANG et al., 2015; SHUI et al., 2017), metástase (ROTH; CAO, 2015; ZHANG, Y. et al., 2019), doença periodontal (AYRAVAINEN et al., 2018; DE MORAIS et al., 2018). Neste teste para o presente estudo foi utilizada associação de AZD e MMP2 em concentração de 1:1, a fim de mensurar a capacidade de inativação ou redução da atividade proteolítica da MMP2. As concentrações de MMP2 para o gel foram altas portanto, os resultados não foram mensurados. Apesar disso foi possível notar que houve modulação nas situações em que não havia AZD

associado ao MMP2 em relação a amostra de MMP2 isolada. Outro fator relevante é que a AZD isolada que foi corrida no mesmo gel da amostra de MMP2 isolada não apresentou sinais de que degradação proteica, excluindo assim a hipótese de que AZD pode ter ações similares as MMPs. Outro fator importante a ser ressaltado é que o teste de zimografia e fluorimetria são testes complementares, sendo assim, a análise do gráfico do teste de fluorimetria e imagens do gel de zimografia demonstram atividade proteolítica nas amostras associadas com MMP2 e ausência de atividade proteolítica com amostra isolada de AZD.

Muitos trabalhos na literatura demonstram que a contaminação secundária em condutos radiculares ocorre por *Enterococcus faecalis* (FARMAKIS et al., 2012; BOUILLAGUET et al., 2018; SHAKTAWAT et al., 2018), portanto foi o microrganismo eleito para o estudo. Na literatura encontram-se relatos de experimentos utilizando AZD comparado com CHX como agentes antimicrobianos visando controle de *Streptococcus mutans* e consequentemente controle das lesões cariosas (KANKARIYA; PATEL; KUNTE, 2016). Diversos estudos mostram que a utilização de solução de Neem apresentou-se como uma boa alternativa para irrigação dos condutos como agente de controle microbiano (MUSTAFA, 2016; SUNDARAM; NARAYANAN; VADAKKEPURAYIL, 2016; BHARDWAJ et al., 2017; JOY SINHA et al., 2017; DEDHIA et al., 2018). SHAH et al. (2016) e colaboradores apresentaram estudo em que foi utilizado AZD como agente de controle antimicrobiano em sistemas de canais endodônticos contaminados por *E. faecalis*, porém o trabalho utilizou solução pronta em que aproximadamente 6,5% de seu total era composto por AZD, o trabalho mostra ação antimicrobiana satisfatória, apesar da grande concentração da solução usada no trabalho *in vitro*. No entanto, não há estudos em que foi feito uso isolado da Azadirachtina ou seja, o extrato purificado do principal limonóide do Neem. No presente estudo foi utilizado AZD como solução irrigante antimicrobiana, porém os resultados em diferentes concentrações apresentaram-se ineficazes. Visto que grande parte dos agentes inibidores de MMPs tem função quelante a AZD também pode ter ação quelante, uma vez que mostrou inibição da MMP2 e previamente a utilização no teste de concentração inibitória mínima não se obteve sucesso quanto ao controle nem erradicação dos microrganismos. Por outro lado, com esse resultado pode-se sugerir que a AZD pode ter função quelante devido à exposição por curto tempo ao metal da base do fluxo laminar e não ter apresentado nenhuma função antimicrobiana.

Devido aos limites do estudo e das circunstâncias que decorreram ao longo de todo desenvolvimento dos experimentos, houve alterações nos experimentos quanto a metodologia, e limitações de alcance quanto aos materiais, notadamente a disponibilidade de AZD. Há muitas outras análises importantes que ainda podem ser realizadas com AZD, análises até quanto ao reforço do que o presente estudo afirma. Há possibilidade de verificar atividade da AZD em relação com agentes *cross linkers*, ação da AZD quanto homogeneizada aos cimentos resinosos ou ao adesivo, atividade antimicrobiana da AZD em relação a *Candida albicans* e demais microorganismos que apresentam-se como patógenos.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados deste estudo pode-se concluir que a solução aquosa de Azadirachtina:

1. não apresentou diferença na força de união de pinos de fibra de vidro fixados com cimento resinoso, quando comparada às outras soluções irrigantes utilizadas;
2. permitiu a manutenção de estrutura dentinária preservada e presença de fibras colágenas após análise por MEV;
3. não apresentou potencial antimicrobiano sobre o *E. faecalis*;
4. teve ação positiva sobre as propriedades de redução da ação das MMPs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, T. R.; DI FRANCESCANTONIO, M.; AMBROSANO, G. M.; GIANNINI, M. Effect of curing mode on bond strength of self-adhesive resin luting cements to dentin. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 93, n. 1, p. 122-127, 2010.

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**, v. 91, n. 1, p. 419-424, 2009.

ALKHUDHAIRY, F. I.; BIN-SHUWAISH, M. S. The effect of sodium hypochlorite and resin cement systems on push-out bond strength of cemented fiber posts. **Pak J Med Sci**, v. 32, n. 4, p. 905-910, 2016.

ALKHUDHAIRY, F. I.; YAMAN, P.; DENNISON, J.; MCDONALD, N.; HERRERO, A.; BIN-SHUWAISH, M. S. The effects of different irrigation solutions on the bond strength of cemented fiber posts. **Clin Cosmet Investig Dent**, v. 10, n., p. 221-230, 2018.

ALKHUDHAIRY, F. I.; YAMAN, P.; DENNISON, J.; MCDONALD, N.; HERRERO, A.; BIN-SHUWAISH, M. S. The effects of different irrigation solutions on the bond strength of cemented fiber posts. **Clin Cosmet Investig Dent**, v. 10, n., p. 221-230, 2018.

ANCHIETA, R. B.; ROCHA, E. P.; DE ALMEIDA, E. O.; JUNIOR, A. C.; MARTINI, A. P. Bonding all-ceramic restorations with two resins cement techniques: a clinical report of three-year follow-up. **Eur J Dent**, v. 5, n. 4, p. 478-485, 2011.

ANDRE, C. B.; AGUIAR, T. R.; AYRES, A. P.; AMBROSANO, G. M.; GIANNINI, M. Bond strength of self-adhesive resin cements to dry and moist dentin. **Braz Oral Res**, v. 27, n. 5, p. 389-395, 2013.

ANDRE, C. B.; AGUIAR, T. R.; AYRES, A. P. A.; AMBROSANO, G. M. B.; GIANNINI, M. Bond strength of self-adhesive resin cements to dry and moist dentin. **Brazilian Oral Research**, v. 27, n., p. 389-395, 2013.

ANDRIOLI, A. R. V.; COUTINHO, M.; VASCONCELLOS, A. A. D.; MIRANDA, M. E. Relining effects on the push-out shear bond strength of glass fiber posts. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 45, n., p. 227-233, 2016.

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. **Dent Mater**, v. 26, n. 2, p. e50-62, 2010.

ARMSTRONG, S. R.; VARGAS, M. A.; CHUNG, I.; PASHLEY, D. H.; CAMPBELL, J. A.; LAFFOON, J. E.; QIAN, F. Resin-dentin interfacial ultrastructure and microtensile dentin bond strength after five-year water storage. **Oper Dent**, v. 29, n. 6, p. 705-712, 2004.

AYRAVAINEN, L.; HEIKKINEN, A. M.; KUULIALA, A.; AHOLA, K.; KOIVUNIEMI, R.; MOILANEN, E.; HAMALAINEN, M.; TERVAHARTIALA, T.; MEURMAN, J. H.; LEIRISALO-REPO, M.; SORSA, T. Anti-rheumatic medication and salivary MMP-8, a biomarker for periodontal disease. **Oral Dis**, v. 24, n. 8, p. 1562-1571, 2018.

BAENA, E.; FLORES, A.; CEBALLOS, L. Influence of root dentin treatment on the push-out bond strength of fiber posts. **Odontology**, v. 105, n. 2, p. 170-177, 2017.

BARAS, B. H.; WANG, S.; MELO, M. A. S.; TAY, F.; FOUAD, A. F.; AROLA, D. D.; WEIR, M. D.; XU, H. H. K. Novel Bioactive Root Canal Sealer with Antibiofilm and Remineralization Properties. **J Dent**, v., n., p., 2019.

BARRETO, M. S.; ROSA, R. A.; SEBALLOS, V. G.; MACHADO, E.; VALANDRO, L. F.; KAIZER, O. B.; SO, M.; BIER, C. Effect of Intracanal Irrigants on Bond Strength of Fiber Posts Cemented With a Self-adhesive Resin Cement. **Oper Dent**, v. 41, n. 6, p. e159-e167, 2016.

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**, v. 80, n. 1, p. 268-272, 2007.

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**, v. 86, n. 2, p. 330-334, 2008.

BEDRAN-RUSSO, A. K.; VIDAL, C. M.; DOS SANTOS, P. H.; CASTELLAN, C. S. Long-term effect of carbodiimide on dentin matrix and resin-dentin bonds. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 94, n. 1, p. 250-255, 2010.

BEDRAN-RUSSO, A. K.; PAULI, G. F.; CHEN, S. N.; MCALPINE, J.; CASTELLAN, C. S.; PHANSALKAR, R. S.; AGUIAR, T. R.; VIDAL, C. M.; NAPOTILANO, J. G.; NAM, J. W.; LEME, A. A. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. **Dent Mater**, v. 30, n. 1, p. 62-76, 2014.

BEDRAN-RUSSO, A. K. B.; YOO, K. J.; EMA, K. C.; PASHLEY, D. H. Mechanical properties of tannic-acid-treated dentin matrix. **Journal of dental research**, v. 88, n. 9, p. 807-811, 2009.

- BEHR, M.; ROSENTRITT, M.; MANGELKRAMER, M.; HANDEL, G. The influence of different cements on the fracture resistance and marginal adaptation of all-ceramic and fiber-reinforced crowns. **Int J Prosthodont**, v. 16, n. 5, p. 538-542, 2003.
- BENCSIK, P.; BARTEKOVA, M.; GORBE, A.; KISS, K.; PALOCZI, J.; RADOSINSKA, J.; SZUCS, G.; FERDINANDY, P. MMP Activity Detection in Zymograms. **Methods Mol Biol**, v. 1626, n., p. 53-70, 2017.
- BETANCOURT, D. E.; BALDION, P. A.; CASTELLANOS, J. E. Resin-Dentin Bonding Interface: Mechanisms of Degradation and Strategies for Stabilization of the Hybrid Layer. **Int J Biomater**, v. 2019, n., p. 5268342, 2019.
- BHARDWAJ, A.; SRIVASTAVA, N.; RANA, V.; ADLAKHA, V. K.; ASTHANA, A. K. How efficacious are Neem, Tulsi, Guduchi extracts and chlorhexidine as intracanal disinfectants? A comparative ex vivo study. **Ayu**, v. 38, n. 1-2, p. 70-75, 2017.
- BISWAS, K.; CHATTOPADHYAY, I.; BANERJEE, R. K.; BANDYOPADHYAY, U. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). **CURRENT SCIENCE-BANGALORE-**, v. 82, n. 11, p. 1336-1345, 2002.
- BONFANTE, G.; KAIZER, O. B.; PEGORARO, L. F.; VALLE, A. L. D. Tensile bond strength of glass fiber posts luted with different cements. **Brazilian Oral Research**, v. 21, n., p. 159-164, 2007.
- BOUILLAGUET, S.; GYSI, P.; WATAHA, J. C.; CIUCCHI, B.; CATTANI, M.; GODIN, C.; MEYER, J. M. Bond strength of composite to dentin using conventional, one-step, and self-etching adhesive systems. **J Dent**, v. 29, n. 1, p. 55-61, 2001.
- BOUILLAGUET, S.; MANOIL, D.; GIRARD, M.; LOUIS, J.; GAIA, N.; LEO, S.; SCHRENZEL, J.; LAZAREVIC, V. Root Microbiota in Primary and Secondary Apical Periodontitis. **Front Microbiol**, v. 9, n., p. 2374, 2018.
- BOWEN, R. L. Properties of a silica-reinforced polymer for dental restorations. **J Am Dent Assoc**, v. 66, n., p. 57-64, 1963.
- BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; RUGGERI, A.; CADENARO, M.; DI LENARDA, R.; DE STEFANO DORIGO, E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. **Dent Mater**, v. 24, n. 1, p. 90-101, 2008.
- BRESCHI, L.; CAMMELLI, F.; VISINTINI, E.; MAZZONI, A.; VITA, F.; CARRILHO, M.; CADENARO, M.; FOULGER, S.; MAZZOTI, G.; TAY, F. R.; DI LENARDA, R.; PASHLEY, D. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. **J Adhes Dent**, v. 11, n. 3, p. 191-198, 2009.

BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; NATO, F.; CARRILHO, M.; VISINTINI, E.; TJADERHANE, L.; RUGGERI, A., JR.; TAY, F. R.; DORIGO EDE, S.; PASHLEY, D. H. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. **Dent Mater**, v. 26, n. 4, p. 320-325, 2010.

BUENO, A. L.; ARRAIS, C. A.; JORGE, A. C.; REIS, A. F.; AMARAL, C. M. Light-activation through indirect ceramic restorations: does the overexposure compensate for the attenuation in light intensity during resin cement polymerization? **J Appl Oral Sci**, v. 19, n. 1, p. 22-27, 2011.

CALIXTO, L. R.; BANDECA, M. C.; CLAVIJO, V.; ANDRADE, M. F.; VAZ, L. G.; CAMPOS, E. A. Effect of resin cement system and root region on the push-out bond strength of a translucent fiber post. **Oper Dent**, v. 37, n. 1, p. 80-86, 2012.

CAMILLOTO, G. P.; PIRES, A. C.; SOARES NDE, F.; ARAUJO, E. A.; ANDRADE, N. J.; FERREIRA, S. O. Effect of active packaging incorporated with triclosan on bacteria adhesion. **J Food Sci**, v. 75, n. 8, p. E557-564, 2010.

CAMPOS, E. A.; CORRER, G. M.; LEONARDI, D. P.; BARATO-FILHO, F.; GONZAGA, C. C.; ZIELAK, J. C. Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpal pressure and thermo-mechanical stressing. **J Dent**, v. 37, n. 2, p. 108-114, 2009.

CAMPOS, E. A. D.; CORRER, G. M.; LEONARDI, D. P.; PIZZATTO, E.; MORAIS, E. C. Influence of chlorhexidine concentration on microtensile bond strength of contemporary adhesive systems. **Brazilian Oral Research**, v. 23, n., p. 340-345, 2009.

CARRILHO, M. R.; GERALDELI, S.; TAY, F.; DE GOES, M. F.; CARVALHO, R. M.; TJADERHANE, L.; REIS, A. F.; HEBLING, J.; MAZZONI, A.; BRESCHI, L.; PASHLEY, D. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. **J Dent Res**, v. 86, n. 6, p. 529-533, 2007.

CARRILHO, M. R. O.; CARVALHO, R. M.; DE GOES, M. F.; DI HIPÓLITO, V.; GERALDELI, S.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H.; TJÄDERHANE, L. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. **Journal of dental research**, v. 86, n. 1, p. 90-94, 2007.

CARVALHO, C.; FERNANDES, F. P.; FREITAS VDA, P.; FRANCA, F. M.; BASTING, R. T.; TURSSI, C. P.; AMARAL, F. L. Effect of green tea extract on bonding durability of an etch-and-rinse adhesive system to caries-affected dentin. **J Appl Oral Sci**, v. 24, n. 3, p. 211-217, 2016.

CARVALHO, R. M.; CIUCCHI, B.; SANO, H.; YOSHIYAMA, M.; PASHLEY, D. H. Resin diffusion through demineralized dentin matrix. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 13, n., p. 417-424, 1999.

CARVALHO, R. M.; TJÄDERHANE, L.; MANSO, A. P.; CARRILHO, M. R.; CARVALHO, C. A. R. Dentin as a bonding substrate. **Endodontic Topics**, v. 21, n. 1, p. 62-88, 2009.

CASTELLAN, C. S.; PEREIRA, P. N.; GRANDE, R. H.; BEDRAN-RUSSO, A. K. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. **Dent Mater**, v. 26, n. 10, p. 968-973, 2010.

CECCHIN, D.; DE ALMEIDA, J. F.; GOMES, B. P.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. 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**, v. 37, n. 9, p. 1310-1315, 2011a.

CECCHIN, D.; DE ALMEIDA, J. F.; GOMES, B. P.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. Effect of chlorhexidine and ethanol on the durability of the adhesion of the fiber post relined with resin composite to the root canal. **J Endod**, v. 37, n. 5, p. 678-683, 2011b.

CHAUSSAIN-MILLER, C.; FIORETTI, F.; GOLDBERG, M.; MENASHI, S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. **J Dent Res**, v. 85, n. 1, p. 22-32, 2006.

CHERSONI, S.; ACQUAVIVA, G. L.; PRATI, C.; FERRARI, M.; GRANDINI, S.; PASHLEY, D. H.; TAY, F. R. In vivo fluid movement through dentin adhesives in endodontically treated teeth. **J Dent Res**, v. 84, n. 3, p. 223-227, 2005.

CHHABRA, A.; RANI, V. Gel-Based Gelatin Zymography to Examine Matrix Metalloproteinase Activity in Cell Culture. **Methods Mol Biol**, v. 1731, n., p. 83-96, 2018.

CHIASSON, H.; BOSTANIAN, N.; VINCENT, C. Acaricidal properties of a Chenopodium-based botanical. **Journal of economic entomology**, v. 97, n. 4, p. 1373-1377, 2004.

CHOWDHURY, A.; NANDY, S. K.; SARKAR, J.; CHAKRABORTI, T.; CHAKRABORTI, S. Inhibition of pro-/active MMP-2 by green tea catechins and prediction of their interaction by molecular docking studies. **Mol Cell Biochem**, v. 427, n. 1-2, p. 111-122, 2017.

COLLARES, F. M.; RODRIGUES, S. B.; LEITUNE, V. C.; CELESTE, R. K.; BORBA DE ARAUJO, F.; SAMUEL, S. M. Chlorhexidine application in adhesive procedures: a meta-regression analysis. **J Adhes Dent**, v. 15, n. 1, p. 11-18, 2013.

CUNHA, B. A.; SIBLEY, C. M.; RISTUCCIA, A. M. Doxycycline. **Ther Drug Monit**, v. 4, n. 2, p. 115-135, 1982.

D'ARCANGELO, C.; D'AMARIO, M.; VADINI, M.; DE ANGELIS, F.; CAPUTI, S. Influence of surface treatments on the flexural properties of fiber posts. **J Endod**, v. 33, n. 7, p. 864-867, 2007.

DAL PIVA, A. M. O.; TRIBST, J. P. M.; BORGES, A. L. S.; BOTTINO, M. A.; SOUZA, R. O. A. Do Mechanical Advantages Exist in Relining Fiber Posts with Composite Prior to its Cementation? **J Adhes Dent**, v. 20, n. 6, p. 511-518, 2018.

DE-MELO, M. A. S.; GOES, D. D. C.; DE-MORAES, M. D. R.; SANTIAGO, S. L.; RODRIGUES, L. K. A. Effect of chlorhexidine on the bond strength of a self-etch adhesive system to sound and demineralized dentin. **Brazilian Oral Research**, v. 27, n., p. 218-224, 2013.

DE ARAUJO, D. F.; CHAVES, L. P.; BIM, O., JR.; PIMENTEL GARCIA, F. C.; ISHIKIRIAMA, S. K.; HONORIO, H. M.; 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**, v. 42, n. 6, p. 735-741, 2014.

DE CASTRO, F. L.; DE ANDRADE, M. F.; DUARTE JUNIOR, S. L.; VAZ, L. G.; AHID, F. J. Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. **J Adhes Dent**, v. 5, n. 2, p. 129-138, 2003.

DE LIMA, E.; SANTOS, R.; DURAO, M.; NASCIMENTO, A.; BRAZ, R. Universal cements: dual activated and chemically activated. **Acta Biomater Odontol Scand**, v. 2, n. 1, p. 125-129, 2016.

DE MORAIS, E. F.; PINHEIRO, J. C.; LEITE, R. B.; SANTOS, P. P. A.; BARBOZA, C. A. G.; FREITAS, R. A. Matrix metalloproteinase-8 levels in periodontal disease patients: A systematic review. **J Periodontal Res**, v. 53, n. 2, p. 156-163, 2018.

DE MUNCK, J.; VAN MEERBEEK, B.; YOSHIDA, Y.; INOUE, S.; VARGAS, M.; SUZUKI, K.; LAMBRECHTS, P.; VANHERLE, G. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. **J Dent Res**, v. 82, n. 2, p. 136-140, 2003.

DE OLIVEIRA, J. A.; PEREIRA, J. R.; LINS DO VALLE, A.; ZOGHEIB, L. V. Fracture resistance of endodontically treated teeth with different heights of crown ferrule restored with prefabricated carbon fiber post and composite resin core by intermittent loading. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 106, n. 5, p. e52-57, 2008.

DE SOUZA, A. P.; GERLACH, R. F.; LINE, S. R. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. **Dent Mater**, v. 16, n. 2, p. 103-108, 2000.

DEDHIA, J.; MUKHARJEE, E.; LUKE, A. M.; MATHEW, S.; PAWAR, A. M. Efficacy of *Andrographis paniculata* compared to *Azadirachta indica*, *Curcuma longa*, and sodium hypochlorite when used as root canal irrigants against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*: An in vitro antimicrobial study. **J Conserv Dent**, v. 21, n. 6, p. 642-645, 2018.

DELAI, D.; TEDESCO, M.; DE ALMEIDA, J.; CHAIN, M. C.; DA SILVEIRA TEIXEIRA, C.; SANTOS FELIPPE, M. C.; FELIPPE, W. T. Influence of Infected Root Dentin on the Bond Strength of a Self-adhesive Resin Cement. **Contemp Clin Dent**, v. 9, n. 1, p. 26-30, 2018.

DIKMEN, B.; TARIM, B. The effect of endodontic irrigants on the microtensile bond strength of different dentin adhesives. **Niger J Clin Pract**, v. 21, n. 3, p. 280-286, 2018.

DIONYSOPOULOS, D. Effect of digluconate chlorhexidine on bond strength between dental adhesive systems and dentin: A systematic review. **Journal of conservative dentistry : JCD**, v. 19, n. 1, p. 11-16, 2016.

DO VALLE, A. L.; PEREIRA, J. R.; SHIRATORI, F. K.; PEGORARO, L. F.; BONFANTE, G. Comparison of the fracture resistance of endodontically treated teeth restored with prefabricated posts and composite resin cores with different post lengths. **J Appl Oral Sci**, v. 15, n. 1, p. 29-32, 2007.

DRUMMOND, J. L. Degradation, fatigue, and failure of resin dental composite materials. **Journal of dental research**, v. 87, n. 8, p. 710-719, 2008.

EICK, J. D.; GWINNETT, A. J.; PASHLEY, D. H.; ROBINSON, S. J. Current concepts on adhesion to dentin. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 8, n. 3, p. 306-335, 1997.

EKAMBARAM, M.; YIU, C. K.; MATINLINNA, J. P.; KING, N. M.; TAY, F. R. Adjunctive application of chlorhexidine and ethanol-wet bonding on durability of bonds to sound and caries-affected dentine. **J Dent**, v. 42, n. 6, p. 709-719, 2014a.

EKAMBARAM, M.; YIU, C. K.; MATINLINNA, J. P.; CHANG, J. W.; TAY, F. R.; KING, N. M. Effect of chlorhexidine and ethanol-wet bonding with a hydrophobic adhesive to intraradicular dentine. **J Dent**, v. 42, n. 7, p. 872-882, 2014b.

EL MOURAD, A. M. Assessment of Bonding Effectiveness of Adhesive Materials to Tooth Structure using Bond Strength Test Methods: A Review of Literature. **Open Dent J**, v. 12, n., p. 664-678, 2018.

ELUMALAI, P.; GUNADHARINI, D. N.; SENTHILKUMAR, K.; BANUDEVI, S.; ARUNKUMAR, R.; BENSON, C. S.; SHARMILA, G.; ARUNAKARAN, J. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by nimbolide through extrinsic and intrinsic pathway. **Toxicol Lett**, v. 215, n. 2, p. 131-142, 2012.

EPASINGHE, D. J.; YIU, C. K.; BURROW, M. F.; HIRAISHI, N.; TAY, F. R. The inhibitory effect of proanthocyanidin on soluble and collagen-bound proteases. **J Dent**, v. 41, n. 9, p. 832-839, 2013.

ESTRELA, C. R. A.; DE OLIVEIRA, J. D.; TIRINTAN, F. C.; GUAPO-PAVARINA, R.; PEREIRA, T. M.; BANDECA, M. C.; TONETTO, M. R.; LIMA, S. L.; PEDRO, F. L.; BORGES, A. H. Antimicrobial Potential of Laser Diode in Infected Dentin. **J Contemp Dent Pract**, v. 19, n. 8, p. 904-909, 2018.

EVERHART, T. E.; THORNLEY, R. F. M. Wide-band detector for micro-microampere low-energy electron currents. **Journal of Scientific Instruments**, v. 37, n. 7, p. 246-248, 1960.

FABRY, W.; OKEMO, P. O.; ANSORG, R. Antibacterial activity of East African medicinal plants. **J Ethnopharmacol**, v. 60, n. 1, p. 79-84, 1998.

FARIA-E-SILVA, A. L.; PEIXOTO, A. C.; BORGES, M. G.; MENEZES MDE, S.; MORAES, R. R. Immediate and delayed photoactivation of self-adhesive resin cements and retention of glass-fiber posts. **Braz Oral Res**, v. 28, n., p., 2014.

FARMAKIS, E. T.; KONTAKIOTIS, E. G.; TSELENI-KOTSOVILI, A.; TSATSAS, V. G. Comparative in vitro antibacterial activity of six root canal sealers against *Enterococcus faecalis* and *Proteus vulgaris*. **J Investig Clin Dent**, v. 3, n. 4, p. 271-275, 2012.

FENG, P.; ZHANG, H.; ZHANG, Z.; DAI, X.; MAO, T.; FAN, Y.; XIE, X.; WEN, H.; YU, P.; HU, Y.; YAN, R. The interaction of MMP-2/B7-H3 in human osteoporosis. **Clin Immunol**, v. 162, n., p. 118-124, 2016.

FERRACANE, J. L.; STANSBURY, J. W.; BURKE, F. J. Self-adhesive resin cements - chemistry, properties and clinical considerations. **J Oral Rehabil**, v. 38, n. 4, p. 295-314, 2011.

FERRACANE, J. L. Resin-based composite performance: are there some things we can't predict? **Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials**, v. 29, n. 1, p. 51-58, 2013.

FERRARI, M.; VICHI, A.; GRANDINI, S. Efficacy of different adhesive techniques on bonding to root canal walls: an SEM investigation. **Dent Mater**, v. 17, n. 5, p. 422-429, 2001.

FRASSETTO, A.; BRESCHI, L.; TURCO, G.; MARCHESI, G.; DI LENARDA, R.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H.; CADENARO, M. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability-- A literature review. **Dent Mater**, v. 32, n. 2, p. e41-53, 2016.

GARCIA-GODOY, F.; KRAMER, N.; FEILZER, A. J.; FRANKENBERGER, R. Long-term degradation of enamel and dentin bonds: 6-year results in vitro vs. in vivo. **Dent Mater**, v. 26, n. 11, p. 1113-1118, 2010.

GARCIA, C.; RUALES-CARRERA, E.; PRATES, L. H.; VOLPATO, C. A. Effect of different irrigations on the bond strength of self-adhesive resin cement to root dentin. **J Clin Exp Dent**, v. 10, n. 2, p. e139-e145, 2018.

GENDRON, R.; GRENIER, D.; SORSA, T.; MAYRAND, D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 6, n. 3, p. 437-439, 1999.

GIANNINI, M.; CARVALHO, R. M.; MARTINS, L. R.; DIAS, C. T.; PASHLEY, D. H. The influence of tubule density and area of solid dentin on bond strength of two adhesive systems to dentin. **J Adhes Dent**, v. 3, n. 4, p. 315-324, 2001.

GOLDBERG, M.; KULKARNI, A. B.; YOUNG, M.; BOSKEY, A. Dentin: structure, composition and mineralization. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 3, n., p. 711-735, 2011.

GOLUB, L. M.; LEE, H. M.; LEHRER, G.; NEMIROFF, A.; MCNAMARA, T. F.; KAPLAN, R.; RAMAMURTHY, N. S. Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action. **J Periodontal Res**, v. 18, n. 5, p. 516-526, 1983.

GOMES FRANCA, F. M.; VANELI, R. C.; CONTI CDE, M.; BASTING, R. T.; DO AMARAL, F. L.; TURSSI, C. P. Effect of Chlorhexidine and Ethanol Application on Long-term Push-out Bond Strength of Fiber Posts to Dentin. **J Contemp Dent Pract**, v. 16, n. 7, p. 547-553, 2015.

GORACCI, C.; RAFFAELLI, O.; MONTICELLI, F.; BALLERI, B.; BERTELLI, E.; FERRARI, M. The adhesion between prefabricated FRC posts and composite resin cores: microtensile bond strength with and without post-silanization. **Dent Mater**, v. 21, n. 5, p. 437-444, 2005.

GROSS, J.; LAPIERE, C. M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 48, n. 6, p. 1014-1022, 1962.

GURGAN, S.; BOLAY, S.; KIREMITCI, A. Effect of disinfectant application methods on the bond strength of composite to dentin. **J Oral Rehabil**, v. 26, n. 10, p. 836-840, 1999.

GUSMAN, H.; SANTANA, R. B.; ZEHNDER, M. Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. **Eur J Oral Sci**, v. 110, n. 5, p. 353-357, 2002.

HADDAD, M. F.; ROCHA, E. P.; ASSUNCAO, W. G. Cementation of prosthetic restorations: from conventional cementation to dental bonding concept. **J Craniofac Surg**, v. 22, n. 3, p. 952-958, 2011.

HANNAS, A. R.; PEREIRA, J. C.; GRANJEIRO, J. M.; TJADERHANE, L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. **Acta Odontol Scand**, v. 65, n. 1, p. 1-13, 2007.

HARAGUSHIKU, G. A.; BACK, E. D.; TOMAZINHO, P. H.; BARATTO FILHO, F.; FURUSE, A. Y. Influence of antimicrobial solutions in the decontamination and adhesion of glass-fiber posts to root canals. **J Appl Oral Sci**, v. 23, n. 4, p. 436-441, 2015.

HASHIMOTO, M.; OHNO, H.; KAGA, M.; ENDO, K.; SANO, H.; OGUCHI, H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. **J Dent Res**, v. 79, n. 6, p. 1385-1391, 2000.

HAZRA, S.; GUHA, R.; JONGKEY, G.; PALUI, H.; MISHRA, A.; VEMUGANTI, G. K.; BASAK, S. K.; MANDAL, T. K.; KONAR, A. Modulation of matrix metalloproteinase activity by EDTA prevents posterior capsular opacification. **Molecular vision**, v. 18, n., p. 1701-1711, 2012.

HEBLING, J.; PASHLEY, D. H.; TJADERHANE, L.; TAY, F. R. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. **J Dent Res**, v. 84, n. 8, p. 741-746, 2005.

HEDENBJORK-LAGER, A.; HAMBERG, K.; PAAKKONEN, V.; TJADERHANE, L.; ERICSON, D. Collagen degradation and preservation of MMP-8 activity in human dentine matrix after demineralization. **Arch Oral Biol**, v. 68, n., p. 66-72, 2016.

HENDRIX, A. Y.; KHERADMAND, F. The Role of Matrix Metalloproteinases in Development, Repair, and Destruction of the Lungs. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 148, n., p. 1-29, 2017.

HIRAISHI, N.; YIU, C. K.; KING, N. M.; TAY, F. R. Effect of 2% chlorhexidine on dentin microtensile bond strengths and nanoleakage of luting cements. **J Dent**, v. 37, n. 6, p. 440-448, 2009.

HIRAISHI, N.; YIU, C. K.; KING, N. M.; TAY, F. R. Effect of chlorhexidine incorporation into a self-etching primer on dentine bond strength of a luting cement. **J Dent**, v. 38, n. 6, p. 496-502, 2010.

HU, X.; BEETON, C. Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography. **J Vis Exp**, v., n. 45, p., 2010.

HUANG, Y. F.; CHIU, W. C.; CHOU, S. H.; SU, Y. H.; CHEN, Y. W.; CHAI, C. Y.; HUANG, C. J.; HUANG, M. Y.; YUAN, S. F.; LEE, Y. C. Association of MMP-2 and MMP-9 expression with recurrences in primary spontaneous pneumothorax. **Kaohsiung J Med Sci**, v. 33, n. 1, p. 17-23, 2017.

HUSSAIN, S. K.; MCDONALD, A.; MOLES, D. R. In vitro study investigating the mass of tooth structure removed following endodontic and restorative procedures. **J Prosthet Dent**, v. 98, n. 4, p. 260-269, 2007.

JACOBSEN, J. A.; FULLAGAR, J. L.; MILLER, M. T.; COHEN, S. M. Identifying chelators for metalloprotein inhibitors using a fragment-based approach. **J Med Chem**, v. 54, n. 2, p. 591-602, 2011.

JAIN, A.; BASAL, E. Inhibition of Propionibacterium acnes-induced mediators of inflammation by Indian herbs. **Phytomedicine**, v. 10, n. 1, p. 34-38, 2003.

JAIN, K.; BERI, L.; KUNJIR, K.; BORSE, N.; NEEKHARA, N.; KADAM, A. Comparative evaluation of the effect of 10% sodium ascorbate, 10% hesperidin, 1% riboflavin 5 phosphate, collagen cross-linkers, on the pushout bond strength of fiber postluted to radicular dentin: In vitro study. **Journal of conservative dentistry : JCD**, v. 21, n. 1, p. 95-99, 2018.

JOY SINHA, D.; K, D. S. N.; JAISWAL, N.; VASUDEVA, A.; PRABHA TYAGI, S.; PRATAP SINGH, U. Antibacterial Effect of Azadirachta indica (Neem) or Curcuma longa (Turmeric) against Enterococcus faecalis Compared with That of 5% Sodium Hypochlorite or 2% Chlorhexidine in vitro. **Bull Tokyo Dent Coll**, v. 58, n. 2, p. 103-109, 2017.

JUNG, J. J.; RAZAVIAN, M.; KIM, H. Y.; YE, Y.; GOLESTANI, R.; TOCZEK, J.; ZHANG, J.; SADEGHI, M. M. Matrix metalloproteinase inhibitor, doxycycline and progression of calcific aortic valve disease in hyperlipidemic mice. **Sci Rep**, v. 6, n., p. 32659, 2016.

KAHNAMOUEI, M. A.; MOHAMMADI, N.; NAVIMIPOUR, E. J.; SHAKERIFAR, M. Push-out bond strength of quartz fibre posts to root canal dentin using total-etch and self-adhesive resin cements. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 17, n. 2, p. e337-344, 2012.

KAMALASANAN, R. R.; DEVARASANAHALLI, S. V.; ASWATHANARAYANA, R. M.; RASHMI, K.; GOWDA, Y.; NADIG, R. R. Effect of 5% Chlorine Dioxide Irrigant on Micro Push Out Bond Strength of Resin Sealer to Radicular Dentin: An In Vitro Study. **J Clin Diagn Res**, v. 11, n. 5, p. Zc49-zc53, 2017.

KANKARIYA, A. R.; PATEL, A. R.; KUNTE, S. S. The effect of different concentrations of water soluble azadirachtin (neem metabolite) on Streptococcus mutans compared with chlorhexidine. **J Indian Soc Pedod Prev Dent**, v. 34, n. 2, p. 105-110, 2016.

KASIC, S.; KNEZOVIC, M.; BEADER, N.; GABRIC, D.; MALCIC, A. I.; BARABA, A. Efficacy of Three Different Lasers on Eradication of Enterococcus faecalis and Candida albicans Biofilms in Root Canal System. **Photomed Laser Surg**, v. 35, n. 7, p. 372-377, 2017.

KNOTT, L.; BAILEY, A. J. Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance. **Bone**, v. 22, n. 3, p. 181-187, 1998.

KOIDE, T.; DAITO, M. Effects of various collagen crosslinking techniques on mechanical properties of collagen film. **Dent Mater J**, v. 16, n. 1, p. 1-9, 1997.

KOMORI, P. C.; PASHLEY, D. H.; TJADERHANE, L.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; DE GOES, M. F.; WANG, L.; CARRILHO, M. R. Effect of 2% chlorhexidine digluconate on the bond strength to normal versus caries-affected dentin. **Oper Dent**, v. 34, n. 2, p. 157-165, 2009.

KOSHIRO, K.; INOUE, S.; SANO, H.; DE MUNCK, J.; VAN MEERBEEK, B. In vivo degradation of resin-dentin bonds produced by a self-etch and an etch-and-rinse adhesive. **Eur J Oral Sci**, v. 113, n. 4, p. 341-348, 2005.

KOTRA, L. P.; CROSS, J. B.; SHIMURA, Y.; FRIDMAN, R.; SCHLEGEL, H. B.; MOBASHERY, S. Insight into the complex and dynamic process of activation of matrix metalloproteinases. **J Am Chem Soc**, v. 123, n. 13, p. 3108-3113, 2001.

KUMAR, V. S.; NAVARATNAM, V. Neem (Azadirachta indica): prehistory to contemporary medicinal uses to humankind. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 3, n. 7, p. 505-514, 2013.

KURTZ, J. S.; PERDIGAO, J.; GERALDELI, S.; HODGES, J. S.; BOWLES, W. R. Bond strengths of tooth-colored posts, effect of sealer, dentin adhesive, and root region. **Am J Dent**, v. 16 Spec No, n., p. 31a-36a, 2003.

LADHA, K.; VERMA, M. Conventional and contemporary luting cements: an overview. **J Indian Prosthodont Soc**, v. 10, n. 2, p. 79-88, 2010.

LARSEN, K. S.; AULD, D. S. Characterization of an inhibitory metal binding site in carboxypeptidase A. **Biochemistry**, v. 30, n. 10, p. 2613-2618, 1991.

LEBER, T. M.; BALKWILL, F. R. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. **Anal Biochem**, v. 249, n. 1, p. 24-28, 1997.

LEE, J.; SABATINI, C. Glutaraldehyde collagen cross-linking stabilizes resin-dentin interfaces and reduces bond degradation. **Eur J Oral Sci**, v. 125, n. 1, p. 63-71, 2017.

LEE, J. H. Fabricating a custom zirconia post-and-core without a post-and-core pattern or a scan post. **J Prosthet Dent**, v. 120, n. 2, p. 186-189, 2018.

LEITUNE, V. C.; COLLARES, F. M.; WERNER SAMUEL, S. M. Influence of chlorhexidine application at longitudinal push-out bond strength of fiber posts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 110, n. 5, p. e77-81, 2010.

LENZI, T. L.; TEDESCO, T. K.; SOARES, F. Z. M.; LOGUERCIO, A. D.; ROCHA, R. D. O. Chlorhexidine does not increase immediate bond strength of etch-and-rinse adhesive to caries-affected dentin of primary and permanent teeth. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n., p. 438-442, 2012.

LI, H.; LI, T.; LI, X.; ZHANG, Z.; LI, P.; LI, Z. Morphological effects of MMPs inhibitors on the dentin bonding. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, n. 7, p. 10793-10803, 2015.

LIN, H.-P.; LIN, J.; LI, J.; XU, J.-H.; MEHL, C. In vitro remineralization of hybrid layers using biomimetic analogs. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 17, n. 11, p. 864-873, 2016.

LIPOWSKY, H. H.; SAH, R.; LESCANIC, A. Relative roles of doxycycline and cation chelation in endothelial glycan shedding and adhesion of leukocytes. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 300, n. 2, p. H415-H422, 2011.

LIU, Y.; TJADERHANE, 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. **J Dent Res**, v. 90, n. 8, p. 953-968, 2011.

LIU, Y.; DUSEVICH, V.; WANG, Y. Proanthocyanidins rapidly stabilize the demineralized dentin layer. **J Dent Res**, v. 92, n. 8, p. 746-752, 2013.

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**, v. 117, n. 5, p. 587-596, 2009.

LONGHI, M.; CERRONI, L.; CONDÒ, S. G.; ARIANO, V.; PASQUANTONIO, G. The effects of host derived metalloproteinases on dentin bond and the role of MMPs inhibitors on dentin matrix degradation. **ORAL & implantology**, v. 7, n. 3, p. 71-79, 2015.

LORENZETTI, C. C.; BORTOLATTO, J. F.; RAMOS, A.; SHINOHARA, A. L.; SAAD, J. R. C.; KUGA, M. C. The effectiveness of glass ionomer cement as a fiber post cementation system in endodontically treated teeth. **Microsc Res Tech**, v., n., p., 2019.

MAIOR, J. R.; DA FIGUEIRA, M. A.; NETTO, A. B.; DE SOUZA, F. B.; DA SILVA, C. H.; TREDWIN, C. J. The importance of dentin collagen fibrils on the marginal sealing of adhesive restorations. **Oper Dent**, v. 32, n. 3, p. 261-265, 2007.

MANSO, A. P.; SILVA, N. R.; BONFANTE, E. A.; PEGORARO, T. A.; DIAS, R. A.; CARVALHO, R. M. Cements and adhesives for all-ceramic restorations. **Dent Clin North Am**, v. 55, n. 2, p. 311-332, ix, 2011.

MAROULAKOS, G.; HE, J.; NAGY, W. W. The Post-endodontic Adhesive Interface: Theoretical Perspectives and Potential Flaws. **J Endod**, v. 44, n. 3, p. 363-371, 2018.

MARTELLI, H., JR.; PELLIZZER, E. P.; ROSA, B. T.; LOPES, M. B.; GONINI, A., JR. Fracture resistance of structurally compromised root filled bovine teeth restored with accessory glass fibre posts. **Int Endod J**, v. 41, n. 8, p. 685-692, 2008.

MARTINEZ-INSUA, A.; DA SILVA, L.; RILO, B.; SANTANA, U. Comparison of the fracture resistances of pulpless teeth restored with a cast post and core or carbon-fiber post with a composite core. **J Prosthet Dent**, v. 80, n. 5, p. 527-532, 1998.

MASKE, T. T.; KUPER, N. K.; CENCI, M. S.; HUYSMANS, M. Chlorhexidine, a Matrix Metalloproteinase Inhibitor and the Development of Secondary Caries Wall Lesions in a Microcosm Biofilm Model. **Caries Res**, v. 53, n. 1, p. 107-117, 2019.

MATOS, A. B.; TREVELIN, L. T.; SILVA, B. T. F. D.; FRANCISCONI-DOS-RIOS, L. F.; SIRIANI, L. K.; CARDOSO, M. V. Bonding efficiency and durability: current possibilities. **Brazilian Oral Research**, v. 31, n., p., 2017.

MAZZONI, A.; PASHLEY, D. H.; NISHITANI, Y.; BRESCHI, L.; MANNELLO, F.; TJADERHANE, L.; TOLEDANO, M.; PASHLEY, E. L.; TAY, F. R. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. **Biomaterials**, v. 27, n. 25, p. 4470-4476, 2006.

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 forms in human sound dentin. **J Dent Res**, v. 86, n. 5, p. 436-440, 2007.

MOON, P. C.; WEAVER, J.; BROOKS, C. N. Review of matrix metalloproteinases' effect on the hybrid dentin bond layer stability and chlorhexidine clinical use to prevent bond failure. **The open dentistry journal**, v. 4, n., p. 147-152, 2010.

MORENO-PRECIADO, J.; VIVAS-MONCAYO, J. C.; CAMPO-GÓMEZ, I. C.; GARZÓN-RAYO, H. EVALUATION OF PUSH-OUT BOND STRENGTH IN FIBERGLASS POSTS CEMENTED IN NATURAL TEETH USING DIFFERENT CEMENTATION PROTOCOLS. **Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia**, v. 27, n., p. 296-321, 2016.

MUENCH, A.; DA SILVA, E. M.; BALLESTER, R. Y. Influence of different dentinal substrates on the tensile bond strength of three adhesive systems. **J Adhes Dent**, v. 2, n. 3, p. 209-212, 2000.

MUKESH, Y.; SAVITRI, P.; KAUSHIK, R.; SINGH, N. P. Studies on repellent activity of seed oils alone and in combination on mosquito, *Aedes aegypti*. **J Environ Biol**, v. 35, n. 5, p. 917-922, 2014.

MUSTAFA, M. Antibacterial Efficacy of Neem (*Azadirachta indica*) Extract against *Enterococcus faecalis*: An in vitro Study. **J Contemp Dent Pract**, v. 17, n. 10, p. 791-794, 2016.

NAKABAYASHI, N.; KOJIMA, K.; MASUHARA, E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. **J Biomed Mater Res**, v. 16, n. 3, p. 265-273, 1982.

NASCIMENTO, R. A.; POSSOMATO-VIEIRA, J. S.; GONCALVES-RIZZI, V. H.; BONACIO, G. F.; RIZZI, E.; DIAS-JUNIOR, C. A. Hypertension, augmented activity of matrix metalloproteinases-2 and -9 and angiogenic imbalance in hypertensive pregnancy are attenuated by doxycycline. **Eur J Pharmacol**, v. 840, n., p. 60-69, 2018.

NATARAJAN, V.; PUSHKALA, S.; KARUPPIAH, V. P.; PRASAD, P. V. Anti dermatophytic activity of *Azadirachta indica* (neem) by invitro study. **Indian J Pathol Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 311-313, 2002.

NAUMANN, M.; KOELPIN, M.; BEUER, F.; MEYER-LUECKEL, H. 10-year survival evaluation for glass-fiber-supported postendodontic restoration: a prospective observational clinical study. **J Endod**, v. 38, n. 4, p. 432-435, 2012.

NOVAIS, V. R.; SOARES, P. B.; GUIMARAES, C. M.; SCHLIEBE, L. R.; BRAGA, S. S.; SOARES, C. J. Effect of Gamma Radiation and Endodontic Treatment on Mechanical Properties of Human and Bovine Root Dentin. **Braz Dent J**, v. 27, n. 6, p. 670-674, 2016.

OH, S.; JUNG, H. S.; KIM, H. J.; JANG, J. H.; KIM, D. S.; CHOI, K. K.; KIM, S. Y. Effect of zinc on the collagen degradation in acid-etched dentin. **J Dent Sci**, v. 13, n. 2, p. 97-102, 2018.

OHLMANN, B.; FICKENSCHER, F.; DREYHAUPT, 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**, v. 36, n. 1, p. 87-92, 2008.

OKAMOTO, C. K.; VAN DEN BERG, C. W.; MASASHI, M.; GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M.; TAMBOURGI, D. V. Tetracycline Reduces Kidney Damage Induced by *Loxosceles* Spider Venom. **Toxins (Basel)**, v. 9, n. 3, p., 2017.

OLIVEIRA, L. V.; MAIA, T. S.; ZANCOPE, K.; MENEZES, M. S.; SOARES, C. J.; MOURA, C. C. G. Can intra-radicular cleaning protocols increase the retention of fiberglass posts? A systematic review. **Braz Oral Res**, v. 32, n., p. e16, 2018.

OPDAM, N. J.; BRONKHORST, E. M.; LOOMANS, B. A.; HUYSMANS, M. C. 12-year survival of composite vs. amalgam restorations. **J Dent Res**, v. 89, n. 10, p. 1063-1067, 2010.

OSORIO, R.; YAMAUTI, M.; OSORIO, E.; RUIZ-REQUENA, M. E.; PASHLEY, D.; TAY, F.; TOLEDANO, M. Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. **European journal of oral sciences**, v. 119, n. 1, p. 79-85, 2011.

OTTO, S.; DEUSSEN, A.; ZATSCHLER, B.; MULLER, B.; NEISSER, A.; BARTH, K.; MORAWIETZ, H.; KOPALIANI, I. A novel role of endothelium in activation of latent pro-membrane type 1 MMP and pro-MMP-2 in rat aorta. **Cardiovasc Res**, v. 109, n. 3, p. 409-418, 2016.

OZER, F.; BLATZ, M. B. Self-etch and etch-and-rinse adhesive systems in clinical dentistry. **Compend Contin Educ Dent**, v. 34, n. 1, p. 12-14, 16, 18; quiz 20, 30, 2013.

OZKURT, Z.; ISERI, U.; KAZAZOGLU, E. Zirconia ceramic post systems: a literature review and a case report. **Dent Mater J**, v. 29, n. 3, p. 233-245, 2010.

PAI, M. R.; ACHARYA, L. D.; UDUPA, N. Evaluation of antiplaque activity of Azadirachta indica leaf extract gel--a 6-week clinical study. **J Ethnopharmacol**, v. 90, n. 1, p. 99-103, 2004.

PASHLEY, D. H.; CARVALHO, R. M. Dentine permeability and dentine adhesion. **J Dent**, v. 25, n. 5, p. 355-372, 1997.

PASHLEY, D. H.; TAY, F. R.; YIU, C.; HASHIMOTO, M.; BRESCHI, L.; CARVALHO, R. M.; ITO, S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. **J Dent Res**, v. 83, n. 3, p. 216-221, 2004.

PASHLEY, D. H.; TAY, F. R.; BRESCHI, L.; TJADERHANE, L.; CARVALHO, R. M.; CARRILHO, M.; TEZVERGIL-MUTLUAY, A. State of the art etch-and-rinse adhesives. **Dent Mater**, v. 27, n. 1, p. 1-16, 2011.

PECIULIENE, V.; MANELIENE, R.; BALCIKONYTE, E.; DRUKTEINIS, S.; RUTKUNAS, V. Microorganisms in root canal infections: a review. **Stomatologija**, v. 10, n. 1, p. 4-9, 2008.

PERDIGAO, J.; FRANKENBERGER, R.; ROSA, B. T.; BRESCHI, L. New trends in dentin/enamel adhesion. **Am J Dent**, v. 13, n. Spec No, p. 25D-30D, 2000.

PERDIGAO, J. Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. **Dent Mater**, v. 26, n. 2, p. e24-37, 2010.

PERDIGAO, J.; REIS, A.; LOGUERCIO, A. D. Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. **J Esthet Restor Dent**, v. 25, n. 4, p. 219-241, 2013.

PEREIRA, J. R.; NETO TDE, M.; PORTO VDE, C.; PEGORARO, L. F.; DO VALLE, A. L. Influence of the remaining coronal structure on the resistance of teeth with intraradicular retainer. **Braz Dent J**, v. 16, n. 3, p. 197-201, 2005.

PEREIRA, J. R.; DE ORNELAS, F.; CONTI, P. C.; DO VALLE, A. L. Effect of a crown ferrule on the fracture resistance of endodontically treated teeth restored with prefabricated posts. **J Prosthet Dent**, v. 95, n. 1, p. 50-54, 2006.

PEREIRA, J. R.; VALLE, A. L.; SHIRATORI, F. K.; GHIZONI, J. S.; MELO, M. P. Influence of intraradicular post and crown ferrule on the fracture strength of endodontically treated teeth. **Braz Dent J**, v. 20, n. 4, p. 297-302, 2009.

PEREIRA, J. R.; ROSA, R. A.; SO, M. V.; AFONSO, D.; KUGA, M. C.; HONORIO, H. M.; VALLE, A. L.; VIDOTTI, H. A. Push-out bond strength of fiber posts to root dentin using glass ionomer and resin modified glass ionomer cements. **J Appl Oral Sci**, v. 22, n. 5, p. 390-396, 2014.

PHEBUS, J. G.; OWENS, B. M.; O'DELL, J. M.; TANTBIROJN, D. Microscopic evaluation of luting techniques for a fiber-reinforced post system. **Gen Dent**, v. 67, n. 2, p. 68-72, 2019.

PIJET, B.; STEFANIUK, M.; KOSTRZEWSKA-KSIEZYK, A.; TSILIBARY, P. E.; TZINIA, A.; KACZMAREK, L. Elevation of MMP-9 Levels Promotes Epileptogenesis After Traumatic Brain Injury. **Mol Neurobiol**, v. 55, n. 12, p. 9294-9306, 2018.

PIMENTA, S. P.; BALDI, B. G.; KAIRALLA, R. A.; CARVALHO, C. R. Doxycycline use in patients with lymphangiomyomatosis: biomarkers and pulmonary function response. **J Bras Pneumol**, v. 39, n. 1, p. 5-15, 2013.

PIOCH, T.; STAEHLE, H. J. Experimental investigation of the shear strengths of teeth in the region of the dentinoenamel junction. **Quintessence Int**, v. 27, n. 10, p. 711-714, 1996.

PISANI-PROENCA, J.; ERHARDT, M. C.; AMARAL, R.; VALANDRO, L. F.; BOTTINO, M. A.; DEL CASTILLO-SALMERON, R. Influence of different surface conditioning protocols on microtensile bond strength of self-adhesive resin cements to dentin. **J Prosthet Dent**, v. 105, n. 4, p. 227-235, 2011.

PRATI, C.; CHERSONI, S.; PASHLEY, D. H. Effect of removal of surface collagen fibrils on resin-dentin bonding. **Dent Mater**, v. 15, n. 5, p. 323-331, 1999.

RABKIN, S. W. Differential expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP proteins in thoracic aortic aneurysm - comparison with and without bicuspid aortic valve: a meta-analysis. **Vasa**, v. 43, n. 6, p. 433-442, 2014.

RADOVIC, I.; MAZZITELLI, C.; CHIEFFI, N.; FERRARI, M. Evaluation of the adhesion of fiber posts cemented using different adhesive approaches. **Eur J Oral Sci**, v. 116, n. 6, p. 557-563, 2008.

RAMOS, A.; GARCIA BELIZARIO, L.; VENCAO, A. C.; FAGUNDES JORDAO-BASSO, K. C.; DE SOUZA RASTELLI, A. N.; DE ANDRADE, M. F.; KUGA, M. C. Effects of Photodynamic Therapy on the Adhesive Interface of Fiber Posts Cementation Protocols. **J Endod**, v. 44, n. 1, p. 173-178, 2018a.

RAMOS, A.; BELIZARIO, L. G.; JORDAO-BASSO, K. C. F.; SHINOHARA, A. L.; KUGA, M. C. Effects of photodynamic therapy on the adhesive interface using two fiber posts cementation systems. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 24, n., p. 136-141, 2018b.

REINHARD, S. M.; RAZAK, K.; ETHELL, I. M. A delicate balance: role of MMP-9 in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders. **Front Cell Neurosci**, v. 9, n., p. 280, 2015.

RICCI, H. A.; SANABE, M. E.; DE SOUZA COSTA, C. A.; PASHLEY, D. H.; HEBLING, J. Chlorhexidine increases the longevity of in vivo resin-dentin bonds. **Eur J Oral Sci**, v. 118, n. 4, p. 411-416, 2010.

ROSA, W. L.; PIVA, E.; SILVA, A. F. Bond strength of universal adhesives: A systematic review and meta-analysis. **J Dent**, v. 43, n. 7, p. 765-776, 2015.

ROTH, E.; CAO, J. miR-181 suppresses metastasis via MMP-14. **Aging (Albany NY)**, v. 7, n. 10, p. 740-741, 2015.

ROYDHOUSE, R. H. Punch-shear test for dental purposes. **J Dent Res**, v. 49, n. 1, p. 131-136, 1970.

RYAN, M. E.; RAMAMURTHY, S.; GOLUB, L. M. Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. **Curr Opin Periodontol**, v. 3, n., p. 85-96, 1996.

SAHAFI, A.; PEUTZFELDT, A.; ASMUSSEN, E.; GOTFREDSEN, K. Retention and failure morphology of prefabricated posts. **Int J Prosthodont**, v. 17, n. 3, p. 307-312, 2004.

SAMARTZIS, E. P.; FINK, D.; STUCKI, M.; IMESCH, P. Doxycycline reduces MMP-2 activity and inhibits invasion of 12Z epithelial endometriotic cells as well as MMP-2 and -9 activity in primary endometriotic stromal cells in vitro. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 17, n. 1, p. 38, 2019.

SANARES, A. M.; ITTHAGARUN, A.; KING, N. M.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. Adverse surface interactions between one-bottle light-cured adhesives and chemical-cured composites. **Dent Mater**, v. 17, n. 6, p. 542-556, 2001.

SANO, H.; YOSHIYAMA, M.; EBISU, S.; BURROW, M. F.; TAKATSU, T.; CIUCCHI, B.; CARVALHO, R.; PASHLEY, D. H. Comparative SEM and TEM observations of nanoleakage within the hybrid layer. **Oper Dent**, v. 20, n. 4, p. 160-167, 1995.

SANO, H. Microtensile testing, nanoleakage, and biodegradation of resin-dentin bonds. **J Dent Res**, v. 85, n. 1, p. 11-14, 2006.

SANTANA, F. R.; SOARES, C. J.; SILVA, J. A.; ALENCAR, A. H.; RENOVATO, S. R.; LOPES, L. G.; ESTRELA, C. Effect of Instrumentation Techniques, Irrigant Solutions and Artificial accelerated Aging on Fiberglass Post Bond Strength to Intraradicular Dentin. **J Contemp Dent Pract**, v. 16, n. 7, p. 523-530, 2015.

SANTOS, G. C., JR.; SANTOS, M. J.; RIZKALLA, A. S. Adhesive cementation of etchable ceramic esthetic restorations. **J Can Dent Assoc**, v. 75, n. 5, p. 379-384, 2009.

SANTOS, J.; CARRILHO, M.; TERVAHARTIALA, T.; SORSA, T.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; PASHLEY, D.; TAY, F.; FERRAZ, C.; TJADERHANE, L. Determination of matrix metalloproteinases in human radicular dentin. **J Endod**, v. 35, n. 5, p. 686-689, 2009.

SANTOS, M. C.; DE SOUZA, A. P.; GERLACH, R. F.; TREVILATTO, P. C.; SCAREL-CAMINAGA, R. M.; LINE, S. R. Inhibition of human pulpal gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by zinc oxide cements. **J Oral Rehabil**, v. 31, n. 7, p. 660-664, 2004.

SANTOS, M. J.; BAPOO, H.; RIZKALLA, A. S.; SANTOS, G. C. Effect of dentin-cleaning techniques on the shear bond strength of self-adhesive resin luting cement to dentin. **Oper Dent**, v. 36, n. 5, p. 512-520, 2011.

SARAIVA, L. O.; AGUIAR, T. R.; COSTA, L.; CORRER-SOBRINHO, L.; MUNIZ, L.; MATHIAS, P. Effect of different adhesion strategies on fiber post cementation: Push-out test and scanning electron microscopy analysis. **Contemp Clin Dent**, v. 4, n. 4, p. 443-447, 2013.

SARKAR, J.; NANDY, S. K.; CHOWDHURY, A.; CHAKRABORTI, T.; CHAKRABORTI, S. Inhibition of MMP-9 by green tea catechins and prediction of their interaction by molecular docking analysis. **Biomed Pharmacother**, v. 84, n., p. 340-347, 2016.

SARKIS-ONOFRE, R.; SKUPIEN, J. A.; CENCI, M. S.; MORAES, R. R.; PEREIRA-CENCI, T. The role of resin cement on bond strength of glass-fiber posts luted into root canals: a systematic review and meta-analysis of in vitro studies. **Oper Dent**, v. 39, n. 1, p. E31-44, 2014.

SCHEFFEL, D. L.; HEBLING, J.; SCHEFFEL, R. H.; AGEE, K.; TURCO, G.; DE SOUZA COSTA, C. A.; PASHLEY, D. Inactivation of matrix-bound matrix metalloproteinases by cross-linking agents in acid-etched dentin. **Oper Dent**, v. 39, n. 2, p. 152-158, 2014.

SCHILKE, R.; LISSON, J. A.; BAUSS, O.; GEURTSSEN, W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. **Arch Oral Biol**, v. 45, n. 5, p. 355-361, 2000.

SCHWARTZ, R. S.; ROBBINS, J. W. Post placement and restoration of endodontically treated teeth: a literature review. **J Endod**, v. 30, n. 5, p. 289-301, 2004.

SEBALLOS, V. G.; BARRETO, M. S.; ROSA, R. A. D.; MACHADO, E.; VALANDRO, L. F.; KAIZER, O. B. Effect of Post-Space Irrigation with NaOCl And CaOCl at Different Concentrations on the Bond Strength of Posts Cemented with a Self-Adhesive Resin Cement. **Braz Dent J**, v. 29, n. 5, p. 446-451, 2018.

SESEOGULLARI-DIRIHAN, R.; MUTLUAY, M. M.; VALLITTU, P.; PASHLEY, D. H.; TEZVERGIL-MUTLUAY, A. Effect of pretreatment with collagen crosslinkers on dentin protease activity. **Dent Mater**, v. 31, n. 8, p. 941-947, 2015.

SHAH, S.; VENKATARAGHAVAN, K.; CHOUDHARY, P.; MOHAMMAD, S.; TRIVEDI, K.; SHAH, S. G. Evaluation of antimicrobial effect of azadirachtin plant extract (Soluneem ()) on commonly found root canal pathogenic microorganisms (viz. *Enterococcus faecalis*) in primary teeth: A microbiological study. **J Indian Soc Pedod Prev Dent**, v. 34, n. 3, p. 210-216, 2016.

SHAKTAWAT, A. S.; VERMA, K. G.; GOYAL, V.; JASUJA, P.; SUKHIJA, S. J.; MATHUR, A. Antimicrobial efficacy of 980 nm diode laser on *Enterococcus faecalis* in conjunction with various irrigation regimes in infected root canals: An in vitro study. **J Indian Soc Pedod Prev Dent**, v. 36, n. 4, p. 347-351, 2018.

SHARMA, C.; VAS, A. J.; GOALA, P.; GHEEWALA, T. M.; RIZVI, T. A.; HUSSAIN, A. Ethanollic Neem (*Azadirachta indica*) Leaf Extract Prevents Growth of MCF-7 and HeLa Cells and Potentiates the Therapeutic Index of Cisplatin. **Journal of Oncology**, v. 2014, n., p. 321754, 2014.

SHUI, X. L.; LIN, W.; MAO, C. W.; FENG, Y. Z.; KONG, J. Z.; CHEN, S. M. Blockade of IL-17 alleviated inflammation in rat arthritis and MMP-13 expression. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 21, n. 10, p. 2329-2337, 2017.

SILVA, E. M. D.; GLIR, D. H.; GILL, A. W. M. C.; GIOVANINI, A. F.; FURUSE, A. Y.; GONZAGA, C. C. Effect of Chlorhexidine on Dentin Bond Strength of Two Adhesive Systems after Storage in Different Media. **Brazilian Dental Journal**, v. 26, n., p. 642-647, 2015.

SIMON, J. F.; DARNELL, L. A. Considerations for proper selection of dental cements. **Compend Contin Educ Dent**, v. 33, n. 1, p. 28-30, 32, 34-25; quiz 36, 38, 2012.

SIQUEIRA, J. F., JR.; ROCAS, I. N. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. **J Endod**, v. 34, n. 11, p. 1291-1301.e1293, 2008.

SOARES, C. J.; SOARES, P. V.; PEREIRA, J. C.; FONSECA, R. B. Surface treatment protocols in the cementation process of ceramic and laboratory-processed composite restorations: a literature review. **J Esthet Restor Dent**, v. 17, n. 4, p. 224-235, 2005.

SOARES, F. Z.; FOLLAK, A.; DA ROSA, L. S.; MONTAGNER, A. F.; LENZI, T. L.; ROCHA, R. O. Bovine tooth is a substitute for human tooth on bond strength studies: A systematic review and meta-analysis of in vitro studies. **Dent Mater**, v. 32, n. 11, p. 1385-1393, 2016.

SOARES, J. A.; DE CARVALHO, M. A. R.; SOARES, S.; PEREIRA, R. D.; BRITO-JUNIOR, M.; MAGALHAES, P. P.; NUNES, I. A. M.; TAVAREZ, R. R. J.; RIZZI, C. C.; MOREIRA, R. N.; FARIAS, L. M.; MAIA FILHO, E. M. Pattern of Disinfection of Root Canal Dentin by Alternated Acid-Base Irrigating Regimen. **ScientificWorldJournal**, v. 2019, n., p. 9219238, 2019.

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**, v. 38, n. 6, p. 1989-2003, 2010.

SULKALA, M.; TERVAHARTIALA, T.; SORSA, T.; LARMAS, M.; SALO, T.; TJADERHANE, L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. **Arch Oral Biol**, v. 52, n. 2, p. 121-127, 2007.

SUN, B.; SUN, J.; HAN, X.; LIU, H.; LI, J.; DU, J.; FENG, W.; LIU, B.; CUI, J.; GUO, J.; AMIZUKA, N.; LI, M. Immunolocalization of MMP 2, 9 and 13 in prednisolone induced osteoporosis in mice. **Histol Histopathol**, v. 31, n. 6, p. 647-656, 2016.

SUNDARAM, D.; NARAYANAN, R. K.; VADAKKEPURAYIL, K. A Comparative Evaluation on Antimicrobial Effect of Honey, Neem Leaf Extract and Sodium Hypochlorite as Intracanal Irrigant: An Ex-Vivo Study. **J Clin Diagn Res**, v. 10, n. 8, p. Zc88-91, 2016.

SUNG, H. W.; CHANG, Y.; CHIU, C. T.; CHEN, C. N.; LIANG, H. C. Crosslinking characteristics and mechanical properties of a bovine pericardium fixed with a naturally occurring crosslinking agent. **J Biomed Mater Res**, v. 47, n. 2, p. 116-126, 1999.

SUZUKI, T. Y. U.; PEREIRA, M. A.; GOMES-FILHO, J. E.; WANG, L.; ASSUNÇÃO, W. G.; SANTOS, P. H. D. Do Irrigation Solutions Influence the Bond Interface Between Glass Fiber Posts and Dentin? **Brazilian Dental Journal**, v. 30, n., p. 106-116, 2019.

TAJHYA, R. B.; PATEL, R. S.; BEETON, C. Detection of Matrix Metalloproteinases by Zymography. **Methods Mol Biol**, v. 1579, n., p. 231-244, 2017.

TALUNGCHIT, S.; JESSOP, J. L.; COBB, D. S.; QIAN, F.; GERALDELI, S.; PASHLEY, D. H.; ARMSTRONG, S. R. Ethanol-wet bonding and chlorhexidine improve resin-dentin bond durability: quantitative analysis using raman spectroscopy. **J Adhes Dent**, v. 16, n. 5, p. 441-450, 2014.

TANAKIT, A.; ROUFFET, M.; MARTIN, D. P.; COHEN, S. M. Investigating chelating sulfonamides and their use in metalloproteinase inhibitors. **Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)**, v. 41, n. 21, p. 6507-6515, 2012.

TANDAN, S.; CHANDRA, S.; GUPTA, S.; TRIPATHI, H.; LAL, J. Pharmacological effects of Azadirachta indica leaves. **Fitoterapia**, v. 61, n. 1, p. 75-78, 1990.

TAY, F. R.; PASHLEY, D. H.; LOUSHINE, R. J.; WELLER, R. N.; MONTICELLI, F.; OSORIO, R. Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. **J Endod**, v. 32, n. 9, p. 862-868, 2006.

TERONEN, O.; KONTTINEN, Y. T.; LINDQVIST, C.; SALO, T.; INGMAN, T.; LAUHIO, A.; DING, Y.; SANTAVIRTA, S.; SORSA, T. Human neutrophil collagenase MMP-8 in peri-implant sulcus fluid and its inhibition by clodronate. **J Dent Res**, v. 76, n. 9, p. 1529-1537, 1997a.

TERONEN, O.; KONTTINEN, Y. T.; LINDQVIST, C.; SALO, T.; INGMAN, T.; LAUHIO, A.; DING, Y.; SANTAVIRTA, S.; VALLEALA, H.; SORSA, T. Inhibition of matrix metalloproteinase-1 by dichloromethylene bisphosphonate (clodronate). **Calcif Tissue Int**, v. 61, n. 1, p. 59-61, 1997b.

TJADERHANE, L.; NASCIMENTO, F. D.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; TERSARIOL, I. L.; 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**, v. 29, n. 1, p. 116-135, 2013.

TJÄDERHANE, L.; CARRILHO, M. R.; BRESCHI, L.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. Dentin basic structure and composition—an overview. **Endodontic Topics**, v. 20, n. 1, p. 3-29, 2009.

TOTH, M.; SOHAIL, A.; FRIDMAN, R. Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography. **Methods Mol Biol**, v. 878, n., p. 121-135, 2012.

UBALDINI, A. L. M.; BENETTI, A. R.; SATO, F.; PASCOTTO, R. C.; MEDINA NETO, A.; BAESSO, M. L.; PEUTZFELDT, A. Challenges in luting fibre posts: Adhesion to the post and to the dentine. **Dent Mater**, v. 34, n. 7, p. 1054-1062, 2018.

UPADHYAY, S. N.; DHAWAN, S.; GARG, S.; TALWAR, G. P. Immunomodulatory effects of neem (*Azadirachta indica*) oil. **Int J Immunopharmacol**, v. 14, n. 7, p. 1187-1193, 1992.

VAN MEERBEEK, B.; YOSHIHARA, K.; YOSHIDA, Y.; MINE, A.; DE MUNCK, J.; VAN LANDUYT, K. L. State of the art of self-etch adhesives. **Dent Mater**, v. 27, n. 1, p. 17-28, 2011.

VANDOOREN, J.; GEURTS, N.; MARTENS, E.; VAN DEN STEEN, P. E.; OPDENAKKER, G. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. **Nat Methods**, v. 10, n. 3, p. 211-220, 2013.

VANKA, A.; TANDON, S.; RAO, S. R.; UDUPA, N.; RAMKUMAR, P. The effect of indigenous Neem *Azadirachta indica* [correction of (*Adirachta indica*)] mouth wash on *Streptococcus mutans* and *lactobacilli* growth. **Indian J Dent Res**, v. 12, n. 3, p. 133-144, 2001.

VARELA, S. G.; RABADE, L. B.; LOMBARDERO, P. R.; SIXTO, J. M.; BAHILLO, J. D.; PARK, S. A. In vitro study of endodontic post cementation protocols that use resin cements. **J Prosthet Dent**, v. 89, n. 2, p. 146-153, 2003.

VARVARA, G.; PERINETTI, G.; DI IORIO, D.; MURMURA, G.; CAPUTI, S. In vitro evaluation of fracture resistance and failure mode of internally restored endodontically treated maxillary incisors with differing heights of residual dentin. **J Prosthet Dent**, v. 98, n. 5, p. 365-372, 2007.

VEERARAGHAVAN, J.; NATARAJAN, M.; LAGISETTY, P.; AWASTHI, V.; HERMAN, T. S.; ARAVINDAN, N. Impact of curcumin, raspberry extract, and neem leaf extract on rel protein-regulated cell death/radiosensitization in pancreatic cancer cells. **Pancreas**, v. 40, n. 7, p. 1107-1119, 2011.

VENZON, M.; ROSADO, M. C.; MOLINA-RUGAMA, A. J.; DUARTE, V. S.; DIAS, R.; PALLINI, A. Acaricidal efficacy of neem against *Polyphagotarsonemus latus* (Banks)(Acari: Tarsonemidae). **Crop Protection**, v. 27, n. 3, p. 869-872, 2008.

VICHI, A.; GRANDINI, S.; FERRARI, M. Clinical procedure for luting glass-fiber posts. **J Adhes Dent**, v. 3, n. 4, p. 353-359, 2001.

VIDAL, C. M.; AGUIAR, T. R.; PHANSALKAR, R.; MCALPINE, J. B.; NAPOLITANO, J. G.; CHEN, S. N.; ARAUJO, L. S.; PAULI, G. F.; BEDRAN-RUSSO, A. Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins. **Acta Biomater**, v. 10, n. 7, p. 3288-3294, 2014.

WALTER, R.; MIGUEZ, P. A.; ARNOLD, R. R.; PEREIRA, P. N.; DUARTE, W. R.; YAMAUCHI, M. Effects of natural cross-linkers on the stability of dentin collagen and the inhibition of root caries in vitro. **Caries Res**, v. 42, n. 4, p. 263-268, 2008.

WANG, L.; PINTO, T. A.; SILVA, L. M.; ARAUJO, D. F.; MARTINS, L. M.; HANNAS, A. R.; PEDREIRA, A. P.; FRANCISCONI, P. A.; HONORIO, H. M. Effect of 2% chlorhexidine digluconate on bond strength of a glass-fibre post to root dentine. **Int Endod J**, v. 46, n. 9, p. 847-854, 2013.

WANG, V. J.; CHEN, Y. M.; YIP, K. H.; SMALES, R. J.; MENG, Q. F.; CHEN, L. Effect of two fiber post types and two luting cement systems on regional post retention using the push-out test. **Dent Mater**, v. 24, n. 3, p. 372-377, 2008.

WILKESMAN, J.; KURZ, L. Zymography Principles. **Methods Mol Biol**, v. 1626, n., p. 3-10, 2017.

WILKESMAN, J. Cysteine Protease Zymography: Brief Review. **Methods Mol Biol**, v. 1626, n., p. 25-31, 2017.

WOESSNER, J. F., JR. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **Faseb j**, v. 5, n. 8, p. 2145-2154, 1991.

XIONG, J.; SHEN, L.; JIANG, Q.; LUO, B. Bonding Quality of Etch-and-Rinse Adhesives in Root Canals upon Different Pretreatments. **J Adhes Dent**, v. 21, n. 1, p. 27-36, 2019.

YIU, C. K.; KING, N. M.; PASHLEY, D. H.; SUH, B. I.; CARVALHO, R. M.; CARRILHO, M. R.; TAY, F. R. Effect of resin hydrophilicity and water storage on resin strength. **Biomaterials**, v. 25, n. 26, p. 5789-5796, 2004.

YIU, C. K.; HIRAISHI, N.; TAY, F. R.; KING, N. M. Effect of chlorhexidine incorporation into dental adhesive resin on durability of resin-dentin bond. **J Adhes Dent**, v. 14, n. 4, p. 355-362, 2012.

ZHANG, F.; HU, L.; WU, Y. X.; FAN, L.; LIU, W. T.; WANG, J.; SUN, H.; ZHANG, J. S. Doxycycline alleviates paraquat-induced acute lung injury by inhibiting neutrophil-derived matrix metalloproteinase 9. **Int Immunopharmacol**, v. 72, n., p. 243-251, 2019.

ZHANG, Y.; WANG, S.; LIU, Z.; YANG, L.; LIU, J.; XIU, M. Increased Six1 expression in macrophages promotes hepatocellular carcinoma growth and invasion by regulating MMP-9. **J Cell Mol Med**, v., n., p., 2019.

ZHANG, Y. F.; ZHENG, J.; ZHENG, L.; ZHOU, Z. R. Effect of adsorption time on the adhesion strength between salivary pellicle and human tooth enamel. **J Mech Behav Biomed Mater**, v. 42, n., p. 257-266, 2015.

ZHENG, P.; CHEN, H. Evaluate the effect of different mmps inhibitors on adhesive physical properties of dental adhesives, bond strength and mmp substarte activity. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 4975, 2017.

ZHOU, D.; TIAN, Y.; SUN, L.; ZHOU, L.; XIAO, L.; TAN, R. J.; TIAN, J.; FU, H.; HOU, F. F.; LIU, Y. Matrix Metalloproteinase-7 Is a Urinary Biomarker and Pathogenic Mediator of Kidney Fibrosis. **J Am Soc Nephrol**, v. 28, n. 2, p. 598-611, 2017.

ZICARI, F.; VAN MEERBEEK, B.; SCOTTI, R.; NAERT, I. Effect of ferrule and post placement on fracture resistance of endodontically treated teeth after fatigue loading. **J Dent**, v. 41, n. 3, p. 207-215, 2013.

ZOGHEIB, L. V.; PEREIRA, J. R.; DO VALLE, A. L.; DE OLIVEIRA, J. A.; PEGORARO, L. F. Fracture resistance of weakened roots restored with composite resin and glass fiber post. **Braz Dent J**, v. 19, n. 4, p. 329-333, 2008.

KNOLL, M. Aufladepotential und sekundäremission elektronenbestraelter körper. **Z tech Phys**, v. 16, p. 467-475, 1935.